



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE CUAUTILÁN

**PRESENCIA DE ANTICUERPOS IgG CONTRA EL VIRUS DE
INFLUENZA A H1N1 EN UNA POBLACIÓN DE TRES DELEGACIONES
POLÍTICAS DEL DISTRITO FEDERAL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

KARLA MARICEL ROJAS ESPINOSA

ASESORA: Dra. Guillermina Ávila Ramírez.

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Agradezco y dedico este trabajo

A mi madre, por ser guía, ejemplo, motivación y apoyo incondicional; por todos los sacrificios y esfuerzos, por tu fortaleza y valentía que me inspiran y enseñan a ir siempre adelante.

Porque siempre estás y eres para tu familia. Gracias por tu amor.

A mi familia, especialmente a mi hermano, por su enorme apoyo, cariño, comprensión, y cuidados, porque fueron mis primeros amigos, los que me enseñaron a sonreír, jugar, caminar y seguir adelante, gracias por acompañar cada uno de mis pasos, los quiero y admiro.

A mi compañero, amigo, y confidente, Alberto, por demostrarme tu amor, comprensión, apoyo y entrega, gracias por tu enorme paciencia y cariño, con los que alegras mis días y me ayudas a ser un mejor ser humano. Te amo.

A mi asesora, Dra. Guille gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted, por sus enseñanzas, ayuda, tiempo y paciencia, agradezco infinitamente su amistad, dedicación y confianza.

A mi equipo de laboratorio, por su compañía, comentarios, sugerencias y ayuda; por los gratos momentos, tanto educativos como recreativos. Gracias por sus sonrisas y amistad: Dra. Ana, Dra. Guille, Dra. Mayra, Dra. Fela, Yes, Fany, Liz, Laura, Cindy, Karla, Ulises, José y Marco.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrir las puertas de la FES Cuautitlán y la Facultad de Medicina para darme la oportunidad de formarme como profesional; por los conocimientos, aprendizajes, recuerdos y sobre todo alegrías y amistades encontradas.

El trabajo de tesis que se describe a continuación

fue realizado en el laboratorio de

Inmunomodulación y Agentes Patógenos

de la Facultad de Medicina, CU, UNAM.

Forma parte del

“Estudio seroepidemiológico de la nueva influenza

humana en la Ciudad de México”

proyecto No. PICDS 109-249, financiado por el

Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE CUADROS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	3
SIGLAS Y ABREVIATURAS	4
1. RESUMEN	5
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 INFLUENZA	6
2.2 HISTORIA DE LA INFLUENZA	6
2.3 PANDEMIA DE INFLUENZA AH1N1 2009	7
2.4 VIRUS DE INFLUENZA AH1N1	9
2.4.1 TAXONOMÍA, NOMENCLATURA Y GENERALIDADES	9
2.4.2 PATOGENIA	12
2.4.3 INMUNOPATOLOGÍA	13
2.4.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	14
2.4.5 DIAGNÓSTICO	16
2.4.5.1 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO TRADICIONALES	16
2.4.5.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	17
2.4.5.3 ELISA	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. OBJETIVOS	20

	Pág.
5. HIPÓTESIS	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1 ESTANDARIZACIÓN DEL ELISA	22
6.2 SELECCIÓN DE LOS PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS DEL VIRUS DE INFLUENZA A H1N1	22
6.3 METODOLOGÍA DEL ELISA	23
6.4 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG CONTRA EL VIRUS DE LA INFLUENZA EN LA POBLACIÓN	24
7. RESULTADOS	
7.1 ESTANDARIZACIÓN DEL ELISA	25
7.2 RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS	28
7.2.1 DATOS POBLACIONALES	29
7.2.2 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A AH1N1	30
8. DISCUSION	
8.1 SELECCIÓN DE PÉTIDOS	31
8.2 DATOS POBLACIONALES	32
8.3 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A AH1N1	33
8.3.1 EDAD	34
8.3.2 ASMA	36
8.3.3 SINTOMAS CARACTERÍSTICOS DE INFLUENZA A H1N1	37
8.3.4 SOBREPESO Y OBESIDAD	38
9. CONCLUSIONES	40
10. BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXOS	45

ÍNDICE DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1	Características de las últimas cuatro pandemias de influenza comparadas con la influenza estacional.	7
Cuadro 2	Secuencia de eventos importantes relacionados al brote de influenza A H1N1 del 2009.	8
Cuadro 3	Proteínas estructurales del virus de influenza A H1N1.	11
Cuadro 4	Resumen de síntomas presentados en pacientes diagnosticados con influenza AH1N1 según su edad.	15
Cuadro 5	Resultados del análisis estadístico por ANOVA inter e intra grupos, péptido NA15-FM, conjugado 1:6000.	26
Cuadro 6	Resultados del análisis estadístico t de Dunnett entre los grupos, péptido NA15-FM y conjugado 1:6000.	26
Cuadro 7	Resultados del análisis estadístico por ANOVA inter e intra grupos, péptido HA15-FM y conjugado 1:8000.	28
Cuadro 8	Resultados del análisis estadístico t de Dunnett entre los grupos, péptido HA15-FM y conjugado 1:8000.	28
Cuadro 9	Resultados de positividad en la muestra de población analizada del Distrito Federal.	29
Cuadro 10	Factores de riesgo (RM) asociados a personas positivas al péptido NA15-FM.	30
Cuadro 11	Comparación de individuos positivos a anticuerpos IgG en suero contra A H1N1 por grupos de edad.	30
Cuadro 12	Frecuencia de edades de la población en estudio	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de un virus de influenza tipo A.	9
Figura 2	Rearreglo del virus de la influenza A H1N1 a partir de otros virus de influenza humana y animal.	10
Figura 3	Objetivos de antivirales y diagnóstico potencial en el ciclo de vida de los virus de influenza.	12
Figura 4	Esquema de un embrión de pollo	16
Figura 5	Valores de absorbencia obtenidos en el ELISA para determinación de anticuerpos IgG contra el virus de influenza en muestras de suero. (NA15-FM)	25
Figura 6	Valores de absorbencia obtenidos en el ELISA para determinación de anticuerpos IgG contra el virus de influenza en muestras de suero. (HA15-FM)	27

SIGLAS Y ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
µL	Microlitros
a.C.	Antes de Cristo
CD4	Grupo de Diferenciación Celular 4 (Cluster of Differentiation)
CD8	Grupo de Diferenciación Celular 8 (Cluster of Differentiation)
CDC	Centro para el Control y prevención de Enfermedades (Center for Disease Control and Prevention)
CTL	Linfocito T citotóxico
CU, UNAM	Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
EUA	Estados Unidos de América
HA	Hemaglutinina
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
IMC	Índice de Masa Corporal
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Historia
INF	Interferón
MIP	Proteína Inflamatoria de los Macrófagos (Macrophage Inflammatory Protein)
mL	Mililitros
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero (messenger Ribonucleic Acid)
N	Normal
NA	Neuraminidasa
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Razon de Momios (Odds Ratio)
PAHO	Organización Panamericana de la Salud (Panamerican Health Organization)
PBS	Buffer de fosfatos salino
PBS-tw	Buffer de fosfatos salinos con Tween-20
PC	Punto de Corte
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
RM	Razón de Momios
RNA	Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Acid)
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
SA	Ácido Siálico (Sialic Acid)
SPSS	Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (Statistical Package for the Social Sciences)
Th	Células colaboradoras de linfocitos T (T helper cells)
TLR	Receptores Tipo Toll (Toll Like Receptors)
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
vRNA	RNA viral

1. RESUMEN

La epidemia de influenza A H1N1 vivida en México y en el mundo en 2009, fue un problema de salud bastante serio, los primeros casos reportados pusieron al mundo en alerta por tres razones importantes: su curso agudo y en ocasiones letal; su origen, de acuerdo a estudios filogenéticos actuales se trataba de un nuevo subtipo del virus de la influenza, desconocido hasta ese entonces, y su alta transmisibilidad en un periodo de tiempo relativamente corto, aunado a esto, no se contaba con una prueba rápida y certera que permitiera la confirmación del diagnóstico clínico.

En el presente estudio se propone la implementación de un ELISA para determinar anticuerpos IgG contra el virus A H1N1 utilizando los péptidos sintéticos NA15-FM y HA15-FM. El ELISA desarrollado se aplicó en una muestra poblacional del Distrito Federal, para buscar factores de riesgo relacionados con la presencia de anticuerpos anti A H1N1.

Los resultados arrojaron que 8.8% de la población contaba con anticuerpos contra NA15-FM y 9.5% contra HA15-FM. Los factores de riesgo relacionados con el péptido NA15-FM fueron: personas mayores de 70 años (OR≈2.00), asma (OR=2.81), individuos que presentaron síntomas característicos de influenza (OR=2.68), personas con sobrepeso y obesidad (OR=1.72), y los individuos que dijeron haber convivido con personas con síntomas de influenza (OR= 1.40), con una significancia estadística de $p < 0.05$. Los resultados obtenidos sugieren que parte de la población estudiada (mayores a 50 años) contaba con protección inmunológica al momento de la pandemia, lo que evitó una transmisión mayor entre la población, disminuyendo el número de enfermos y casos fatales reportados.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 INFLUENZA

La influenza es una infección contagiosa de origen viral considerada una de las causas más importantes de infecciones de las vías respiratorias. Los síntomas son parecidos a los del catarro común o resfriado, sin embargo, son más severos y su inicio es generalmente abrupto. Las epidemias de influenza han sido responsables de un promedio de 36 000 muertes por año en países como EUA durante la década de los noventas, afectando a la población en general pero principalmente a niños menores de 2 años y adultos mayores de 65 años ⁽¹⁾.

2.2 HISTORIA DE LA INFLUENZA

La influenza es una enfermedad respiratoria aguda que ha afectado a los humanos desde tiempos antiguos⁽²⁾. El término influenza fue introducido en el siglo XV durante la edad media y se le atribuye al papa Benedicto XIV para describir epidemias que eran atribuidas a las influencias astrales, derivado de la palabra latina 'influentia', aunque también se sostiene que otro posible origen es la expresión 'influenza di freddo' o sea por la influencia del frío. Sin embargo, existen registros en escritos médicos griegos que datan de 400 a.C. en los que existen descripciones hechas por Hipócrates de lo que podría ser una enfermedad similar a la influenza humana. La primera pandemia claramente registrada se originó en Asia en el año 1580. En los siguientes siglos, se reportaron importantes pandemias de influenza en los años 1729, 1789, 1830 y 1898 ⁽³⁾.

En 1892, Richard Pfeiffer identificó el *Haemophilus influenzae*, él y otros microbiólogos erróneamente llegaron a la conclusión de que esta bacteria Gram negativa era la causante de la gripe. Así, la etiología de la influenza permanecería desconocida hasta 1930-1933, cuando se logró aislar por primera vez a nivel de laboratorio el agente etiológico de esta enfermedad, primero en cerdos por Richard Schope y luego en humanos por un grupo de investigación dirigido por Patrick Laidlaw del Medical Research Council del Reino Unido ⁽³⁾.

En el siglo XX, emergieron tres virus de influenza causando las mayores pandemias en humanos: el virus de influenza española (H1N1) de 1918, el virus de la influenza Asiática (H2N2) de 1957, y el virus de la influenza de Hong Kong (H3N2) en 1968.

El virus de la influenza Española de 1918 circuló entre la población mundial durante 40 años y se estima que murieron entre 40 a 100 millones de personas alrededor del mundo, mientras los virus de 1957 y 1968 cobraron de 1 a 4 millones de vidas humanas ⁽⁴⁾ (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características de las últimas cuatro pandemias de influenza comparadas contra la influenza estacional ⁽⁵⁾.

PADEMIA (FECHA Y NOMBRE COMÚN)	ÁREA DE EMERGENCIA	SUBTIPO DE VIRUS DE INFLUENZA A	TASA DE MORTALIDAD ESTIMADA	ESTIMADO DE MORTALIDAD A NIVEL MUNDIAL	GRUPOS DE EDAD MÁS AFECTADOS
1918-1919 Influenza española	Desconocida	H1N1	2-3%	40-100 millones	Adultos jóvenes
1957-1958 Influenza Asiática	Sur de China	H2N2	<0.2%	1-4 millones	Niños
1968-1969 Influenza de Hong Kong	Sur de China	H3N2	<0.2%	1-4 millones	Todos los grupos de edad
2009-2010 Influenza A (H1N1) 2009 o Influenza Porcina	EUA y México	H1N1	0.01-0.06%	14,286 (confirmadas CDC) ≥8,768 (confirmadas; OMS)	Adultos jóvenes
Influenza estacional	Todo el mundo	A(H1N1), A(H3N2), B	<0.1%	300,000-500,000 al año	Niños y adultos mayores

2.3 PANDEMIA DE INFLUENZA A H1N1 2009

En 2009, el virus de la influenza A H1N1 emergió causando la primera pandemia de influenza del siglo veintiuno. La detección del nuevo virus en Estados Unidos y México en abril de 2009 seguido por la infección generalizada en todos los continentes en tan sólo nueve semanas, generó que la OMS declarara el estado de alerta.

A continuación se enumeran los eventos más relevantes relacionados con el brote de influenza de 2009 (Cuadro 2).

En México, la influenza A H1N1 (2009) a diferencia de la influenza estacional, afectó principalmente a la población joven, la mayoría de los cuales se recuperó sin consecuencias; hasta julio de 2010, la pandemia causó la muerte de 1,316 personas y se confirmaron por pruebas moleculares 72,548 casos. Estas cifras sólo representan los casos en los que se realizó una prueba diagnóstica por parte de los sistemas de salud. Sin embargo, se desconoce la proporción general de la población que fue infectada por el virus debido a que la mayoría de las personas no requirió atención médica (ya que sufrieron infecciones leves o incluso asintomáticas) y en otros casos, simplemente no fueron registrados ⁽⁷⁾.

Cuadro 2. Secuencia de eventos importantes relacionados al brote de influenza A H1N1 del 2009⁽⁶⁾.

Fecha	Evento
Febrero 2009	Epidemia de enfermedades respiratorias en La Gloria, Veracruz, México
12 de abril 2009	Autoridades Mexicanas de salud reportan epidemia a la PAHO
15 de abril 2009	CDC aísla A/2009/H1N1 en un niño de San Diego, California.
17 de abril de 2009	CDC aísla A/2009/H1N1 en una niña de Imperial, California
19 de abril de 2009	México declara alerta nacional
21 de abril de 2009	CDC alerta a médicos de una nueva cepa de virus de influenza A H1N1
24 de abril de 2009	OMS emite alerta de epidemia
27 de abril de 2009	OMS eleva la alerta de pandemia de nivel 3 a 4
29 de abril de 2009	OMS eleva la alerta de pandemia de nivel 4 a 5
11 de junio de 2009	OMS eleva la alerta de pandemia de nivel 5 a 6
08 de julio de 2009	Se identifica que el virus es resistente a oseltamivir
13 de julio de 2009	OMS recomienda vacunación en la pandemia H1N1 2009
2 de diciembre de 2009	Virus resistente a oseltamivir es identificado en pacientes hospitalizados e inmunosuprimidos
29 de junio de 2010	México declara el fin de la emergencia sanitaria
10 de agosto de 2010	OMS emite recomendaciones para el periodo de postpandemia

Nivel 3: Se notifican casos de infección humana por un nuevo subtipo del virus de influenza. No hay casos de transmisión de persona a persona

Nivel 4: Transmisión comprobada de persona a persona de un virus animal o un virus reagrupado humano-animal capaz de causar "brotes a nivel comunitario"

Nivel 5: Propagación del virus de persona a persona al menos en dos países de una región de la OMS

Nivel 6: Propagación del virus de persona a persona al menos en tres países de distintas regiones

Los pacientes que presentaron los cuadros clínicos más severos se vieron asociados a factores de riesgo tales como la obesidad, pues fue un factor predisponente, además de los extremos de la edad, embarazo y enfermedades médicas subyacentes ⁽⁸⁾. Sin embargo, el 70% de las defunciones ocurridas durante la nueva pandemia se presentaron en personas de entre 20 y 55 años, de las cuales el 40% eran personas sanas ⁽⁹⁾.

2.4 VIRUS DE INFLUENZA A H1N1

2.4.1 Taxonomía, nomenclatura y generalidades

El virus de la Influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, que se divide en 5 géneros, de los cuales el género influenza tiene tres grupos antigénicos: A, B y C, éstos se definen por la antigenicidad de la nucleocápside y proteínas de matriz en el core viral. Estas proteínas son los antígenos usados en la prueba de fijación de complemento para anticuerpos específicos.

El virus de la influenza A se subdivide según las glicoproteínas de su superficie: hemaglutinina (HA), que une el virión a la célula del hospedero para su penetración y replicación; y neuramidasa (NA), que facilita la propagación de la progenie del virus mediante la escisión del ácido siálico de los receptores celulares, diseminándolos así por todo el organismo. En total tiene 16 subtipos HA (H1 a H16) y 9 subtipos NA (N1 a N9). Sin embargo sólo tres subtipos HA y dos NA se han visto implicados en epidemias humanas: HA 1,2 y 3; y NA 1 y 2⁽¹⁰⁾.

Las partículas virales pleomórficas observadas en cultivos celulares o muestras clínicas pueden variar de forma esférica a filamentosa, con un diámetro de 120nm. El virus de la influenza tipo A es un virus RNA de una sola cadena simple y lineal de polaridad negativa, dividida en 8 segmentos que codifican para 11 o 12 proteínas. Estos están envueltos en una capa de contenido lipoprotéico de la cual emergen las glicoproteínas HA y NA⁽¹¹⁾ (Figura 1).

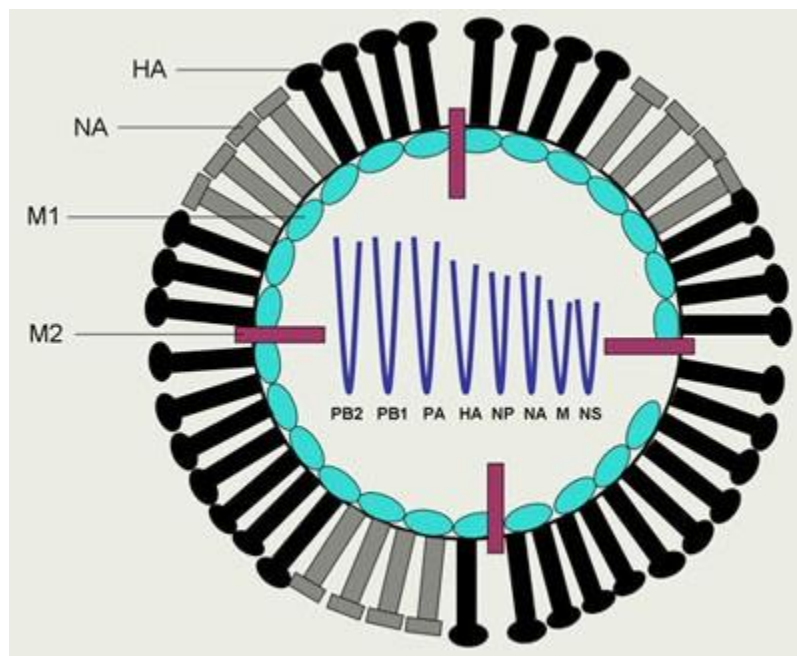


Figura 1. Esquema de un virus de influenza tipo A.⁽¹²⁾

Debido a la naturaleza segmentada del genoma del virus de la influenza A, estos virus son capaces de someterse a una reagrupación, causando cambios en la antigenicidad, se conocen dos tipos de variaciones antigénicas:

- Variaciones menores o deriva antigénica (drift). Son causadas por mutaciones en los nucleótidos del vRNA, que ocurren como resultado de los errores de copiado de la RNA polimerasa del virus.

- Variaciones mayores o cambio antigénico (shift). Cuando dos virus con diferentes subtipos de HA y NA infectan a un mismo animal, ambos genes pueden mezclarse y producirse nuevos virus, conocidos como rearrreglantes por haber experimentado un “rearrreglo de genes” con combinaciones de HA y NA diferentes a las de los virus originales; por ejemplo, los dos virus más recientes de la pandemia de la influenza humana fueron creados a través de la redistribución de virus humanos y aviares ⁽¹³⁾.

El reservorio natural del virus de la influenza son las aves acuáticas pero tiene la capacidad de infectar a un número mayor de especies hospederas, incluyendo los cerdos y seres humanos. Los virus de influenza se limitan generalmente a infectar hospederos específicos pues el tropismo tisular y la especificidad de receptores celulares son factores de restricción importantes; sin embargo en algunas ocasiones, en los cerdos ocurre un cambio en el tropismo debido a que en su tráquea contienen ambos receptores de ácido siálico: α -2,3-SA y α -2,6-SA (Figura 2). El análisis filogenético del virus A/2009/H1N1 sugiere que los antepasados de los 8 segmentos de genes son diferentes y pueden ser de origen aviar, humano y porcino ⁽¹³⁾. α -2,3-SA/ α -2,6-SA

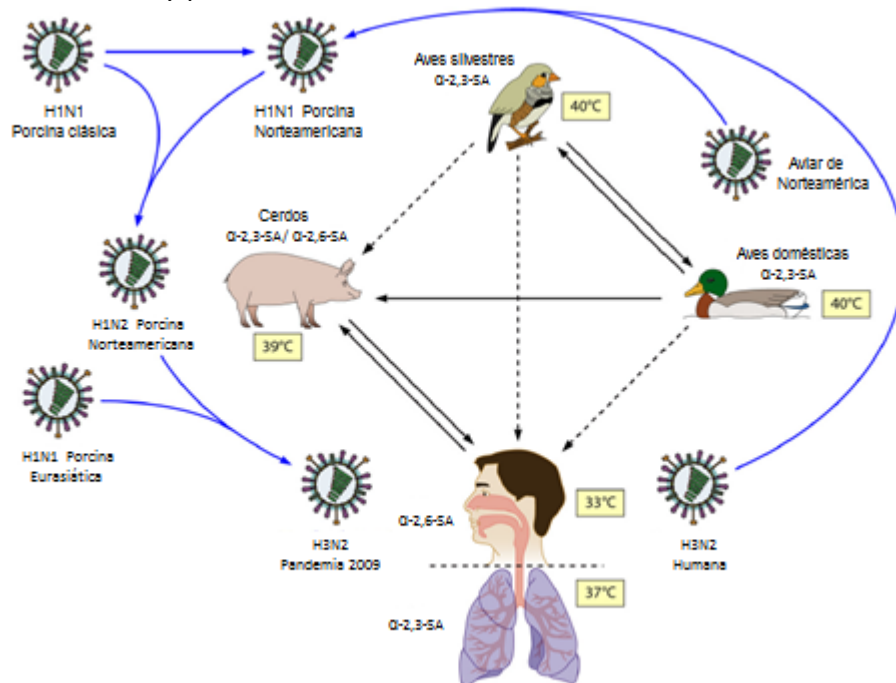


Figura 2. Rearreglo del virus de la influenza A H1N1 a partir de otros virus de influenza humana y animal ⁽¹³⁾.

Los 8 segmentos de genes del virus de influenza A codifican para 11 o 12 proteínas virales con diferentes funciones en el ciclo de vida y a menudo sirven como objetivos de fármacos y para diagnóstico (Fig. 3). A continuación se mencionan las proteínas conocidas y su principal función en el ciclo de vida viral ⁽¹⁴⁾ (Cuadro 3).

Cuadro 3. Proteínas estructurales del virus de influenza A H1N1.

PROTEÍNA	FUNCIÓN
HA	Responsable de la endocitosis del virus. Es el objetivo de anticuerpos neutralizantes, su precursor es HA0
HA0	Sufre escisión proteolítica en los componentes HA1 y HA2
HA1	Une el virus con el receptor de ácido siálico en la membrana celular
HA2	Responsable de la fusión de membranas
M1	Es una proteína estructural. Estimula el ensamblaje. Facilita la salida de vRNA del núcleo
M2	Canal iónico para la acidificación del núcleo viral durante la formación de endosomas. Facilita la pérdida de envoltura y la producción de HA
NA	Sirve como una sialidasa que se requiere para liberar la progenie del virus
N40	Función desconocida, es expresada a partir del fragmento PB1
NP	Nucleoproteínas. Componente estructural de ribonucleoproteínas (RNP). Para replicación
NS1	Inhibe la traducción del ARNm celular. Antagonista de INF que también pueden estimular citocinas proinflamatorias en células infectadas
NS2	Sirve para la liberación de material nuclear al citoplasma.
PA	Funciona como subunidad de polimerasas RNA y proteólisis
PB1	Componente de la polimerasa.
PB1-F2	Toxina mitocondrial que causa apoptosis celular e inhibe la inducción de INF- I
PB2	Componente de la polimerasa necesaria para unión y actividad de endonucleasas, también puede inhibir la inducción de INF I

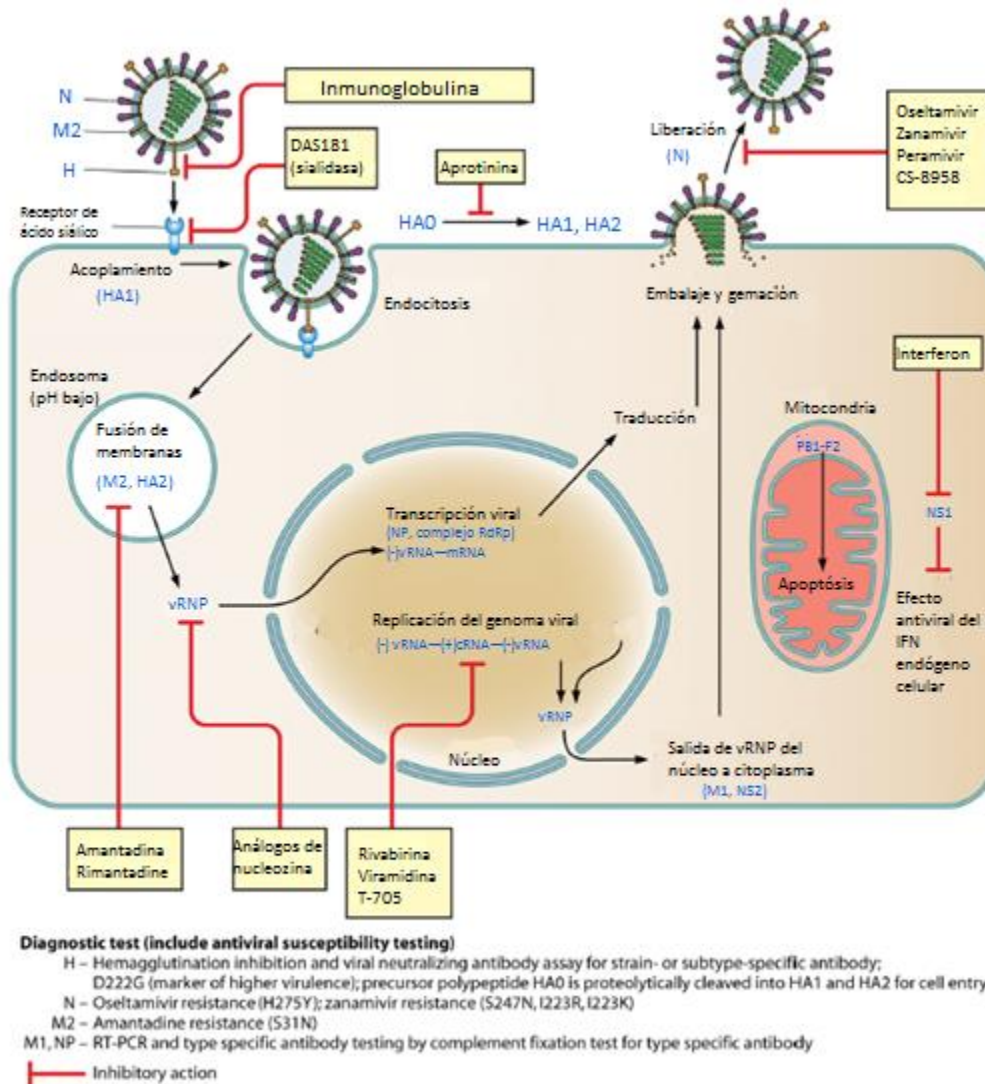


Figura 3. Objetivos de antivirales y diagnóstico potencial en el ciclo de vida de los virus de influenza ⁽¹³⁾.

2.4.2 Patogenia

Las vías de transmisión se resumen de la siguiente forma.

- Por vía respiratoria. El virus ingresa a partir de los estornudos o de la tos de los pacientes infectados. Como las partículas no permanecen suspendidas en el aire, es necesario el contacto cercano de las personas.

Las gotas de tos o estornudos tienen más de 5 nm de diámetro. Se ha calculado que 0.1µL de secreción nasal en forma de aerosol contienen alrededor de 100 partículas virales. La dosis infectiva del virus de la influenza en el humano es de alrededor de 100 a 1000 partículas virales ⁽¹⁵⁾.

- Por contacto con los virus que hubieran quedado en picaportes, dinero u otras superficies que impregnarían las manos. Al llevarse las manos a la boca, la nariz o los ojos se produce el contagio.

Con la influenza estacional, los estudios han demostrado que el periodo infeccioso se define como un día antes de la aparición de los síntomas en la persona y hasta siete días después de que pase la enfermedad ⁽¹⁶⁾.

2.4.3 Inmunopatología ⁽¹⁷⁾

El organismo humano posee mecanismos de protección que le permite identificar y eliminar al virus: la inmunidad innata (mecanismos inespecíficos de defensa) y la inmunidad adaptativa (mecanismos específicos de defensa).

1. Inmunidad Innata (Barrera mecánica, física y química):

- Capa mucociliar, pH del estómago, enzimas como colagenasa, hialuronidasa y tripsina.
- Activación de células de la inmunidad innata en el pulmón por moléculas virales que son reconocidas a través de “Toll Like Receptors” 8 (TLR8) presentes en las mismas.
- Destrucción del virus por macrófagos y células dendríticas por el efecto del pH y de productos derivados del oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y óxido nítrico).
- Secreción de citocinas: liberación de IL-1, TNF- α , IL-6, IFN-1 y 2, IL-8, proteína inflamatoria de los macrófagos (MIP-1) y proteínas de fase aguda en el pulmón. Las células hospederas envían señales a los linfocitos CD4+ y otros leucocitos a través de la producción de citocinas para su reclutamiento en el tejido pulmonar.
- Producción de prostaglandinas, en especial la 2.
- Las partículas virales HA y NA desencadenan el proceso febril.
- Hiperreactividad del sistema bronquial y obstrucción de las vías aéreas debida a la secreción de moco inducida por citocinas.
- Infiltrado de leucocitos, destrucción células infectadas.

2. Inmunidad adaptativa

- Respuesta Inmune mediada por anticuerpos (neutralización viral). Los anticuerpos anti-HA tienen la función de neutralizar al virus impidiendo la unión de la HA al ácido siálico. Además, estos anticuerpos neutralizantes dejan marcado al virus para el proceso de opsonización. Los anticuerpos anti-NA, reducen la eficiencia de liberación del virus de las células infectadas, ya que el papel de la NA es la liberación de las partículas virales del ácido siálico.
- Respuesta inmune celular: La inmunidad adaptativa celular es más compleja que la humoral, pues para que el virus sea reconocido por los linfocitos T es necesario que sea digerido por las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas); el virus es desintegrado en el interior de estas células hasta formar ciertos péptidos que se unen a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) las cuales los llevarán a la superficie celular donde serán reconocidos por el linfocito T específico para esos péptidos. En la respuesta celular participan tanto los T CD4+ y los T CD8+; se liberan citocinas inflamatorias, se induce una respuesta Th1, por lo que las células T antígeno específicas activadas favorecen la inflamación y el daño tisular.

2.4.4 Manifestaciones clínicas

Los signos que presentan los pacientes infectados por virus de la influenza son variables y cambian según la edad del paciente, como se muestra en el cuadro 4. La duración del cuadro clínico generalmente se limita a unos pocos días en la mayoría de los casos, aunque la tos y la debilidad pueden persistir por dos semanas, la severidad del cuadro depende de la respuesta inmune que se haya desarrollado previamente con variantes antigénicamente relacionadas⁽¹⁾.

Las personas con enfermedad pulmonar cardíaca crónica, o diabetes mellitus, están en alto riesgo de desarrollar complicaciones graves de la influenza, que pueden incluir bronquitis hemorrágica, neumonía (primaria viral o bacteriana secundaria) y la muerte. La bronquitis y neumonía hemorrágica pueden desarrollarse dentro de horas. De vez en cuando se produce neumonía viral mortal, disnea, cianosis, hemólisis, edema pulmonar y la muerte puede acontecer en tan sólo 48 horas después de la aparición de los síntomas⁽¹⁸⁾.

Cuadro 4. Resumen de síntomas presentados en pacientes diagnosticados con influenza A H1N1 según su edad ⁽¹⁹⁾.

Manifestación	Porcentaje positivo					OR (95% CI)
	<6 m (n=116)	6-23 m (n=172)	24-59 m (n=135)	>5 a (n=82)	Total (n=505)	
Fiebre	92	93	96	89	93	
Tracto respiratorio						
Tos	72	85	88	77	81	0.47 (0.28-0.79)
Rinorrea	64	54	53	38	53	1.77 (1.13-2.79)
Dificultad respiratoria	46	45	39	41	43	
Neumonía	17	39	39	29	32	0.36 (0.20-0.36)
Sibilancias	10	25	16	16	18	2.03 (1.24-3.32)
Otitis media	3	26	17	4	15	3.47 (2.02-5.99)
Faringitis	3	3	9	24	8	6.18 (2.99-12.76)
Sinusitis	0	3	1	6	2	3.86 (1.02-14.13)
Otros						
Deshidratación	42	33	34	13	32	1.79 (1.13-2.82)
Letargia	32	31	33	21	30	
Náuseas	16	30	39	24	28	
Diarrea	5	12	16	9	11	
Convulsiones	3	13	12	4	9	4.66 (1.83-12.60)
Exantema	4	4	7	6	5	
Conjuntivitis	3	1	4	1	2	

m=meses a=años

2.4.5 Diagnóstico ⁽²⁰⁾

Se cuenta con una amplia gama de técnicas de laboratorio que se pueden utilizar para establecer un diagnóstico de la infección por virus de la influenza, las cuales comprenden técnicas virológicas clásicas y nuevas pruebas desarrolladas.

2.4.5.1 Métodos de diagnóstico virológico tradicionales

a) Cultivo viral

El diagnóstico y diferenciación de la influenza en el laboratorio puede llevarse a cabo por el aislamiento del virus en muestras de exudado faríngeo o nasofaríngeo obtenido dentro de los primeros tres días del inicio de síntomas.

El cultivo viral se realiza en líneas celulares o en embriones de pollo. Entre las líneas celulares empleadas para el aislamiento de Influenza A y B se encuentran las de riñón de canino de Madin-Darby (MDCK), células de riñón de mono verde (VERO), fibroblastos de embrión de pollo y células epiteliales humanas. Para el cultivo en huevos embrionados de gallina, se utilizan embriones de nueve a once días de edad, el aislamiento viral se realiza en la cavidad alantoidea y la proliferación viral se verifica por hemaglutinación.

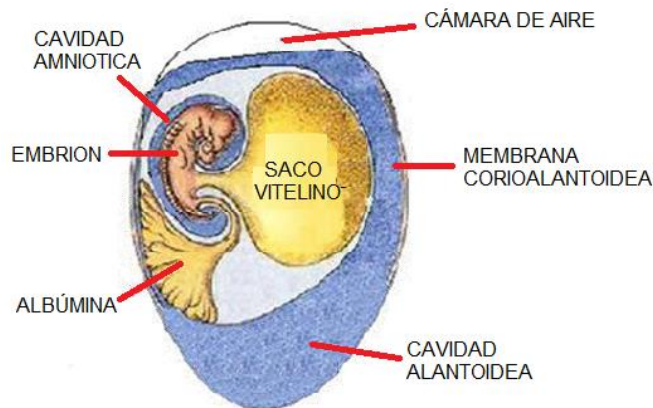


Figura 4. Esquema de un embrión de pollo⁽²¹⁾.

El aislamiento viral sigue siendo una técnica esencial e importante para mantener y validar en laboratorios de referencia la caracterización antigénica de nuevos virus de influenza circulantes.

El cultivo viral también se requiere para pruebas de susceptibilidad a antivirales y para producción de vacunas.

Las desventajas del cultivo viral incluyen resultados tardíos (3 a 14 días) y una significativa baja sensibilidad, particularmente para muestras con bajas cargas virales; además de requerir instalaciones especializadas y técnicos expertos en cultivo y tinción viral.

b) Serología

Los anticuerpos para el virus de la influenza aparecen después de dos semanas aproximadamente, presentando el título más alto de cuatro a siete semanas después de la infección. Existe una variedad de pruebas serológicas que incluyen a la inhibición de la hemaglutinación (IH), fijación de complemento e inmunoensayos. La serología puede ayudar a establecer un diagnóstico de las infecciones por nuevos virus de la influenza, y es una herramienta importante para llevar a cabo estudios seroepidemiológicos, que son esenciales para estimar la verdadera carga de infección con una nueva cepa.

Los ensayos serológicos han sido y continuarán siendo usados para la caracterización antigénica de los virus de influenza circulantes, para determinar saltos o 'shifts' antigénicos, formular vacunas y recomendaciones durante brotes pandémicos y epidemias anuales.

c) Pruebas rápidas para determinación de antígeno

Este tipo de ensayos jugaron un papel único en la pandemia de influenza de 2009. El primer caso de influenza pandémica en los Estados Unidos fue diagnosticado mediante una prueba rápida en investigación, siendo evaluado en un estudio clínico en San Diego, CA.

Aunque las pruebas rápidas de diagnóstico están disponibles comercialmente, varía la sensibilidad reportada, tres estudios recientes evaluaron pruebas rápidas de antígeno durante la pandemia, reportando una inesperada tasa alta de falsos-positivos de 37.8% o bajas especificidades, de 48.1% y 50.7%.

La mayor limitación de las pruebas rápidas es la baja y variable sensibilidad, la cual se ha reportado en un rango de 20% a 90%, variando ampliamente con las poblaciones estudiadas y los métodos de estudio (colección de muestras, almacenamiento y transporte, tipo de muestra, medio de transporte usado, entre otros).

2.4.5.2 Diagnóstico molecular

Los ensayos moleculares han sido cada vez más aceptados como el estándar de oro de diagnóstico para la detección de virus de influenza. Aunque distintos métodos de amplificación han sido descritos, la mayoría de los ensayos actuales se basan en el formato de amplificación por PCR.

Las ventajas de los ensayos de PCR incluyen sensibilidades significativamente más altas, tiempos de respuesta cortos, la capacidad de realizar la prueba para distintos patógenos simultáneamente y de esta manera proporcionar información del tipo y subtipo, detectar otros virus respiratorios y detectar co-infecciones con el virus de la gripe estacional; la capacidad de ser implementado utilizando plataformas automatizadas y de alto rendimiento que tienen potencial para probar grandes números de muestras y requieren tiempo mínimo del técnico y la capacidad para ser adaptado rápidamente para la detección de nuevos blancos.

La pandemia de 2009, sin embargo, también debe servir como una oportunidad para reexaminar las limitaciones de los ensayos de PCR y las plataformas actualmente existentes y volver a examinar los retos que quedan por abordar en la fabricación de este formato implementado por un número creciente de laboratorios.

Para el diagnóstico de influenza se considera como el estándar de oro al cultivo viral en embrión de pollo seguido de confirmación por inhibición de la hemaglutinación. Recientemente se han utilizado técnicas moleculares como RT-PCR, sin embargo, para realizar las pruebas mencionadas es necesario trabajar directamente con el agente patógeno, lo que representa un riesgo biológico, por lo que es necesario contar con laboratorios de altos niveles de seguridad, lo que eleva su complejidad y costo.

2.4.5.3 ELISA

Durante las últimas décadas, ha ocurrido un incremento en el número y variedad de ensayos de inmunodiagnóstico, una de las razones de esto es el desarrollo y el perfeccionamiento de los métodos que utilizan antígenos o anticuerpos marcados, resultando pruebas con altos niveles de sensibilidad y especificidad ⁽²²⁾.

La necesidad de tener una prueba rápida, segura y confiable para el diagnóstico de influenza, donde no se emplee el virus completo si no péptidos recombinantes nos lleva al planteamiento de desarrollar un ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay), ⁽²²⁾ que pueda realizarse en laboratorios de diagnóstico que no posean una alta infraestructura y que sea de utilidad para determinar los anticuerpos presentes en el suero humano específicos contra A H1N1.

3. JUSTIFICACION

Desde abril del 2009, una nueva cepa del virus de Influenza A (H1N1) (S-OIA) se identificó en México, Estados Unidos y Canadá principalmente. El 11 de junio la Organización Mundial de la Salud elevó el nivel de alerta a Fase 6 debido a la pandemia mundial en respuesta a la diseminación global de la nueva cepa ⁽¹⁾. El número total de personas infectadas alrededor del mundo era difícil de estimar. Para el año 2009, la OMS declaró que 120,000 personas habían muerto por influenza A H1N1, la mitad de ellos en Norteamérica (México, Canadá y EUA) ⁽²³⁾.

Debido a la alta densidad de población presente en el Distrito Federal, al hacinamiento, sus formas de traslado y hábitos diarios para el consumo de alimentos y convivencia, se estimó que la probabilidad de contagio con el virus de la influenza pudo ser mayor, situación que se evitó al acatar las acciones implementadas por las autoridades de salud de nuestro país.

Por tal motivo, el interés del presente trabajo es determinar el nivel de anticuerpos IgG anti influenza A H1N1 presentes en la población general, para conocer si estuvieron expuestos o no al virus y si desarrollaron una respuesta humoral.

La amplia propagación del virus refleja la importancia de tener métodos de diagnóstico certeros, rápidos y sencillos. Actualmente RT-PCR es el pilar para el diagnóstico específico de virus A H1N1 en la clínica, pero es cuestionable porque requiere largos periodos de tiempo y equipo especializado. También se han empleado pruebas rápidas de diagnóstico, sin embargo se ha visto que no diferencian eficientemente las cepas de los virus A H1N1 y estacional⁽²⁴⁾. Por lo que se requiere contar con pruebas sensibles que evidencien la infección con el virus de influenza A H1N1 en humanos.

En la actualidad, existe un sistema de ELISA comercial que detecta anticuerpos anti influenza AH1N1 en cerdos⁽²⁵⁾ pero no se cuenta con un sistema de ELISA aplicable a humanos, de ahí el planteamiento del presente trabajo de desarrollarlo y validarlo. Con esta técnica sería posible realizar un método de detección rápido, confiable y accesible en laboratorios que no cuenten con infraestructura necesaria para realizar ensayos moleculares.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un ELISA con péptidos recombinantes de las proteínas hemaglutinina y neuraminidasa del virus de influenza A H1N1 para la detección de anticuerpos IgG en sueros de una muestra poblacional de tres delegaciones políticas del Distrito Federal.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar péptidos inmunogénicos del virus de influenza A H1N1 para utilizarse en el ELISA para determinación de anticuerpos
- Evaluar distintos conjugados comerciales anti IgG humana para seleccionar el que presente mejor respuesta y la dilución de trabajo a emplear
- Estandarizar y validar un ELISA para determinación de anticuerpos contra el virus A H1N1 en sueros humanos.
- Aplicar el ELISA a un grupo de sueros representativo de la población del Distrito Federal para conocer la prevalencia de anticuerpos IgG.
- Analizar los resultados encontrados e identificar los principales factores biológicos y/o sociales asociados con la presencia de anticuerpos.

5. HIPÓTESIS

Si los péptidos recombinantes de las proteínas hemaglutinina y neuraminidasa del virus de influenza A H1N1 pueden utilizarse como fuente antigénica en un ELISA para la detección de anticuerpos IgG contra el virus, entonces podrá utilizarse el ensayo en la población general para determinar si estuvieron expuestos al virus y desarrollaron una respuesta humoral.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estandarización de ELISA

Se realizó la estandarización de un ELISA usando muestras de referencia negativas y positivas a la infección con virus AH1N1.

- MUESTRAS NEGATIVAS (Ms): Sueros donados por el INDRE (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica), organismo de la Secretaría de Salud en México; que fueron colectados durante 2008, (antes del brote epidemiológico) y se les realizaron pruebas de inhibición de la hemaglutinación y microneutralización para comprobar que no estuvieron expuestos al virus.
- MUESTRAS POST-BROTE: Sueros pertenecientes a pacientes que fueron diagnosticados positivos clínicamente a la infección con el virus A H1N1, estas muestras se colectaron 6 meses después que se presentó el cuadro infeccioso. A este grupo de sueros se les realizó pruebas de inhibición de la hemaglutinación, microneutralización y RT-PCR, resultando positivas al contagio con influenza A H1N1.
- MUESTRAS DE INDIVIDUOS SIN SÍNTOMAS: Grupo de muestras de habitantes del D.F. que participaron en el estudio donando suero y mediante un cuestionario manifestaron no haber presentado ningún síntoma típico del contagio con Influenza A H1N1.
- MUESTRAS DE INDIVIDUOS CON SÍNTOMAS: Grupo de muestras de habitantes del D.F. que participaron en el estudio donando suero y mediante un cuestionario manifestaron presentar todos los síntomas típicos del contagio con Influenza A H1N1.

6.2 Selección de los péptidos inmunogénicos del virus de influenza A H1N1

Se usó el programa "Batch Entrez" para acceder a las secuencias reportadas de aminoácidos de los péptidos HA y NA del virus A H1N1 (Anexos 1 y 2); la predicción de antigenicidad se hizo con el método de Kolaskar y Tongaonkar, encontrando veinticuatro para HA y diecinueve para NA (Anexos 3 y 4).

Los péptidos secuenciados fueron sintetizados por Invitrogen (Anexo 5), los cuales fueron enfrentados a grupos de sueros de individuos negativos y positivos al contagio con virus de influenza, encontrando que los péptidos sintéticos HA15-FM y NA15-FM presentaron una mejor respuesta y diferencia estadística entre los grupos comparados.

6.3 Metodología del ELISA

- a. Activar de la placa de ELISA. Se utilizaron placas Pierce® de 96 pozos con Ácido Meleíco de Thermo Scientific. Se realiza una serie de tres lavados con buffer de fosfatos salino pH 7.2 con Tween diluido al 1% (PBS-tw 0.1%) durante cinco minutos en agitación.
- b. Sensibilizar la placa. Se forran los pozos con una dilución del péptido a una concentración 10µg/mL, se incuban durante toda la noche en refrigeración a 4°C. Se utilizaron péptidos recombinantes HA15-FM y NA15-FM.
- c. Bloquear de la placa. Se utiliza una solución de bloqueo SuperBlock Blocking® Buffer en PBS de Thermo scientific, incubando durante una hora a temperatura ambiente. Se realiza nuevamente la serie de tres lavados con PBS-tw 0.1% durante cinco minutos en agitación.
- d. Adicionar los sueros problema, los cuales previamente fueron titulados a diferentes diluciones en PBS-tw 0.3% para determinar la dilución óptima de trabajo, la cual es 1:100. Se incuban durante dos horas a temperatura ambiente.
- e. Realizar el lavado de placas: dos lavados rápidos con PBS-tw 0.3%, dos lavados más con PBS-tw 0.3% de cinco minutos en agitación y uno más con PBS-tw 0.1% en agitación por cinco minutos.
- f. Adicionar del conjugado anti IgG humano acoplado a peroxidasa. Se evaluaron conjugados comerciales de diferentes marcas y lotes, éstos fueron diluidos a diferentes concentraciones en PBS-tw 0.1% para seleccionar el conjugado y dilución que serán empleados en el ensayo.
Se trabajaron tres conjugados de anticuerpos de cabra IgG acoplada a peroxidasa de rábano, anti IgG humana (HRP- Goat Anti-Human) de Zymed® y dos lotes distintos de la marca Invitrogen®. Para el conjugado de Zymed®, se trabajó a una dilución 1:4000 con ambos péptidos. El primer lote de conjugado de Invitrogen® se trabajó a una dilución óptima encontrada para ambos péptidos de 1:30000. Para el segundo lote se encontró que el mejor comportamiento y diferenciación entre los grupos de trabajo se presenta con el conjugado diluido 1:6000 en el caso de NA15-FM; y 1:8000 en el caso de HA15-FM. Siendo este conjugado y diluciones los empleados en el estudio epidemiológico.
- g. Incubar durante dos horas a temperatura ambiente. Realizar los lavados del paso a.
- h. Agregar el sustrato o-fenilendiamina de Sigma®, se incuban en la oscuridad durante cinco minutos, se observa el desarrollo de un color amarillo-naranja.
- i. Detener la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 2 N. Leer absorbencia en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 490 nm.

6.4 Detección de anticuerpos IgG contra el virus de la influenza en la población

- a. Se aplicó la prueba desarrollada para realizar la determinación de anticuerpos IgG en una muestra poblacional del Distrito Federal. Las muestras corresponden al banco de sueros que se tienen en el laboratorio de Inmunomodulación y agentes patógenos, en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, CU, UNAM y forman parte del “Estudio seroepidemiológico de la nueva influenza humana en la Ciudad de México”, aprobado por las Comisiones de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina, según oficio FMED/CI/GRD/025/2009 y financiado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal como proyecto No. PICDS 109-249. Para el estudio se utilizó un diseño epidemiológico transversal analítico. El universo de estudios son los habitantes de las delegaciones Coyoacán, Gustavo A. Madero, y Magdalena Contreras del Distrito Federal, en el estudio se excluyeron a los individuos menores de 14 años, así como mujeres embarazadas. Para definir el tamaño de muestra se consideró la proporción más alta del comportamiento de una influenza estacional⁽²⁶⁾ que va del 10 al 20%, con una precisión del 0.02 a un nivel de confianza de 0.95; en total, el tamaño de la muestra fue de 1537 individuos, más una tasa de no respuesta del 10% (153 individuos).
- b. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente y correlacionados con el cuestionario que se desarrolló y aplicó a los voluntarios para obtener información epidemiológica, datos demográficos, hábitos higiénicos y alimenticios y nivel socio-económico, para definir la existencia de factores de riesgo asociados a la influenza; el programa utilizado fue IBM®SPSS® Statistics 21.

7. RESULTADOS

7.1 Estandarización del ELISA

En el presente trabajo se desarrolló un ELISA para la determinación de anticuerpos contra el virus de influenza A H1N1 causante de la pandemia de 2009. El inmunoensayo se basó en el uso de péptidos sintéticos correspondientes a la secuencia maestra de aminoácidos circulante y reportada en México.

En la figura 5 se observa un diagrama de cajas en el cual se puede notar la diferencia de lecturas entre las medianas de cada grupo de muestras usando el péptido NA15-FM a una concentración de 10µg/ml y diluyendo el conjugado 1:6000. Se espera que el grupo de población sin síntomas sea el que presente mayores densidades ópticas y por esta razón no se enfermaron.

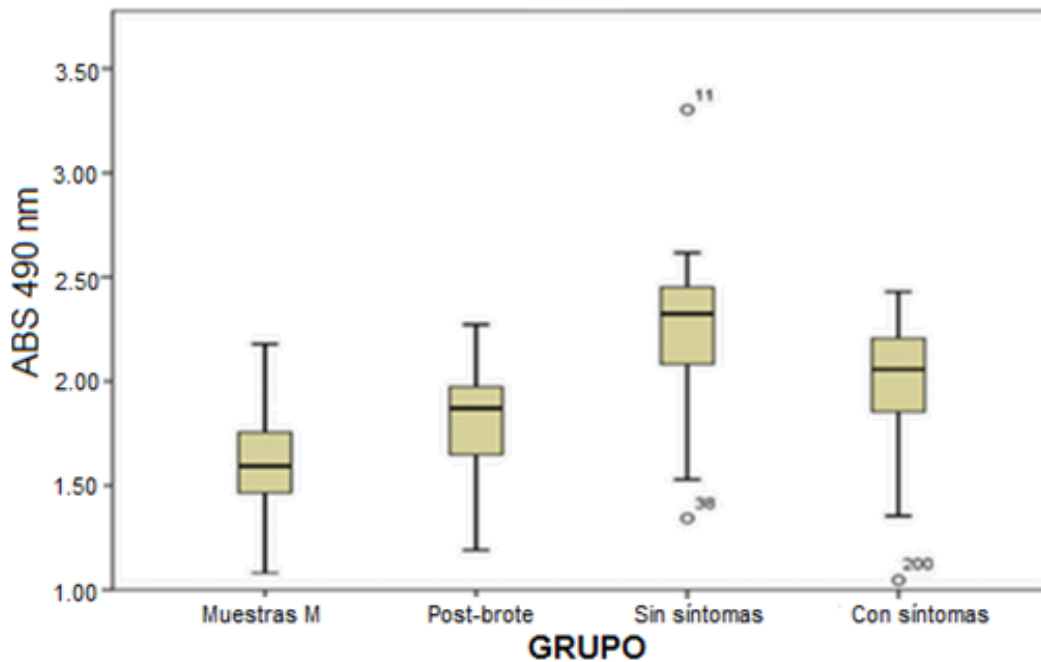


Figura 5. Valores de absorbancia obtenidos en el ELISA para determinación de anticuerpos IgG contra el virus de influenza en muestras de suero. (Péptido utilizado: NA15-FM y conjugado IgG de cabra anti IgG humana de Invitrogen® diluido 1:6000)

Se realizó el análisis estadístico de los resultados anteriores mediante ANOVA y t de Dunnett, para verificar la diferencia significativa entre cada uno de los grupos. Los resultados de los análisis estadísticos se pueden observar en los cuadros 5 y 6, donde se encontraron diferencias significativas con el conjugado diluido 1:6000 con una significancia menor a 0.05.

Cuadro 5. Resultados del análisis estadístico por ANOVA inter e intra grupos cuando se utilizó el péptido NA15-FM y el conjugado diluido 1:6000.

ANOVA de un factor

DO

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	14.852	3	4.951	72.490	.000
Intra-grupos	14.820	217	.068		
Total	29.672	220			

Cuadro 6. Resultados del análisis estadístico t de Dunnett entre los grupos, cuando se utilizó el péptido NA15-FM y el conjugado diluido 1:6000.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: DO
t de Dunnett (bilateral)^a

(I) GRUPO	(J) GRUPO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
POST BROTE	Ms	.2769600 [*]	.0553344	.000	.146057	.407863
SIN SINTOMAS	Ms	.6849368 [*]	.0476342	.000	.572250	.797624
CON SINTOMAS	Ms	.4536205 [*]	.0488290	.000	.338107	.569134

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

La figura 6 muestra el diagrama de cajas que se realizó al correr los distintos grupos de muestras enfrentando el péptido HA15-FM a una concentración de 10µg/ml y el conjugado a una dilución 1:8000. Nuevamente se espera que la mediana del grupo sin síntomas sea mayor a los demás grupos.

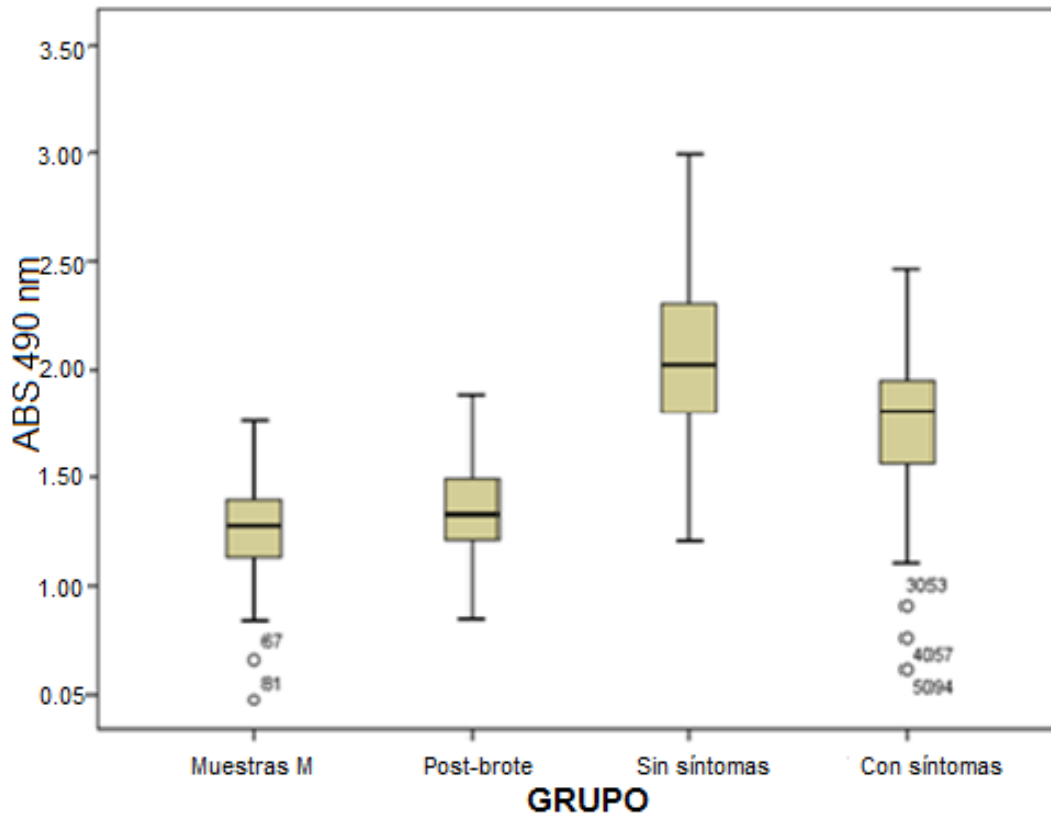


Figura 6. Valores de absorbencia obtenidos en el ELISA para determinación de anticuerpos IgG contra el virus de influenza en muestras de suero. (Péptido utilizado: HA15-FM. Conjugado IgG de cabra anti IgG humana de Invitrogen® diluido 1:8000)

El cuadro 7 muestra el análisis ANOVA para el péptido HA15-FM, donde se observa una diferencia significativa usando el conjugado a una dilución 1:8000; el nivel de significancia a un nivel de confianza del 95% es <0.001 , lo cual nos indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos en general.

Para verificar la significancia anterior se hizo un análisis t de Dunnett de comparaciones múltiples, el resultado puede observarse en el cuadro 8, en el cual nuevamente se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los grupos comparados con las muestras negativas (Ms), pues las significancias son <0.05 .

Cuadro 7. Resultados del análisis estadístico por ANOVA inter e intra grupos cuando se utilizó el péptido HA15-FM y el conjugado diluido 1:8000.

ANOVA de un factor

DO

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	23.556	3	7.852	77.758	.000
Intra-grupos	22.316	221	.101		
Total	45.872	224			

Cuadro 8. Resultados del análisis estadístico t de Dunnett entre los grupos, cuando se utilizó el péptido HA15-FM y el conjugado diluido 1:8000.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: DO
t de Dunnett (bilateral)^a

(I) GRUPO	(J) GRUPO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
muestras post brote	muestras ms	.144222	.057451	.034	.00838	.28007
muestras sin síntomas	muestras ms	.379125	.048844	.000	.26363	.49462
muestras con síntomas	muestras ms	.202296	.050697	.000	.08242	.32217

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Con base en los resultados anteriores se estandarizó el uso del conjugado, se concluyó que bajo estas condiciones se trabajarían las muestras del estudio epidemiológico. Los análisis estadísticos con el conjugado de Zymed y el primer lote de IgG de cabra anti IgG humana de Invitrogen® no fueron estadísticamente significativos.

7.2 Resultados epidemiológicos.

Se analizaron 1537 muestras de suero tomadas al azar del total de muestras obtenidas de la población de habitantes del Distrito Federal, de las cuales se descartaron 11 debido a que no presentaban información completa en el cuestionario realizado, resultando un total de 1526 muestras analizadas.

7.2.1 Datos poblacionales

De los 1526 voluntarios, el 38.1% eran hombres y el resto mujeres (61.9%). La edad promedio del grupo es de 46 años con una desviación estándar de 16 años.

De acuerdo al Índice de Masa Corporal⁽²⁷⁾ (IMC) calculado, se observó que gran parte de la población estudiada tenía problemas asociados con su peso: el 42% tenía sobrepeso y el 28% obesidad. Sólo 40% de los encuestados dijeron realizar alguna actividad física regularmente. El 30.1% de los voluntarios eran fumadores.

El 33.5% dijo tener alguna enfermedad como asma (1.2%), diabetes (10%), hipertensión (16.5%), cáncer (0.5%), enfisema (0.1%) o alergias (3.4%). El 21.5% se vacunó contra la influenza en el periodo 2008-2009.

El 57% de los encuestados dijeron no tener ningún síntoma relacionado con la influenza mientras que 4.1% mencionó que sí presentó los seis síntomas característicos (tos, dolor muscular, escurrimiento nasal, dificultad para respirar, dolor en garganta y temperatura mayor a 38°C).

El 27.8% de los individuos refirió haber estado cerca de una persona con síntomas característicos de influenza, en el 2009.

En cuanto a los datos socioeconómicos, la mayoría de los voluntarios se dedicaban al trabajo en casa (40.2%), seguido por obreros (11.7%), empleados (10.5%) y comerciantes (10.1%). El medio de transporte más usado por los encuestados fue el transporte público (77.5%). Respecto a otros factores que indican el nivel socioeconómico, el 99.9% de los encuestados coincidieron en el mismo estatus.

La frecuencia de voluntarios positivos al péptido NA15-FM fue de 9.5%, es decir presentaron un valor de anticuerpos IgG mayor al Punto de Corte (PC) calculado; mientras que para HA15-FM fue 8.8%. El punto de corte (PC) se calculó con la media de las muestras negativas más dos desviaciones estándar, siendo de 2.23 para NA15-FM y 2.18 para HA15-FM. (Cuadro 9).

Cuadro 9. Resultados de positividad en la muestra de población analizada del Distrito Federal. (n= 1526)

Péptido	PC	No. Muestras positivas	% positividad
NA15-FM	2.23	146	9.5
HA15-FM	2.18	135	8.8

7.2.2 Factores de Riesgo asociados a A H1N1

Para calcular los factores de riesgo asociados a la positividad a los péptidos, se empleó el método estadístico Razón de Momios con una significancia estadística de $p < 0.05$, los factores de riesgo asociados al grupo de personas positivas al péptido NA15-FM son individuos enfermos de asma (RM=2.81), personas que manifestaron los seis síntomas característicos de influenza (RM=2.68), población con problemas de sobrepeso y obesidad (RM=1.72) y voluntarios que dijeron estar cerca de personas con síntomas de influenza en 2009 (RM=1.40); además de que la presencia de anticuerpos se encontró estrechamente relacionada con la edad (Cuadros 10 y 11).

En cuanto al péptido HA15-FM, se llevó a cabo el mismo análisis estadístico utilizando la Razón de Momios con una significancia estadística de $p < 0.05$, no se encontraron asociaciones significativamente estadísticas con ninguno de los factores estudiados.

Cuadro 10. Factores de riesgo (RM) asociados a personas positivas al péptido NA15-FM.

Factor	RM	p*
Asma	2.81	0.01
Síntomas de influenza	2.68	<0.01
Sobrepeso y obesidad	1.72	0.02
Cerca de personas con síntomas	1.40	0.04

*Cuando $p < 0.05$ existe significancia estadística

Cuadro 11. Comparación de individuos positivos a anticuerpos IgG en suero contra A H1N1 por grupos de edad.

Edad (años)	Cantidad de positivos (n positivos/n grupo de edad)	% de positivos	RM (vs. Grupo >71 años)
14 a 20	6/81	7.40	2.06
21 a 30	13/206	6.31	2.42
31 a 40	27/309	8.73	1.75
41 a 50	25/306	8.16	1.87
51 a 60	32/274	11.67	1.31*
61 a 70	22/211	10.42	1.47*
Mayores a 71	21/137	15.32	

*RM no significativo estadísticamente.

El RM es la Razón de Momios y se interpreta de la siguiente manera: RM=2.06 significa que existe dos veces más riesgo de tener anticuerpos IgG contra NA15-FM cuando son individuos mayores a 71 años comparado con personas entre 14 a 20 años de edad.

8. DISCUSIÓN

8.1 Selección de péptidos

En la actualidad, existen distintas herramientas que nos permiten predecir la antigenicidad de péptidos secuenciados; a pesar de que no hay método infalible para dicha predicción, existen algunas reglas generales que se pueden seguir para determinar cuáles son los fragmentos peptídicos de una proteína que es probable que sean antigénicos. Estas reglas también se aplican para aumentar las probabilidades de que un anticuerpo reconozca una proteína nativa:

1. Los péptidos antigénicos deben estar situados en regiones accesibles al disolvente y contener tanto los residuos hidrófobos e hidrófilos.
2. Preferiblemente seleccionar péptidos localizados en estructuras secundarias con formas de largos bucles, evitando péptidos localizados en regiones helicoidales. Esto aumentará las probabilidades de que el anticuerpo reconozca la proteína nativa.
3. Cuando sea posible, elegir péptidos que se encuentran en la región N- y C- de la proteína, debido a que estas regiones suelen ser accesibles al disolvente
4. Para las glicoproteínas de superficie celular, eliminar los péptidos iniciales que contienen sitios de N-glicosilación.⁽²⁷⁾

Existen varios métodos basados en diversas propiedades físico-químicas (flexibilidad, hidrofobicidad, accesibilidad) de epítomos determinados experimentalmente para la predicción de los determinantes antigénicos. Tal vez el método más simple para la predicción de los determinantes antigénicos que es de Kolaskar y Tongaonkar (1990)⁽²⁸⁾. Éste método utiliza una serie de algoritmos que relaciona la hidrofobicidad, accesibilidad y flexibilidad de los sitios con C- y N- terminal en los residuos de aminoácidos de los péptidos determinados experimentalmente. Bajo dicha predicción, fue posible conocer los péptidos a sintetizar y su potencial de antigenicidad.

Una vez sintetizados, los péptidos se enfrentaron a muestras de suero positivas y negativas al virus de influenza, encontrando que HA15-FM y NA15-FM presentaban una mejor diferenciación entre los grupos poblacionales.

8.2 Datos poblacionales

Para la realización de este trabajo, se aplicó un cuestionario a los 1526 voluntarios que participaron en el estudio, mediante el cual fue posible conocer las características y frecuencias de la muestra de habitantes del Distrito Federal, a continuación sólo se mencionarán los datos más relevantes para el presente estudio.

Como primer dato encontramos que la mayoría de los voluntarios son mujeres (61.9%), según el reporte de INEGI para el D.F. en 2010,⁽²⁹⁾ más de la mitad de la población son mujeres, (52.2% mujeres, y 47.8% hombres) recordemos que los voluntarios fueron encuestados en sus hogares, por lo que es más probable que, debido a cuestiones sociales y costumbres, la persona que se encuentre en casa sea de sexo femenino.

En cuanto a la edad, los participantes se encontraban en un rango de 14 a 89 años de edad, como se observa en el cuadro 9. La mayoría de nuestra población en estudio se encuentra en edad laboral productiva, es decir entre 31 a 50 años.

Cuadro 12. Frecuencia de edades de la población en estudio.

Edad (años)	% de la población
14 a 20	5.3
21 a 30	13.5
31 a 40	20.3
41 a 50	20.1
51 a 60	18.0
61 a 70	13.8
71 a 89	9.0

En cuanto al estado de salud de los participantes, como primer dato encontramos que el 70% de los encuestados, tiene problemas relacionados con el peso: 42% se encontró con sobrepeso y 28% con obesidad, estos datos se obtuvieron calculando el IMC⁽²⁶⁾ de acuerdo a las cifras de peso y estatura proporcionadas por los encuestados. Nuevamente nuestros resultados correlacionan con los reportados en la bibliografía (39.9% sobrepeso y 33.9% obesidad).⁽³⁰⁾

En cuanto a la fracción de población que reportó tener alguna enfermedad, (33.5%) se encontró que las enfermedades más frecuentes son hipertensión (16.5%) y diabetes (10%), nuevamente enfermedades altamente relacionadas al sobrepeso, recordemos que en la población existe renuencia a realizarse chequeos médicos y por lo tanto a contar con un diagnóstico veraz y oportuno, por lo que los datos referidos pueden ser menores a los que realmente prevalecen en nuestra entidad.

Lo descrito anteriormente, significa una alerta a la población en general y a las autoridades sanitarias, pues el problema ha ido creciendo con el paso del tiempo, significando un bajo nivel de salud en la población en general y su consecuente derrama económica por parte de la población y sistemas de salud en nuestro país.

Aunado a este dato, se encontró que sólo el 40% de los encuestados dijeron realizar alguna actividad física regularmente, hecho que es bien sabido conlleva a agravar las cifras de obesidad reportadas en nuestra población.

Respecto a otras enfermedades, 3.4% de los encuestados dijo sufrir alergias, 0.5% cáncer y 0.1% enfisema, es esperado que no se haya encontrado algún factor de riesgo en estos grupos, pues, aunado a que son porcentajes muy pequeños estadísticamente hablando, se trata de personas que están realizando actividades diarias, en sus hogares, es decir, al momento de la encuesta se encuentran estables a su enfermedad.

Los datos socioeconómicos arrojaron que 40.2% de los encuestados se dedicaban al trabajo en el hogar, recordemos nuevamente, que este estudio se realizó en las casas habitación, por lo que es más probable que una gran parte de los encuestados sean amas de casa. Es esperado que en cuanto a otros indicadores socioeconómicos cómo tipo de suelo de casa, si cuentan con drenaje, luz, agua, etc., el 99.9% de los encuestados coincidan, pues el estudio se realizó en calles y colonias vecinas del Distrito Federal.

8.3 Factores de Riesgo asociados a A H1N1

El método estadístico de Razón de Momios es una medida de asociación epidemiológica que es usada en los estudios de tipo transversal, ya que nos permite trabajar con las prevalencias dentro de la población estudiada para conocer la relación existente entre algún factor de riesgo y el daño o enfermedad en estudio. En términos formales, se define como la posibilidad de que una condición de salud o enfermedad se presente en un grupo de población frente al riesgo de que ocurra en otro. En epidemiología, la comparación suele realizarse entre grupos humanos que presentan condiciones de vida similares, con la diferencia de que uno se encuentra expuesto a un factor de riesgo, mientras que el otro carece de esta característica ⁽³²⁾. Por lo descrito anteriormente se utilizó el método Razón de Momios, pues el presente estudio busca la prevalencia de anticuerpos IgG anti HA15-FM y NA15-FM en una muestra de la población del Distrito Federal, durante un periodo de tiempo bien delimitado (6 meses después del brote epidemiológico), y se analizaron distintos factores de riesgo que estuvieran asociados a que los individuos cuenten con dichos anticuerpos.

Como mencionamos anteriormente, en el virus de la influenza, las proteínas de superficie del virus, HA y NA, además de reconocer receptores específicos en las células respiratorias humanas, son los principales antígenos que desencadenan la respuesta inmune humoral.

En general, la inmunidad inducida por hemaglutinina aumenta la resistencia del hospedero a la influenza, reduciendo la probabilidad de infección; las glicoproteínas HA son las responsables de la penetración del virus al hospedero, por lo que el sistema inmune se ha visto constantemente expuesto a este tipo de proteínas, entonces es esperado que los individuos cuenten con una amplia capacidad de respuesta de sus anticuerpos contra los virus de influenza.

Las neuraminidasas son normalmente utilizadas como determinantes antigénicas encontradas en la superficie del virus de la influenza. Existe evidencia que los anticuerpos contra la neuraminidasa, si bien no prevén infección, podrían disminuir la severidad de la misma.

Debido a esto, es esperado que la respuesta contra HA15-FM en nuestra población sea muy amplia. Además, como hemos visto puede existir la inmunidad cruzada contra variantes virales divergentes, lo que resulta en una respuesta inmune más robusta.

8.3.1 Edad

Recordemos que la influenza A H1N1 afecta por igual a hombres y mujeres y se ha presentado en todos los grupos de edad, sin embargo, más del 50% de los casos se encuentran entre los 10 a 50 años.

De acuerdo al estudio de casos sospechosos en La Gloria (una población de Veracruz, México), que tuvo una epidemia temprana que afectó a la tercera parte de la población, la incidencia fue mayor en menores de un año (61% de la población afectada) y en niños de uno a cuatro años (48%). Curiosamente tanto la cantidad total de casos reportados independientemente de la gravedad del cuadro, como la tasa de ataque en mayores de 65 años, es menor que en el resto de los grupos etarios. En este sector de la población, se encontraron anticuerpos contra influenza que cruzaban con A H1N1 en la tercera parte de las personas, probablemente por exposición al virus A H1N1 (similar al actual) en circulación antes de 1957 lo que pudiera explicar la pobre afectación en este grupo de edad ⁽³¹⁾. Estos resultados coinciden a los arrojados por el presente estudio, pues encontramos que la población mayor a 50 años contaba con un porcentaje de positividad a anticuerpos mayor al resto de la población. (Cuadro 11)

El estudio de Lemaitre M. y colaboradores (2011)⁽³³⁾ en Francia, encontraron que los títulos de anticuerpos elevados contra H1N1-2009 se asociaron con temporada de influenza 2007-2008, presentando una protección cruzada, de la misma manera reportan que la edad es un factor que puede haber contribuido de forma independiente a la inesperadamente baja morbilidad y mortalidad de la pandemia H1N1.

Datos como los citados anteriormente sugieren que la población ya contaba con anticuerpos que “reconocían” al virus de la influenza, particularmente el grupo de adultos mayores, lo que correlaciona con que la mayoría de población infectada por el virus A H1N1 fueran niños o jóvenes.

Como podemos observar en el cuadro 11, la frecuencia de personas con anticuerpos contra AH1N1 aumenta con la edad, y es estadísticamente significativo en personas de 50 años o menos lo que corrobora datos publicados con anterioridad.

Los virus de influenza se encuentran circulando constantemente entre la población mundial, recordemos que la pandemia de la “influenza española” circuló cuarenta años a partir de 1918, periodo que coincide con la edad de nuestros grupos con mayor positividad.

Respecto a la dispersión del virus A H1N1 (2009), se ha observado un comportamiento similar al descrito para la pandemia de 1918, particularmente en lo que concierne a los siguientes puntos: en ambas epidemias el rango de edad más afectado fue y ha sido la población joven (15 a 50 años de edad) y uno de los grupos con mayor riesgo de desarrollar formas graves de la enfermedad son las mujeres embarazadas. Con respecto al tiempo de diseminación, el virus de 1918 tardó aproximadamente un año en dar la vuelta al mundo, comparado con la cepa actual la cual se dispersó en un periodo de cuatro meses; esta velocidad de propagación se explica entre otras razones por la gran eficiencia de nuestras comunicaciones y transportes, situación que no se vivía durante la segunda década del siglo XX ⁽³⁴⁾.

El grupo de trabajo del Dr. Kawaoka,⁽³⁵⁾ quien coordinó al equipo responsable de reconstruir el virus H1N1 causante de la pandemia de 1918, realizó el primer estudio sobre la patogenicidad del nuevo virus reportando que la nueva variante está antigénicamente relacionada con los virus circulantes en 1918, ya que el suero de individuos sobrevivientes a esta pandemia, presentan títulos altos de anticuerpos neutralizantes para ambos virus.

Aunado a esto se reportó que en Norteamérica, el virus clásico porcino H1N1 circula cuando menos desde 1930, cuando se le detectó por primera vez. En 1998 se reportó en los Estados Unidos la presencia de virus rearrreglados cuyo genoma tenía genes provenientes de tres diferentes orígenes: de cepas aviares que circulan en las aves acuáticas de ese país, del virus clásico H1N1 de porcinos y del virus estacional humano H3N2 ⁽³¹⁾.

Si bien en esta época no se reportaba la infección en humanos, no descartamos la posibilidad de que los humanos nos enfrentáramos con este virus, siendo reconocido por nuestro sistema inmune pero sin ser capaz de desarrollar aun una infección en el organismo.

De esta manera, podemos sugerir que los anticuerpos IgG cuantificados son anticuerpos de tipo protector, que se adquieren a lo largo de la vida del individuo y que infecciones o inmunizaciones previas promueven la presencia de estos anticuerpos. Este hecho podría ser una explicación más de porqué la mayor parte de la población infectada fueran personas jóvenes, en edad productiva y niños.

8.3.2 Asma

La mayoría de los pacientes infectados por el virus A H1N1 presentaron síntomas leves y se recuperaron totalmente después de una semana, incluso si no recibieron tratamiento médico. En el caso de la pandemia de influenza de 2009, se identificaron diferentes grupos con riesgo de padecerla y sufrir complicaciones, destacando el grupo de las mujeres embarazadas, también pacientes con patologías concomitantes como diabetes, enfermedades pulmonares crónicas (principalmente asma), enfermos con inmunosupresión y personas con obesidad mórbida.

Adicionalmente, un número de personas por lo demás sanas, generalmente menores de 50 años, sufrieron una gripe que se agravó rápidamente y a menudo podía causar la muerte ⁽³¹⁾.

En el presente estudio encontramos como primer grupo de riesgo a las personas que dijeron padecer asma, corroborando nuevamente datos descritos con anterioridad. El asma es una enfermedad inflamatoria crónica, en la que se produce una contracción excesiva del músculo liso de las vías aéreas, que resulta ser anormalmente reactivo a los estímulos externos. El hecho patológico que subyace en la mayoría de los casos de asma es la inflamación crónica de las paredes de la vía aérea. La causa mejor definida y más frecuente de esta inflamación es la inhalación de alérgenos. El hecho de que los pulmones de los asmáticos puedan responder a estímulos por otra parte triviales, como el aire frío, se conoce como hiperreactividad bronquial. Cuando una persona con asma sufre de alguna enfermedad del aparato respiratorio, su sistema no es capaz de expulsar las secreciones pulmonares, lo que promueve la formación de un ambiente propicio para el desarrollo y proliferación viral ⁽³⁶⁾.

Como mencionamos anteriormente, el virus H1N1 se aloja en las células con receptores de ácido siálico α -2,3; presentes en las células de la parte baja del aparato respiratorio; en personas sanas, el sistema inmune puede impedir que el virus llegue a sus células blanco evitando así la infección, sin embargo, en individuos con enfermedades crónicas como asma, el sistema se encuentra expuesto a diversos patógenos, siendo más probable desarrollar la enfermedad.

El estudio realizado por John J. McKenna y colaboradores (2009), ⁽³⁷⁾ encontró que entre los pacientes hospitalizados con infección por el virus A H1N1, el asma fue la enfermedad subyacente más común, pues de los niños menores de 18 años de edad hospitalizados por influenza estacional de 2003 a 2008, el 18% tenía asma, y en los adultos de 18 a 49 años, 27% tenía ésta enfermedad. Aunque la mayoría de los pacientes con asma tenían un curso sin complicaciones de la enfermedad, llegó a presentarse en forma grave incluyendo el ingreso a cuidados intensivos y la muerte, sobre todo en los pacientes que tenían neumonía al ingreso. Además, durante la pandemia de 2009, se ha reportado al asma como una de las condiciones médicas subyacentes más comunes entre los pacientes hospitalizados con infección A H1N1 en los EUA y en todo el mundo.

Este estudio también sugiere que la terapia antiviral temprana puede reducir complicaciones asociadas con la influenza y debe iniciarse tan pronto como sea posible en todos los pacientes hospitalizados y en pacientes ambulatorios con condiciones de alto riesgo, como las personas con asma.

En un análisis mundial conjunto, buscando los factores de riesgo para los resultados graves después de la infección con influenza, el asma se asoció con hospitalización y muerte, pero entre los pacientes que fueron hospitalizados, las personas con asma sobrevivieron en comparación con pacientes con otras condiciones ⁽³⁸⁾.

Debido a la inflamación crónica e hiperreactividad presentada en esta enfermedad, es esperada la presencia de anticuerpos IgG elevados en el organismo de los asmáticos, el trabajo de Herman J. Bueving⁽³⁹⁾, acerca de vacunación contra influenza en una población de niños con asma, buscaba la respuesta de anticuerpos tipo IgA, y paralelamente encontró que el grupo vacunado tenía niveles de IgG notablemente más altos que los no vacunados.

8.3.3 Síntomas característicos de influenza AH1N1

El siguiente grupo de estudio que se encontró con riesgo de tener anticuerpos contra NA15-FM son las personas que dijeron haber tenido los seis síntomas característicos de influenza (tos, dolor muscular, escurrimiento nasal, dificultad para respirar, dolor en garganta y temperatura mayor a 38°C) durante 2009 (4.1%) con una RM de 2.68. El título elevado en una sola muestra de suero, en el contexto de una enfermedad clínica compatible, durante el periodo de un brote o una epidemia, representa evidencia presuntiva de infección,⁽³¹⁾ lo que nos hace sugerir que éste grupo son personas estuvieron que expuestas al virus H1N1 y manifestaron un cuadro clínico leve.

El diagnóstico serológico definitivo de influenza requiere la demostración de títulos incrementados de anticuerpos en muestras pareadas tanto en fase aguda como en fase de convalecencia. Aunque una muestra por sí sola no podría proporcionar evidencia concluyente en apoyo al diagnóstico confirmatorio, cuando se toma después de dos semanas del inicio de los síntomas, podría resultar útil para detectar anticuerpos contra el virus de influenza ⁽⁴⁰⁾.

Los estudios experimentales de influenza en humanos dan una idea clara de las diferentes sintomatologías de esta enfermedad. Con dosis estandarizadas de virus, un pequeño porcentaje de los voluntarios (<10%) no desarrolla infección. Otro pequeño grupo (10%) presenta infecciones asintomáticas con posibilidad limitada de excretar virus, pero en realidad poco relevante para la transmisión de la influenza. En los enfermos sintomáticos, con variadas manifestaciones respiratorias, sólo una minoría desarrolla el típico síndrome de influenza con fiebre (<10%). En general a mayor dosis del inóculo, mayor generación de síntomas ⁽⁴¹⁾.

Recordemos que en nuestro estudio la población estudiada son personas consideradas sanas, hecho que no llevó a un resultado grave o fatal. Si además de lo mencionado tomamos en cuenta los resultados que arrojan que la población ya contaba con protección inmune de un virus similar, esto disminuye aún más el hecho de que nuestra población desarrollara una enfermedad con complicaciones mayores.

De la misma manera, el grupo de personas que dijo estar cerca de una persona que manifestaba síntomas de influenza, presentan riesgo un poco mayor a tener anticuerpos que las personas que dijeron no estarlo (RM=1.4), nuevamente, mencionemos que la población en estudio ya reconocía a nuestro patógeno, lo que disminuye el valor de RM, además durante la pandemia se promovió el seguir medidas de seguridad para evitar el contagio, disminuyendo la cantidad de exposición y de esta manera existe menor probabilidad de presentar la enfermedad, pero no se descarta que este grupo de personas haya tenido un “enfrentamiento” con un inóculo muy pequeño del virus, lo que desencadenó la respuesta inmune y la producción de los anticuerpos IgG contra NA15-FM.

8.3.4 Sobrepeso y obesidad.

Por último el grupo de personas con sobrepeso y obesidad, que como mencionamos anteriormente se trata de un preocupante 70% del total de nuestra población, también tiene un alto riesgo de tener anticuerpos contra A H1N1 presentando una RM= 1.72, en comparación con el resto de la población.

La obesidad no era considerada un factor de riesgo asociado con consecuencias graves para la infección con influenza estacional ⁽⁴²⁾. Sin embargo a partir del brote de la epidemia de influenza AH1N1, se ha descrito en diversos trabajos a nivel mundial que la obesidad es un factor predisponente para presentar la enfermedad.

Citando el trabajo de Van, Kerkhove y colaboradores (2011)⁽³⁸⁾ cuyo objetivo era buscar factores de riesgo asociados con la presentación grave de la enfermedad, hospitalización y/o muerte de los pacientes, encontraron una RM de 2.9 (IC 95%) para la población obesa en comparación con la población en general. Así mismo observaron que el riesgo de muerte aumentaba asociado con obesidad mórbida. Cabe mencionar que estos datos no se comportaron de la misma forma en todos los países, por ejemplo en Francia, Tailandia y China se observaron proporciones similares de pacientes obesos hospitalizados y casos fatales.

También se ha reportado en niños coreanos, que la infección con A H1N1 tiene una alta asociación con el índice de masa corporal, la población infectada con un IMC normal fue de 4%, mientras los obesos fueron 7.9%; incluso se menciona que es aún mayor el riesgo de niños que presentan una circunferencia abdominal mayor (9.3% contra 4.3% de los niños con circunferencia abdominal normal) ⁽⁴²⁾.

Estudios en Australia también han demostrado que los pacientes obesos y con obesidad mórbida que presentaban una infección severa, tenían más probabilidades de desarrollar neumonía en comparación con los pacientes no obesos, pero las tasas de mortalidad no aumentaron ⁽⁴³⁾.

La obesidad es un factor predisponente para ciertas enfermedades crónicas como la diabetes mellitus y afectaciones cardíacas, que también han sido reportadas en la bibliografía como factores de riesgo para desarrollar la enfermedad del virus de influenza A H1N1 ^(31, 37). Por ejemplo, un estudio en pacientes en España por A H1N1, concluye que la población hospitalizada con diabetes fue mayor que la población en general, encontrando que los pacientes con condiciones como la obesidad presentan un mayor riesgo de morir a causa de la infección viral, aún mayor que los diabéticos en sí ⁽⁴⁴⁾.

Actualmente se estudia en seres humanos y modelos animales la relación de la obesidad con el sistema inmune, recientemente se ha demostrado que en la obesidad existen modificaciones en vías metabólicas y de señalización, así como inflamación excesiva, lo que podría afectar la respuesta inmune ⁽⁴⁵⁾.

9. CONCLUSIONES

- Es posible desarrollar un ELISA usando péptidos sintéticos de moléculas virales, disminuyendo los riesgos y tiempos de trabajo empleados en la investigación
- Los péptidos NA15-FM y HA15-FM del virus A H1N1 pueden utilizarse en sistemas de ELISA para llevar a cabo la determinación de anticuerpos tipo IgG en sueros humanos, obteniendo resultados estadísticamente confiables.
- El 9% de la población de las delegaciones Coyoacán, Gustavo A. Madero y Magdalena Contreras, cuenta con anticuerpos IgG contra el virus AH1N1, lo que indica que en algún momento de sus vidas tuvieron contacto directo con el virus.
- Parte de la población (mayores a 50 años) contaba con protección inmune al momento de la pandemia, lo que disminuyó en gran medida las consecuencias de la pandemia.
- Los factores de riesgo asociados a A H1N1 encontrados en la población analizada del Distrito Federal se encontraron en personas mayores de 50 años (enfaticándose en mayores de 71 años), enfermas de asma, con sobrepeso, y que presentaron los síntomas característicos de la influenza o que estuvieron cerca de una persona con los síntomas.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Franco, P.C., Rodríguez M.A., Santos P.J. (2006) Aspectos clínicos y epidemiológicos de la influenza. CIMEL. Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana. 11(1): 27-34.
2. Ayora G. (1999) Influenza: Historia de una enfermedad. Rev. Biomed. 10: 57-61.
3. Osores F., Gómez J., Suárez L., et al. (2009) Un nuevo virus AH1N1, nueva pandemia: Influenza un riesgo permanente para una humanidad globalizada. Acta Med Per. 26(2): 97-130.
4. Yi G., Dhanasekaran V., Justin B., et al. (2010) The emergence of pandemic influenza viruses. Protein & Cell. 1(1): 9-13.
5. Modificado de WHO Global Influenza Programme. Pandemic influenza preparedness and response: a WHO guidance document. World Health Organization, 2009
6. CDC, Centers for Disease Control and Prevention;PAHO, Panamerican Health Organization; WHO, World Health Organization. <http://www.cdc-cap.org>
7. PLAN NACIONAL DE PREPARACIÓN Y RESPUESTA ANTE LA INTENSIFICACIÓN DE LA INFLUENZA ESTACIONAL O ANTE UNA PANDEMIA DE INFLUENZA. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/Plan_Nal_Pandemia_Influenza.pdf
8. Louie J.K., Acosta M., Samuel M.C., et al. (2011) A novel risk factor for a novel virus: obesity and 2009 pandemic influenza A (H1N1). Clin. Infect. Dis. 52:301–312.
9. Situación Actual de la Pandemia. Secretaría de Salud, México 19 julio 2010. Disponible en: http://portal.salud.gob.mx/sites/salud/descargas/pdf/influenza/situacion_actual_epidemi_a_190710.pdf
10. Das K., Aramini J.M., Ma L.C., et al. (2010) Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. Nat. Struct. Mol. Biol. 17:530 –538.
11. Jeong E.K., Bae J.E., Kim I.S. (2010) Inactivation of influenza A virus H1N1 by disinfection process. Am. J. Infect. Control 38:354 –360.
12. <http://www.vetmed.wisc.edu/pbs/olsenlab/viruses.html>
13. Vincent C.C., Kelvin K.W., Herman T., et al. (2012) Two years after pandemic influenza A/2009/H1N1: What have we learned? Clinical Microbiology Reviews. 25(2): 223-263.
14. Iwai A., Shiozaki T., Kawai T., et al. (2010) Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon beta promoter stimulator 1. J. Biol. Chem. 285:32064 –32074.

15. Soto V.E. (2009) Influenza, ¿por qué algunos mueren? Elementos (revista en internet). 75: 53-60. www.elementos.buap.mx
16. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, Oficina Regional para Centro América, Panamá y República Dominicana, CDC/CAP. Directrices provisionales, Uso de medicamentos antivirales en pacientes con infección por el virus nuevo de la influenza A(H1N1) y contactos cercanos. <http://www.cdc-cap.org>
17. Orraca O., González L.M., Casanova M.C., et al. (2010) Inmunopatología de la influenza A H1N1. Rev. Ciencias Médicas. 14(1): 280-294.
18. Taubenberger J.K., Morens D.M. (2008) The Pathology of Influenza Virus Infections. Annu. Rev. Pathology of Influenza Virus Infections. Anny. Rev. Pathol. Mech. Dis. 3:499-522.
19. Zamorano J., Budnik I. (2009) Manifestaciones clínicas de la infección por virus influenza en niños inmunocompetentes. Neumol. Pediatr. 4(1):14-18. Disponible en <http://www.neumologia-pediatrica.cl>
20. Kumar S., Henrickson K. (2012) Update on Influenza Diagnostics: Lessons from the Novel H1N1 Influenza A Pandemic. Clin. Microbiol. 25(2): 344-361.
21. <http://es.scribd.com/doc/6851738/Virologia-Practica-05-Inoculacion-de-virus-en-huevos-embrionados>
22. Voller A., Bartlett A., Bidwell D.E. (1978) Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. J Clin Pathol. 31(6):507-520.
23. Herman T., Kelvin K.W., Xi W. (2011) Clinical and virological factors associated with viremia in pandemic influenza A/H1N1/2009 virus infection. Plos one. 6(9):e22534
24. Vasoo S., Stevens J., Singh K. (2009) Rapid antigen tests for diagnosis of pandemic (swine) influenza A/H1N1. Clin. Infect Dis. 49: 1090-1093.
25. Fleck R., Behrens A. (2002) Evaluation of a maternal antibody decay curve for H1N1 swine influenza virus using the hemagglutination inhibition and the IDEXX ELISA tests. Schering-Plough Animal Health Corporation, Union, NJ. American Association of Swine Veterinarians. 109.
26. Kuri M.P., Galván F., Cravioto P., et al. (2006) Mortalidad en México por influenza y neumonía (1990-2005). Salud Publ Mex. 48: 498-384.
27. <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.html>
28. Kolaskar A.S., Tongaonkar P.C. (2009) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. Elsevier Public Science. 276: 172-174.
29. <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/DF/Poblacion/default.aspx?tema=ME&e=09>

30. Encuesta Nacional de Salud 2012. Disponible en <http://mexico.cnn.com/fotogalerias/2013/07/22/cuales-son-los-estados-en-mexico-con-mas-obesidad>
31. Córdova J.A., Valdespino J.L., Ponce de Leon S. (2010) La epidemia de influenza A/H1N1 en México. México. Ed. Médica Panamericana.
32. Hernández A.M., Garrido L.F., López M.S. (2000) Diseños de estudios epidemiológicos. *Sal. Pub. Mex.* 42: 144-154.
33. Lemaitre M., Leruez-Ville M., De Lamballerie X.N., et al. (2011) Seasonal H1N1 2007 influenza virus infection is associated with elevated pre-exposure antibody titers to the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. *Clin Microbiol Infect.* 17: 732–737
34. WHO. Pandemic (H1N1) 2009. <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/updates/en/index.html>
35. Pérez P.R., de la Rosa Z.D., Ponce de Leon S., et al. (2009) Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med.* 361(7): 689
36. http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/alergia/guias/Asma_Bronquia_l.pdf
37. McKenna J.J., Bramley A.M., Skarbinski J., et al. (2013) Asthma in patients hospitalized with pandemic influenza A(H1N1)pdm09 virus infection—United States 2009. *BMC Infectious Diseases.* 13:57
38. Van M.D., Vandemaële K., Shinde V., et al. (2011) Risk factors for severe outcomes following 2009 Influenza A (H1N1) infection: A global pooled analysis. *PLoS Med* 8: e1001053–e1001053.
39. Bueving H.J., Bernsen R., Jongste J.C., et al. (2004) Influenza Vaccination in Children with Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 169(4): 488-493.
40. Allwinn R., Preiser W., Rabenau H., et al. (2002) Laboratory diagnosis of influenza-virology or serology?. *Med Microbiol Immunol.* 191(3-4): 115-125.
41. Carrat F., Vergu E., Ferguson N.M., et al. (2008) Time lines of infection and disease in human influenza: a review of volunteer challenge studies. *Am J Epidemiol.* 167:775-785.
42. Kim C.O., Nam C.M., Lee D.C., et al. (2012) Is abdominal obesity associated with the 2009 influenza A (H1N1) pandemic in Korean school-aged children?. *Influenza and Other Respiratory Viruses.* 6(5), 313–317.
43. Kok J., Blyth C.C., Foo H., et al. (2013) Viral Pneumonitis Is Increased in Obese Patients during the First Wave of Pandemic A(H1N1) 2009 Virus. *PLoS ONE* 8(2): e55631. doi:10.1371/journal.pone.0055631

44. Jiménez G.R., Hernández B.V., Rodríguez R.C., et al. (2013) Hospitalizations from pandemic Influenza [A(H1N1)pdm09] infections among type 1 and 2 diabetes. *Influenza Other Respir Viruses*. 7(3): 439-447.
45. Karlsson E.A., Sheridan P.A., Beck M.A., (2010) Diet-induced obesity impairs the T cell memory response to influenza virus infection. *J Immunol*. 184:3127–3133.
46. Alexanderyn B., Sosorbarmyn T., Takashi O., et al. (2012) Cumulative incidence of pandemic influenza A (H1N1) 2009 by a community-based serological cohort study in Selenge Province, Mongolia. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 6(601): e97–e104.
47. Arankalle V.A., Virkar R.G., Tandale B.V. and Ingle N.B. (2010) Utility of Pandemic H1N1 2009 Influenza Virus Recombinant Hemagglutinin Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serosurveillance. *Clin. Vacc. Immunology*. 17(9): 1481-1483.
48. Elizondo M.L., Álvarez M.M., Hernández T.M., et al. (2011) Seroprevalence of antibodies to influenza A/H1N1/2009 among transmission risk groups after second wave in Mexico, by virus-free ELISA method. *Int. Journal of Infectious Diseases*. 15 e781-786.
49. Mavrouli M.D., Routsias J.G., Maltezou H.C., et al. (2011) Estimation of Seroprevalence of the Pandemic H1N1 2009 Influenza Virus Using a Novel Virus-Free ELISA Assay for the Detection of Specific Antibodies. *Viral immunology* 24 (3): 221–226.
50. Renegar K.B., Small P.A., Boykins L.G., Wright P.F. (2004) Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. *J Immunol*. 173(3): 1978-1986.

11. ANEXOS

ANEXO 1. Estructura secuencial reportada de NA del virus AH1N1

MNPNQKIITIGSVCMTIGMANLILQIGNIISIWISHSIQLGNQNQIETC
 NQSVITYENNTWVNQTYVNIISNTNFAAGQSVVSVKLAGNSSLCPVS
 GWAIYSKDNSIRIGSKGDV FVIREPFISCSPLECRFFLTQGALLNDKH
 SNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWL
 TIGISGPDNGAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCF
 TVMTDGPSNGQASYKILRIEKGVKIVKSVEMNAPNYHYEECSYCPDSS
 EITCVCRDNWHGSNRPWVSFNQNLEYQIGYICSGIFGDNPRPNDKT
 GSCGPVSSNGANGVKGFSFKYGNGVWIGRTKSISSRNGFEMIWDP
 NGWTGTDNNFSIKQDIVGINEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFW
 VELIRGRP KENTIWTSGSSISFCGVNSDTVGWSWPDGAELPFTIDK

CLAVE DE AMINOÁCIDOS			
Abreviatura	Aminoácido	Abreviatura	Aminoácido
A	Alanina	M	Metionina
C	Cisteina	N	Asparagina
D	Ac. Aspártico	P	Prolina
E	Ac. Glutámico	Q	Glutamina
F	Fenilalanina	R	Arginina
G	Glicina	S	Serina
H	Histidina	T	Treonina
I	Isoleucina	V	Valina
K	Lisina	W	Triptófano
L	Leucina	Y	Tirosina

ANEXO 2. Estructura secuencial reportada de HA del virus A
H1N1

MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFLLGFLFGWFIKSS
NEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAK
QIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSL
FEPPPPGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLER
DMKINCSGKIVIARYGKVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAP
GVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANAYARRG
IAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLEKMGGSAPPDSSWRGSLKVPYNV
GPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGG
HRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRRTILFASWD
AEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPL
MYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGS
GNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKF
YDPMFKYHLTVAQVRGGMVFEANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIY
SISMKHPQEMKTYSVSFDSLFSVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVL
RMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGI
YDALFDIESKVDPSKAWGEVQRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA

ANEXO 3. Predicción de antigenicidad en la secuencia de NA según el método de Kolaskar y Tongaonkar

n	Start Position	Sequence	End Position
1	6	KIITIGSVCMT	16
2	19	MANLILQIGNIISIWISHSIQ	39
3	47	ETCNQSVIT	55
4	62	VNQTYVN	68
5	76	AGQSVVSVKL	85
6	87	GNSSLCPVSGWAI	99
7	110	SKGDVVFIREPFISCSPLECRTFFLTQGALLN	141
8	154	PYRTLMSPIGEVPS	168
9	174	FESVAWSASACHD	186
10	200	NGAVAVLKY	208
11	228	ESECACVNGSCFT	240
12	251	ASYKILR	257
13	260	KGKIVKS	266
14	275	HYEECSYCPD	284
15	286	SEITCVCR	293
16	310	LEYQIGYICSG	320
17	389	IKQDIVG	395
18	402	YSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVEL	426
19	441	SSISFCGVNS	450

ANEXO 4. Predicción de antigenicidad en la secuencia de HA según el método de Kolaskar y Tongaonkar.

n	Start Position	Sequence	End Position
1	4	ILVVLLYT	11
2	17	ADTLCIG	23
3	37	LEKNVTVTHSVNLLLE	51
4	55	NGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAG	76
5	83	ECESLST	89
6	91	SSWSYIVET	99
7	104	NGTCYPGD	111
8	119	REQLSSVSS	127
9	149	VTAACPHAGAK	159
10	161	FYKNLIWLVKK	171
11	174	SYPKLSK	180
12	187	GKEVLVLWGIHHPHS	200
13	204	DQOSLYQNADAYVFGT	220
14	228	KPEIAIRPK	236
15	247	YWTLVEP	253
16	262	TGNLVPRY	270
17	280	SGIIISDTPVHDCNT	294
18	303	INTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLA	332
19	334	GLRNVPSIQS	343
20	345	GLFGAIAG	352
21	439	NAELLVLL	446
22	459	VKNLYEKVRS	468
23	481	CFEFYHKCDN	490
24	526	RIYQILAIYSTVASSLVLVSLGA	549