



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Evaluación de saliva como muestra biológica para la
determinación de anticuerpos IgA contra dos péptidos del
virus de influenza AH1N1.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

YESENIA GUADALUPE BERMÚDEZ ÁLVAREZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. GUILLERMINA AVILA RAMÍREZ.
2016**

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 padre, por ser un gran ejemplo a seguir, por ser el que se levanta primero para salir al trabajo, y que llega a la casa más tarde que todos, siempre dando prioridad al bienestar de su familia y brindando cálidos momentos de cariño. Por sus consejos y sacrificios, por su carácter, por inculcarme que no hay obstáculo que no pueda sobrepasar, por demostrarme día a día su gran amor. Gracias papá.

A mi madre, porque detrás de cada gran logro que tengo siempre está ella, por todo el amor y dedicación a su familia, por impulsarme siempre a seguir adelante, por tus palabras de aliento, por tu inigualable valentía y fortaleza que me inspiran. Gracias por todo tu amor.

A mis hermanos, especialmente a mi hermano menor, Yarid, por apoyarme siempre a seguir mis sueños, por estar siempre que lo necesito, por su amor y comprensión por ayudarme a ver mis tropiezos como una buena anécdota para contar, por siempre confiar en mí.

A mi familia, por recordarme siempre que soy dichosa, pues los he tenido a ustedes que me han apoyado siempre de manera incondicional, por ser mis primeros y mejores amigos.

A mi compañero, amigo y confidente, Erick, por demostrarme tu amor y brindarme todo tú apoyo siempre. Por tu paciencia y cariño, por alegrar cada día. Te amo

A mi asesora, Dra. Guillermina Avila, por compartir conmigo su amor por la ciencia. Gracias por todas sus enseñanzas, por ser mi maestra y además, mi amiga. Agradezco su dedicación y tiempo.

A la Dra. Verónica Cruz, por su apoyo en el análisis epidemiológico, por su tiempo y enseñanzas.

A mi equipo de laboratorio por su ayuda y sugerencias, por su linda amistad y conocimientos compartidos: Dra. Ana, M en C. May, Dra. Guille, Dra. Fela, Karla, Fany y Ulises.

El presente estudio fue financiado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, proyecto No. PICDS 109-249 y la Facultad de Medicina, UNAM, proyecto No. 017-2013

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrir las puertas de la Facultad de Ciencias y la Facultad de Medicina para darme la oportunidad de formarme como profesionalista; por los conocimientos , recuerdos y hermosas vivencias.

El trabajo de tesis que se describe a continuación fue realizado en el laboratorio de Inmunomodulación y Agentes Patógenos de la Facultad de Medicina, UNAM, CU.

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

1	Resumen.....	1
2	Introducción.....	2
2.1	Clasificación taxonómica y morfología.....	3
2.2	Vías de transmisión.....	4
2.3	Sintomatología.....	5
2.4	Diagnóstico de laboratorio.....	6
2.4.1	Prueba rápida de antígenos.....	6
2.4.2	Cultivo celular.....	6
2.4.3	Inhibición de la hemaglutinación.....	7
2.4.4	Ensayo de neutralización.....	7
2.4.5	RT-PCR.....	7
2.4.6	ELISA.....	8
2.5	IgA en saliva.....	8
2.6	Epidemiología de la influenza en México.....	9
3	Justificación.....	11
4	Objetivos.....	12
4.1	Objetivo general.....	12
4.2	Objetivos particulares.....	12
5	Hipótesis.....	13
6	Diseño experimental.....	13
6.1	Selección de participantes y toma de muestras.....	13
6.2	Material y métodos.....	14
6.2.1	Procesamiento de muestras.....	14
6.3	Estandarización del ELISA.....	14

6.4	Procedimiento del ELISA para la determinación de anticuerpos IgA contra el virus de influenza AH1N1 en muestras de saliva.....	15
7	Resultados.....	17
7.1	Estandarización del ELISA.....	17
7.2	Datos poblacionales.....	18
7.3	Resultado del ELISA en la muestra poblacional.....	19
7.4	Factores poblacionales asociados a la presencia de anticuerpos contra el virus AH1N1.....	21
8	Discusión.....	22
8.1	Elisa.....	22
8.2	Datos Poblacionales.....	22
8.3	Factores poblacionales asociados a la presencia de anticuerpos contra dos péptidos del virus AH1N1.....	24
9	Conclusiones.....	26
10	Bibliografía.....	27
	ANEXOS.....	31

1. Resumen

La influenza es una infección sumamente contagiosa de origen viral considerada una de las causas más importantes de infecciones de las vías respiratorias, siendo un problema grave de salud pública. Por tal motivo, el objetivo de esta tesis fue evaluar la saliva humana como muestra biológica para determinar la exposición al virus de influenza AH1N1 con base en la presencia de anticuerpos IgA específicos contra el virus mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA), empleando como fuente de antígenos dos péptidos sintéticos del virus AH1N1.

El presente trabajo formó parte de un estudio previo que se llevó a cabo en la Facultad de Medicina durante 2009, el cual se tituló: "Estudio seroepidemiológico de la nueva influenza humana en la Ciudad de México". Se obtuvieron 1147 muestras de saliva de habitantes de tres delegaciones de la CDMX (Gustavo A. Madero, Coyoacán y Magdalena Contreras). Se estandarizó un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgA en muestras de saliva, se utilizaron dos péptidos sintéticos, uno de la proteína hemaglutinina y otro de la neuraminidasa (llamados HA15 y NA15) como fuente de antígenos; las muestras de saliva se trabajaron a una dilución 1:50 y un conjugado anti-IgA humana acoplado a peroxidasa se empleó 1:1000. Del total de muestras analizadas, 98 fueron positivas para HA15 (8.6%) y para el péptido NA15 fueron 126 (11%). Los resultados de las absorbancias indicaron que existió una asociación entre la producción de anticuerpos en las personas que fuman y en quienes estuvieron cerca de alguien con gripa. De acuerdo a la prueba de razón de momios, la probabilidad de generar anticuerpos IgA contra NA15 es 1.5 veces mayor en los fumadores que en los no fumadores (RM= 1.5, $p= 0.038$). Del total de la población estudiada, 320 individuos dijeron haber estado cerca de una persona con gripa, pero sólo 56 desarrollaron anticuerpos contra el péptido HA15, lo que equivale al 17.5% (RM= 0.52, $p=0.017$).

La presente investigación sugiere que puede utilizarse la saliva como muestra biológica para determinar exposición al virus AH1N1 mediante un ELISA indirecto utilizando como antígenos dos péptidos sintéticos del virus. Se observó además que la presencia de anticuerpos IgA en saliva estuvo relacionado positivamente con ser fumador y convivir con alguien que tuviera gripa

Palabras clave: influenza, saliva, exposición al virus de influenza, anticuerpos IgA, ELISA, péptidos sintéticos.

2. Introducción

El término “Influenza” no es nuevo, de hecho existe desde la época medieval y se utilizaba para distinguir un grupo de enfermedades diferentes, que se creía eran originadas por influencia de los astros. El concepto “gripe” suele usarse como sinónimo de influenza. La influenza es una infección sumamente contagiosa de origen viral considerada una de las causas más importantes de infecciones de las vías respiratorias. Podría ser que la primera descripción de influenza humana data de 1485, cuando cientos de soldados murieron en Inglaterra a causa de una fuerte gripe. Los virus de influenza causan epidemias frecuentes y son un problema importante de salud pública (Orraca *et al.*, 2010).

En 1918 el virus de la influenza tipo AH1N1 se introdujo en la población humana causando la “gripe española”, provocando 50 millones de defunciones. Varios tipos de virus de influenza han atacado a la población humana a través de los años, cobrando gran número de muertes, esto es debido a que los virus de la influenza sufren constantes variaciones antigénicas. Dichas variantes son resultado de mutaciones puntuales que ocurren durante la replicación, lo cual da lugar a que un proceso infeccioso con una determinada variante no confiera inmunidad permanente contra el virus. En 1957 otra cepa de influenza, AH2N2 causó la gripe Asiática, responsable de 4 millones de muertes. En tan solo una década, el subtipo del virus AH2N2 fue reemplazado por el virus AH3N2, originando la pandemia de Hong Kong en 1968. En 2009, el nuevo virus de influenza AH1N1, provocó la primera pandemia del siglo XXI (Kreijtz *et al.*, 2011).

Este brote de la nueva influenza se presentó en el mes de abril del año 2009 y una gran cantidad de individuos estaban infectados con el virus AH1N1 en México y Estados Unidos. La fácil transmisión del virus, aunado a la facilidad de viajar de un lugar a otro que se tiene hoy en día contribuyó a la expansión del virus. Para el 9 de junio del 2009, la OMS declaró que la influenza se había convertido en una epidemia. A principios de junio del mismo año, se reportó que el nuevo virus había producido cerca de 30,000 casos y fue responsable de 145 muertes en el mundo. El 11 de junio la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró establecida la situación de pandemia (Rafart *et al.*, 2009). El virus AH1N1 que surgió en 2009 tiene la característica de afectar tanto a humanos como a cerdos y aves.

2.1 Clasificación taxonómica y morfología

El virus de la influenza pertenece a la familia de los Orthomyxoviridae. Esta familia se divide en cinco géneros diferentes: Influenza virus A, B, C, Isavirus y Thogothovirus. Los principales brotes de influenza en los humanos se relacionan con el género A y B, siendo una infección más grave la causada por el tipo A.

El virus de influenza es una cadena segmentada de RNA negativo cubierta por una capa lipídica y un genoma de ocho segmentos que codifica para 11 o 12 proteínas. La segmentación en el RNA permite el intercambio de genes entre los virus de influenza. Las partículas virales pleomórficas pueden variar de esférica a filamentosas con un diámetro de 120 nm (Cheng *et al.*, 2012). En la superficie se proyectan glicoproteínas antigénicas como la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N). La hemaglutinina es considerada el antígeno mayor para la cual está dirigida la producción de anticuerpos neutralizantes y cuya función es la adhesión del virus mediante residuos de ácido siálico en la superficie del epitelio respiratorio humano. La hemaglutinina es responsable de la penetración del virus al hospedero, por lo que el sistema inmune se ha visto continuamente expuesto a este tipo de proteína. Existen 16 subtipos de H y 9 de N, por lo que pueden existir varias formas del virus A de la influenza dependiendo de la combinación de dichas proteínas. La cubierta de este virus contiene proteínas de la matriz (M1) y transmembranales (M2). La proteína M1 confiere rigidez a la capa bilipídica del virus, mientras que la proteína M2 es un canal iónico dependiente de pH (Figura 1). El virus de la influenza es poco estable en regiones con humedad intermedia y altas temperaturas, pero es estable en climas fríos.

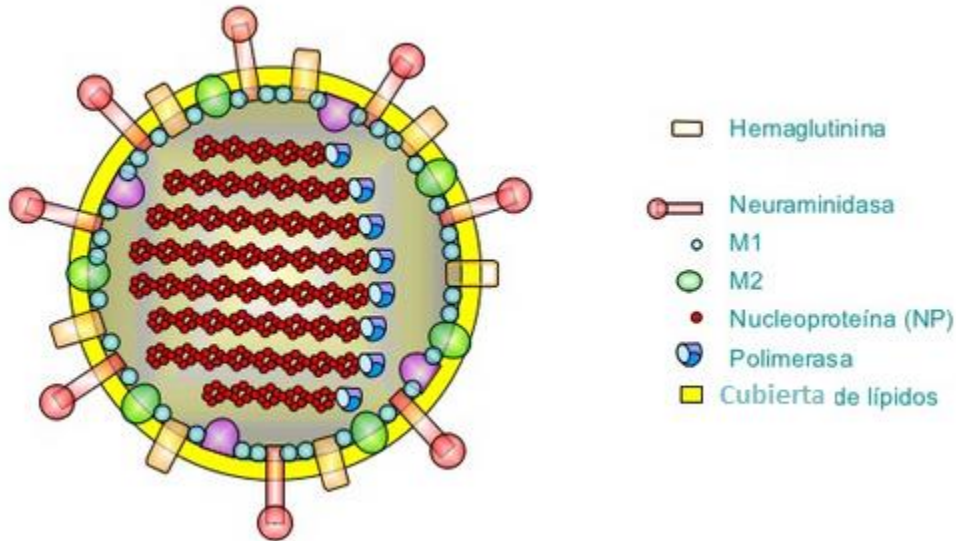


Figura 1. Virus de influenza tipo A de forma esférica. En la superficie se muestran las glucoproteínas hemaglutinina y neuraminidasa, así como las proteínas de la matriz (M1) y (M2). En el centro se encuentran los segmentos de RNA que constituyen el código genético del virus, el cual se encuentra cubierto con una bicapa lipídica (Romero, 2009).

2.2 Vías de transmisión

Los virus de influenza se diseminan de persona a persona principalmente al toser o estornudar, debido a que las partículas virales están contenidas en la saliva. Es necesario el contacto cercano entre las personas, ya que las partículas no permanecen suspendidas en el aire.

Otra forma de contagio es por medio de contacto con objetos que pudieron estar impregnados con el virus: monedas, tubos de transporte público, teléfonos. También se ha reportado que al llevarse las manos a los ojos, nariz o boca, o saludarse de beso o mano se puede producir el contagio (Orraca *et al.*, 2010).

La influenza ocurre predominantemente durante los meses de invierno y hasta principios de la primavera, sin embargo puede presentarse en cualquier época del año. El periodo de incubación es de 1 a 4 días, con un promedio de dos días. Los adultos son capaces de transmitir el virus un día antes de que los síntomas inicien y hasta aproximadamente 5 días después, los niños pueden transmitir el virus hasta 10 días después. Las personas con inmunosupresión pueden excretar virus por semanas o meses y los pacientes asintomáticos también pueden transmitir el virus (Paredes *et al.*, 2006).

2.3 Sintomatología

Los síntomas de influenza suelen ser parecidos a los de un resfriado, sólo que más severos, es importante saber identificarlos y no confundirlos, para que se logren tratar a tiempo (figura 2). Dentro de los síntomas de influenza, puede ser muy frecuente la dificultad para respirar, presentar vómito o diarrea, alteraciones del estado de conciencia, deterioro agudo de la función cardíaca y agravamiento de una enfermedad crónica, así como fiebre elevada y aumento de la frecuencia respiratoria (cuadro 1).

¿Cómo diferenciar los síntomas?

■ Influenza ■ Resfriado común

Tos

- Es intensa y se presenta en casi todos los casos
- Leve y moderada

Fiebre

- De 39°C a 40°C, dura hasta 4 días
- Poco frecuente

Cansancio y/o debilidad

- Intenso, dura hasta 3 semanas
- Leve a moderado

Congestión nasal

- Ocasional
- Frecuente

Postración*

- Repentina e intensa
- Nunca

Vómito

- Ocasional en niños. Puede presentarse con diarrea
- No se presenta

Estornudos

- Ocasional
- Frecuente

Dolor de cabeza

- Repentino e intenso
- Infrecuente

Ardor y dolor de garganta

- Ocasional
- Frecuente

Dolores musculares

- Muy intensos
- Leves a moderados



Figura 2: Diferencias entre la sintomatología de un resfriado común e infección por virus de influenza AH1N1 (EL UNIVERSAL, febrero, 2016).

SÍNTOMAS DE INFLUENZA	
Fiebre	De 39 a 40°C
Tos o dolor de garganta	Excesiva
Fatiga	Postración
Dolor de cabeza.	Moderado a intenso.
Vómito	Algunas personas pueden presentar vómito o diarrea, aunque esto es mas común en los niños que en adultos.
Complicaciones	Neumonía, sinusitis, bronquitis.

Cuadro 1. Síntomas de la Influenza (fuente: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades [CDC (<http://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/disease/symptoms.htm>)]

2.4 Diagnóstico de laboratorio

La prevención y control de la enfermedad causada por el virus de influenza, requieren de la cuantificación de los niveles de anticuerpos específicos generados en respuesta a la infección. Los métodos de diagnóstico utilizados en la actualidad en los laboratorios clínicos incluyen pruebas rápidas de antígenos, cultivo celular y pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), inhibición de la hemaglutinación y neutralización viral.

2.4.1 Prueba rápida de antígenos: Consiste en un inmunoanálisis de flujo lateral que utiliza anticuerpos monoclonales de alta sensibilidad específicos para la detección de los antígenos de la influenza A y B. Esta prueba se presenta en forma de tiras reactivas. En el centro de la tira se encuentra una zona “control”, por arriba de ella están colocados los anticuerpos contra la influenza tipo A y por debajo los de la tipo B. La zona de control siempre se tiñe de azul y es la única línea presente en una muestra negativa. Si la muestra contiene antígenos de A o B detectables, aparecerá además una línea rosa (Castro-Cárdenas *et al.*, 2011).

2.4.2 Cultivo celular: Consiste en emplear un sustrato para cultivar un virus de influenza en particular, para ello es indispensable garantizar que el sustrato empleado posea células con características y receptores apropiados que favorezcan la replicación viral. Específicamente

en lo relacionado con el virus de influenza humana, se han empleado para su cultivo líneas celulares tales como las células embrionarias de retina humana (PER.C6) y las células de riñón de mono verde africano (VERO) (Mancipe *et al.*, 2011).

Entre las técnicas serológicas empleadas se encuentran la inhibición de la hemaglutinación (IHA) y la prueba de neutralización.

2.4.3 Inhibición de la hemaglutinación: Es una técnica simple y rápida basada en la capacidad del virus de influenza para aglutinar células rojas de la sangre (eritrocitos). Esta técnica permite determinar la cantidad de virus presente en una muestra y se lleva a cabo mediante diluciones seriadas del virus, que son mezcladas con una cantidad determinada de eritrocitos y depositadas en pozos. Las células rojas que no se unen al virus, caen al fondo del pozo. Por otro lado, los eritrocitos que se unen al virus forman un entramado o hemaglutinación que cubre el pozo. La prueba de IHA es una técnica basada en la pérdida de la capacidad hemaglutinante de un virus debido a la formación del complejo antígeno-anticuerpo. La dilución más alta que previene la hemaglutinación es referida como el “título de inhibición de la hemaglutinación del suero”. Si el suero no posee anticuerpos que reaccionen con el virus, la hemaglutinación será observada en todos los pozos. Por otro lado, si el suero presenta anticuerpos contra el virus, la hemaglutinación no será observada hasta que los anticuerpos estén lo suficientemente diluidos. Como resultado de la prueba de IHA se obtienen títulos de anticuerpos que generalmente correlacionan con la inmunidad protectora (Villalobos *et al.*, 2010).

2.4.4 Ensayos de neutralización: Permiten detectar anticuerpos antivirales en una muestra de suero. En este examen se cultivan células en pozos de placas de cultivo celular y previo a la infección se mezcla una muestra de suero con el virus; esta mezcla es adicionada a las células. Si el suero contiene anticuerpos que son capaces de bloquear la infección viral, las células sobrevivirán. Para hacer el ensayo cuantitativo, se realizan diluciones seriadas del suero. En las diluciones bajas, los anticuerpos serán capaces de bloquear la infección mientras que en las diluciones más altas habrá un menor número de anticuerpos que tengan este efecto. El título neutralizante se expresa como el recíproco de la dilución más alta en que la infección por el virus ha sido bloqueada (Villalobos *et al.*, 2010).

2.4.5 RT-PCR: Consiste en extraer y cuantificar el RNA viral en muestras de la saliva o exudado faríngeo, luego se realiza la reacción de transcripción en reversa con la que se obtiene DNA complementario; enseguida, con el empleo de iniciadores específicos y de ciclos repetitivos, se realiza la PCR en tiempo real. Se ha reportado que en RT-PCR, la saliva tiene un mejor valor predictivo que la muestra de nasofaringe y la toma de muestra es

menos agresiva para el paciente (Paredes *et al.*, 2006). Este método a pesar de ser muy confiable en el diagnóstico de influenza, es de costo elevado y en los países con recursos limitados la RT-PCR no puede ser utilizada por muchos laboratorios.

2.4.6 ELISA: Con la aparición del virus AH1N1 en 2009, la necesidad de un diagnóstico precoz y preciso para la influenza pandémica se hizo importante para fines epidemiológicos y terapéuticos (Dhakad *et al.*, 2015). En este caso, la técnica de ELISA es muy sensible para detectar antígenos y anticuerpos.

Para la determinación de anticuerpos por medio del ELISA, primero se adsorbe el antígeno a un soporte sólido (placa de ELISA), posteriormente se adiciona la muestra problema (suero, saliva, etc) y después se agrega el conjugado, que es un anticuerpo que tiene unida covalentemente la enzima peroxidasa, finalmente se agrega el sustrato y el desarrollo de color se mide en un espectrofotómetro lector de ELISA. El desarrollo de color está relacionado directamente con la cantidad de asociaciones antígeno-anticuerpo (Siachoque, 2006).

2.5 IgA en saliva

La saliva es un fluido corporal secretado por las glándulas salivales que es de vital importancia para la integridad de los tejidos duros y blandos de la cavidad bucal. Dentro de sus principales funciones están: proteger la integridad de la mucosa, neutralizar ácidos, eliminar restos alimenticios y bacterias de la cavidad bucal, facilitar la masticación y deglución, acidificar bases y proveer los iones necesarios para remineralizar los dientes.

Las glándulas salivales en el ser humano producen aproximadamente 1L de saliva diario, la cual está conformada en un 99% por agua y 1% por moléculas orgánicas grandes (proteínas, glucoproteínas, lípidos) y moléculas orgánicas pequeñas (glucosa, urea, electrolitos). Las proteínas que contiene la saliva desempeñan un papel importante en la protección contra infecciones microbianas y virales, ya que forman parte de los mecanismos del sistema inmune. Dentro de estas proteínas se encuentra la inmunoglobulina A (IgA), que es el isotipo de anticuerpos de mayor concentración presente en mucosas (Montoya, 2008), es detectada tempranamente en la vida y su concentración incrementa con la edad y forma parte de los mecanismos de inmunidad adaptativa (Childers *et al.*, 2003). Cuando el organismo se ve amenazado por una infección que entra por vía respiratoria o por vía oral, la IgA interviene rápidamente como línea de defensa y se pueden generar niveles elevados de esta inmunoglobulina. La ventaja que se tiene al trabajar con saliva, es que su recolección no es un método agresivo para el paciente y es fácil de obtener, además, como se mencionó

anteriormente, los anticuerpos IgA son parte de las moléculas orgánicas que componen la saliva, por lo que su presencia en ella puede determinar la exposición al virus de la influenza (Tamura 2004).

2.6 Epidemiología de la influenza en México

El virus de la influenza A se caracteriza por provocar enfermedad de moderada a grave; tiende a afectar a todos los grupos etarios. A continuación se muestra una lista de los grupos sociales que presentan mayor riesgo de contraer la enfermedad.

- Personas mayores de 65 años de edad.
- Personas que están en contacto frecuente con personas infectadas, por ejemplo, médicos, enfermeras y familiares de infectados.
- Adultos y niños quienes tienen alguna enfermedad crónica en sistema cardiovascular o pulmonar incluyendo asma.
- Adultos y niños quienes en años anteriores requirieron hospitalización o uso de medicamentos para controlar enfermedades metabólicas como diabetes, disfunción renal, hemoglobinopatías o inmunosupresión, incluyendo VIH (James *et al.*, 2003)

Desde el 2009, se ha mantenido la vigilancia epidemiológica de influenza en México de manera ininterrumpida. El Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) reporta de manera semanal los casos de influenza, especificando que la influenza es un padecimiento estacional que durante la temporada de frío (semana epidemiológica 40 del año en curso a la semana epidemiológica 20 del siguiente año) registra un incremento en el número de casos. En el cuadro 2 se muestra la recopilación de defunciones debidas a influenza registrados por la secretaría de salud desde 2011 hasta 2016. Durante cada año se realiza la notificación al sistema de Vigilancia Epidemiológica de Influenza (SISVEFLU) de casos sospechosos y/o confirmados de influenza y el registro de las defunciones sospechosas y/o confirmadas de este padecimiento. Hasta el momento el InDRE no ha identificado mutaciones relacionadas con cambios antigénicos, que impacten en virulencia o patogenicidad del virus de influenza AH1N1.

Notificación hasta la semana epidemiológica 40	Virus confirmado en defunciones
Año 2011. Al 6 de octubre	317
Año 2012. Al 3 de octubre	266
Año 2013. Al 3 de octubre	14
Año 2014. Al 2 de octubre	777
Año 2015.	0
Año 2016	0

Cuadro 2. Defunciones debidas a influenza durante el año 2011 hasta 2015-2016. Datos obtenidos del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de influenza (SINAVE, DGE).

3. Justificación

Debido a las condiciones actuales de concentración de individuos en las ciudades, cambios climáticos y el rápido desplazamiento de personas a través de las fronteras, se facilita el flujo del virus AH1N1 y por lo tanto aumenta la probabilidad de contagio, así como también dificulta predecir el comportamiento de las nuevas epidemias (Vega, 2009).

Durante el brote de la epidemia de influenza del año 2009, en sólo 9 semanas la nueva cepa AH1N1 se había distribuido ampliamente por todos los continentes y 100 000 casos se habían reportado alrededor del mundo, sin embargo el mayor número de muertes habían ocurrido en Estados Unidos, México, Argentina y Canadá (Garske, 2009). La influenza es considerada una de las causas más importantes de infecciones de las vías respiratorias, siendo un problema grave de salud pública a nivel mundial debido a su fácil propagación, por lo que en este trabajo se propone un método que permita determinar, a través de la identificación de anticuerpos, si el paciente ha tenido contacto con el virus.

En un trabajo previo realizado en el laboratorio, se estandarizó un ELISA para la determinación de anticuerpos IgG séricos contra el virus de influenza AH1N1, donde se empleó como antígeno dos péptidos sintéticos, uno de hemaglutinina y otro de neuraminidasa, los cuales se denominaron HA15 y NA15. Los resultados fueron alentadores, pero debido a la problemática que se presenta para la obtención de sueros, en la presente tesis se plantea utilizar la saliva como muestra biológica en la realización de un ELISA en el que se utilizan los péptidos HA15 de la proteína hemaglutinina y NA15 de la neuraminidasa para identificar la presencia de anticuerpos IgA contra el virus de influenza, y así determinar si ha existido contacto con el mismo. Este ensayo es económico y arroja resultados rápidamente, además permite realizar gran número de pruebas en un tiempo relativamente corto, por lo que contribuye con el diagnóstico de la enfermedad.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general.

- Evaluación de la saliva humana como muestra biológica para determinar la exposición a influenza AH1N1 con base en la presencia de anticuerpos IgA específicos contra el virus mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA), empleando como fuente de antígenos dos péptidos del virus AH1N1.

4.2 Objetivos particulares.

- Obtener muestras de saliva de habitantes de tres delegaciones del Distrito Federal.
- Estandarizar las condiciones del ensayo inmunoenzimático (ELISA) con dos péptidos del virus AH1N1 como fuente de antígenos
- Realizar el ELISA con las muestras de saliva obtenidas y determinar la frecuencia de anticuerpos IgA contra el virus AH1N1.
- Realizar el análisis de datos poblacionales e identificar factores relacionados con la producción de anticuerpos.

5. Hipótesis

- Es posible detectar anticuerpos IgA contra el virus AH1N1 de la influenza humana en muestras de saliva de personas expuestas al virus.

6. Diseño experimental

El presente trabajo forma parte de un estudio previo que se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunomodulación y agentes patógenos de la Facultad de Medicina de la UNAM durante 2009, el cual se tituló: “Estudio seroepidemiológico de la nueva influenza humana en la Ciudad de México”. El estudio fue propuesto por la Dra. Ana Flisser, aprobado por las Comisiones de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina (oficio FMED/CI/GRD/025/2009) y financiado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (proyecto No. PICDS 109-249). Para dicha investigación se obtuvieron muestras de suero y saliva de habitantes del Distrito Federal, las que se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su uso.

6.1 Selección de participantes y toma de muestras:

Las muestras biológicas correspondieron a habitantes de tres delegaciones del DF, que se seleccionaron por conveniencia de ubicación geográfica: Gustavo A. Madero en el norte, Coyoacán en el centro, y Magdalena Contreras en el sur. Se calculó el número de muestra tomando en cuenta los datos reportados para influenza estacional debido a que se desconocía la prevalencia de la influenza AH1N1 en el momento del muestreo; el tamaño muestral fue de 1147, con un error máximo de estimación de 0.02 a un nivel de confianza de 0.95.

El muestreo se realizó en los meses de agosto a octubre de 2009; a los participantes de este estudio se les aplicó un cuestionario y de la información obtenida se identificó a personas que durante el brote de influenza presentaron todos los síntomas característicos de la enfermedad (dificultad para respirar, vómito o diarrea, alteraciones del estado de conciencia, deterioro agudo de la función cardíaca y agravamiento de una enfermedad crónica, así como fiebre elevada). Este grupo se nombró con el apelativo de “con síntomas”. De ese mismo cuestionario se identificó otro grupo de personas que no presentaron ningún síntoma.

Se contó además con un grupo de 30 muestras de saliva que fueron donadas por el Instituto Nacional de Pediatría y que se colectaron antes del brote de 2009, este grupo de muestras se consideraron como negativas y se utilizaron para calcular el punto de corte del ensayo. También se obtuvo saliva de 33 individuos que se enfermaron durante el brote de influenza y se muestrearon en los meses posteriores (septiembre-octubre de 2009). A este grupo se le dio el nombre de post-brote.

6.2 Material y métodos.

6.2.1 Procesamiento de las muestras.

La saliva se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C para eliminar los detritos mayores, se dividieron en alícuotas, mismas que se almacenaron en congelación a -20°C. Antes de usarlas se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos, para determinar la presencia de anticuerpos IgA contra el virus de influenza A H1N1 por medio del ensayo inmunoenzimático (ELISA).

6.3 Estandarización del ELISA

Previamente a esta investigación, se realizó el análisis de la secuencia de las proteínas hemaglutinina y neuraminidasa de los diferentes aislados del virus de influenza AH1N1 (Espinosa, 2014). Se eligió trabajar con los péptidos HA15 y NA15, debido a que cuando se probaron estos péptidos sintéticos en un ELISA para la detección de IgG sérica en grupos de sueros de individuos positivos y negativos al contagio con virus de influenza, fueron los que presentaron una mejor respuesta y diferencia estadística entre los grupos comparados (Espinosa, 2014).

Para realizar la estandarización del ELISA, se usaron los grupos de muestras con síntomas, sin síntomas, las muestras donadas por el INP (control negativo) y las muestras post-brote. Las muestras de saliva se trabajaron en tres diluciones diferentes, mientras que el conjugado anti IgA humana se ensayó en dos diluciones. Las muestras de saliva del INP se utilizaron para calcular el punto de corte del ensayo.

6.4 Procedimiento del ELISA para la determinación de anticuerpos IgA contra el virus de influenza AH1N1 en muestras de saliva (figura 3)

1.- Se utilizaron placas Pierce® de 96 pozos recubiertas con anhídrido maleico (Thermo scientific, producto 15110). Se activó la placa de acuerdo a las instrucciones del fabricante mediante una serie de tres lavados, a intervalos de cinco minutos y con agitación, utilizando buffer de fosfato salino pH 7.2 adicionado con tween 20 al 1% (PBS-tw 0.1%).

2.- Se adicionaron 100µL de la solución del péptido (HA15 o NA15) a una concentración de 10µg/mL en cada pozo y se dejó reposar a 4°C durante toda la noche.

3.- Al siguiente día se realizó el bloqueo de la placa, utilizando una solución SuperBlock Blocking® Buffer in PBS (Thermo scientific, producto 37518). Se colocaron 200µL de dicha solución en cada pozo y se dejó reposar a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora.

4. Enseguida se colocaron 100µL de PBS-tw 0.1% en cada pozo, para lavar la placa. Se colocó en un agitador durante 5 minutos y se retiró el PBS sacudiendo con fuerza la placa para eliminar excesos. Se realizó este procedimiento tres veces.

5.- Se diluyó la saliva en PBS-tw 0.3% y se colocaron 100µL en cada pozo. Se tapó la placa con un plástico adherente transparente y se dejó reposando durante 2 horas a TA.

6.- Se realizan cuatro lavados de 5 minutos a la placa con PBS tw 0.3% y uno más de 5 minutos con PBS tw 0.1% en agitación.

7.-Colocación del conjugado. Se agregó el conjugado anti IgA humano acoplado a peroxidasa, el cual se diluyó en PBS tw 0.1 % y se colocaron 100µL de la solución en cada pozo. Se cubrió la placa con un plástico adherente y se dejó reposar durante dos horas a TA.

8.-Se hicieron tres lavados de 5 minutos en agitación a la placa con PBS-tw 0.1%.

9.-Sustrato para la coloración: siguiendo instrucciones del fabricante, se diluyó la pastilla o-fenilendiamina de Sigma® (FAST OPD®) en 20mL de agua destilada. Se colocaron 100µL de la solución en cada pozo. Se dejó la placa en reposo durante cinco minutos en oscuridad dando tiempo a que se realizara la reacción enzimática de unión al conjugado, resultando en una coloración amarillenta.

10.- Se agregaron 50µL de ácido sulfúrico 2N por pozo para detener la reacción.

11.- Se leyó la absorbancia de la placa a 490 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro.

12.- Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente y correlacionados con el cuestionario que se aplicó a los voluntarios para verificar si existió relación entre la presencia de anticuerpos IgA en saliva utilizando los péptidos HA15 y NA15 y algunos factores de riesgo. Se aplicó la prueba de chi cuadrada utilizando el programa estadístico SPSS versión 20 y se calculó la razón de momios.

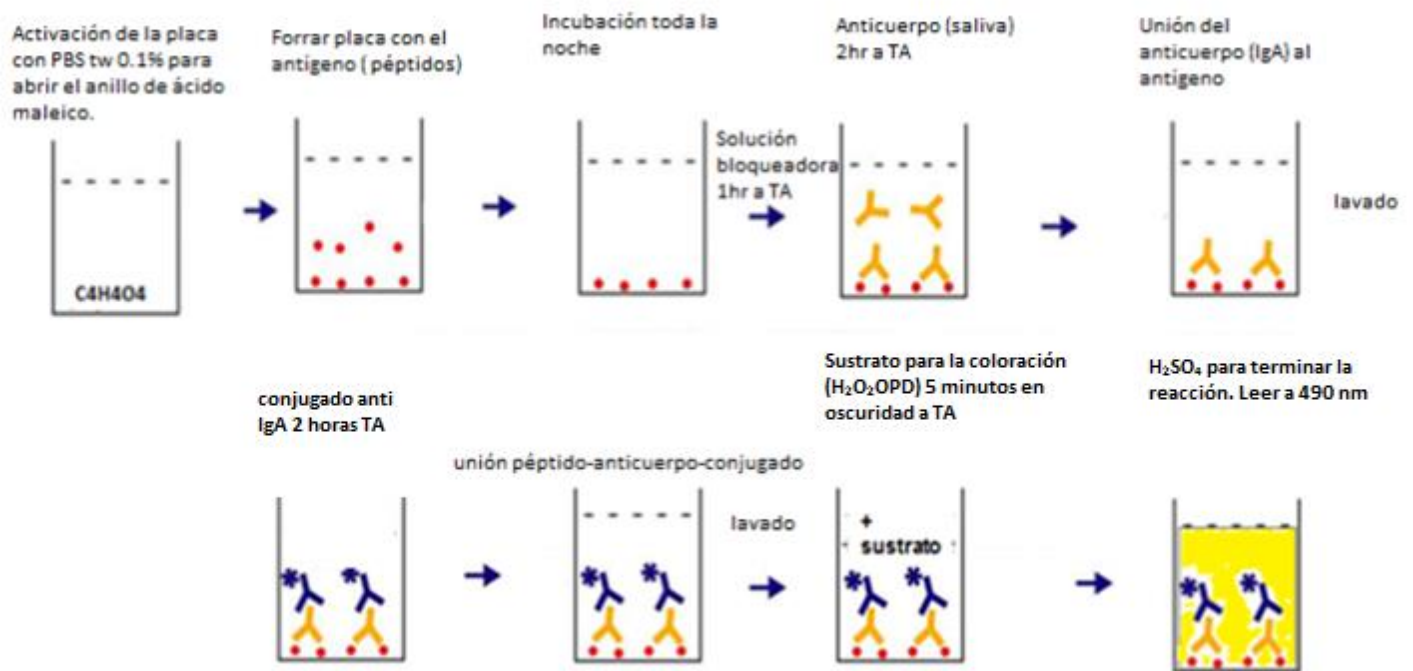


Figura 3: Esquema de ELISA para determinación de anticuerpos IgA en saliva, utilizando como antígenos los péptidos HA15 y NA15.

7. Resultados

7.1 Estandarización del ELISA.

En el presente trabajo se desarrolló una prueba inmunoenzimática (ELISA) para determinar la presencia de anticuerpos IgA contra la influenza AH1N1, en el que se utilizaron los péptidos HA15 de la proteína hemaglutinina y NA15 de la neuraminidasa, los cuales corresponden a la secuencia de aminoácidos del virus circulante y reportado en México en 2009 (anexos1 y 2).

Se trabajó la saliva utilizando diluciones 1:5, 1:10 y 1:50, mientras que el conjugado anti IgA humana se ensayó a las diluciones 1:500 y 1:1000. Al dividir los cocientes de densidad óptica (DO) de una muestra negativa sobre una positiva, se encontró que la diferencia fue mayor para las diluidas 1:50 y usando el conjugado 1:1000, lo que indica que hay una mejor detección en la presencia de anticuerpos a este grado de dilución, por lo que éstas concentraciones fueron las establecidas para realizar el ensayo (figura 4).

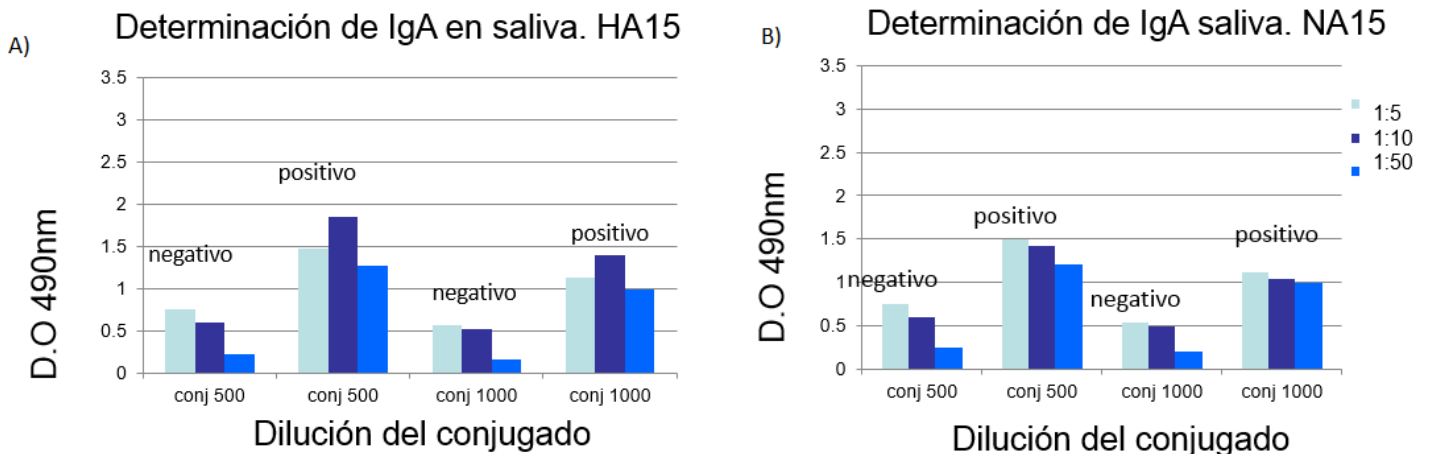


Figura 4: ELISA para la detección de IgA en muestras de saliva positivas y negativas trabajadas en diluciones 1:5 (□), 1:10 (■) y 1:50 (■); el conjugado se usó 1:500 y 1:1000. Resultados para HA15 (A) y NA15 (B).

Se realizó el ELISA de las muestras de los grupos del INP, sin síntomas, con síntomas y post-brote, en el promedio de las absorbancias de los grupos no se encontraron diferencias significativas (cuadro 3 y figura 5). El valor del punto de corte (PC) obtenido fue de 1.442 para NA15 y 1.700 para HA15, rangos utilizados para clasificar a las muestras como positivas (arriba del PC) o negativas.

	HA15	DE	NA15	DE
	PROMEDIOS			
INP (negativos)	0.7874	0.456	0.760	0.341
sin síntomas	0.843	0.582	0.741	0.573
con síntomas	1.050	0.730	0.949	0.671
post-brote	0.881	0.701	0.845	0.636

Cuadro 3. Resultados del ELISA para los diferentes grupos analizados. Se muestran los promedios de las absorbancias de cada grupo y la desviación estándar (DE).

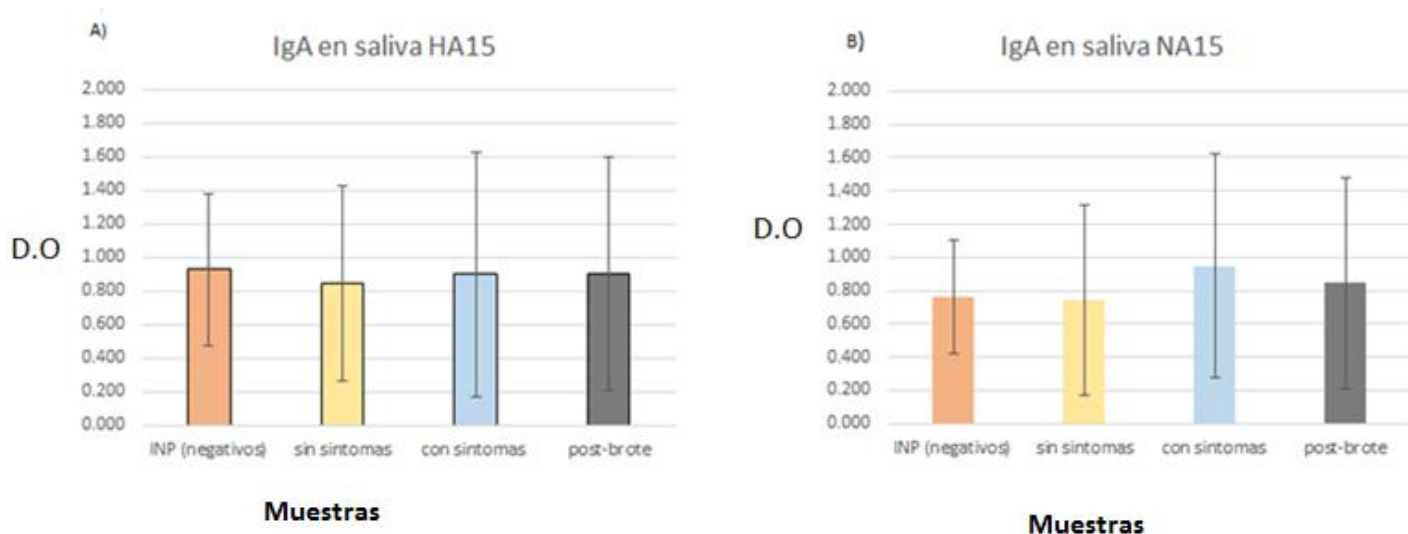


Figura 5: Resultados del ELISA para detección de anticuerpos IgA de los grupos sin síntomas, con síntomas, post-brote y negativos. En A se muestran los resultados cuando se utilizó el péptido HA15 y en B con el péptido NA15. Se graficó el promedio y la desviación estándar.

7.2 Datos poblacionales.

Algunas de las preguntas que se hicieron en el cuestionario que se aplicó a los participantes del estudio para conocer a la población fueron: edad, peso, talla, si padecían alguna

enfermedad, sin eran fumadores, y si convivieron con personas enfermas de gripa. Con esos datos, se obtuvo un panorama general de las condiciones de salud de los participantes, además se calculó el índice de masa corporal.

Se analizaron 1147 muestras de saliva obtenidas de habitantes del Distrito Federal, 437 muestras correspondieron a hombres (38%) y 710 muestras correspondieron a mujeres (61.90%). Los participantes encuestados se encontraban en un rango de 15 a 90 años de edad. La mayoría estaba entre los 31 y 60 años, siendo la edad promedio de la población de 47 años (cuadro 4).

rango de edad	Sexo		frecuencia	(%)
	hombre	mujer		
15 a 20	37	21	58	5
21 a 30	64	85	149	13
31 a 40	82	153	235	20.5
41 a 50	68	159	227	19.8
51 a 60	81	140	221	19.3
61 a 70	67	91	158	13.8
71 a 90	38	61	99	8.6
Total	437	710	1147	100

Cuadro 4. Frecuencia de edades y sexo de los participantes del estudio.

El 33.9% de los encuestados dijo padecer alguna enfermedad como: asma (1.4%), diabetes (10.1%), hipertensión (15.9%), cáncer (0.7%), enfisema (0.1%), alergias (3.6%) y enfermedades autoinmunes (2.1%). Del total de los participantes, el 78.3% dijo no haberse aplicado la vacuna contra influenza y el 21.7% dijo que sí. Respecto al índice de Masa Corporal (IMC) calculado, se observó que 487 individuos (42.5 %) tenía sobre peso y 317 (27.6%) obesidad. Sólo 332 individuos (28.9%) de la población estuvieron dentro del rango normal de peso y 11 (1%) tenía bajo peso. En cuanto a la convivencia con personas que se enfermaron de influenza, el 27.9% de los individuos del estudio dijo haber estado cerca de una persona con síntomas característicos de la influenza. El 29.3% de los voluntarios dijeron ser fumadores.

7.3 Resultado del ELISA en la muestra poblacional.

Se analizaron 1147 muestras de saliva por medio del ELISA. Para el caso del péptido HA15, 98 muestras fueron positivas (8.6%) y 126 (11%) para el péptido NA15 (cuadro 5).

Péptido	Número de muestras	% Positivos
HA15	98	8.6%
NA15	126	11%

Cuadro 5: Porcentaje de muestras positivas para la determinación de anticuerpos IgA contra los péptidos HA15 y NA15 del virus de influenza AH1N1 en saliva de habitantes de tres delegaciones del Distrito Federal.

Se encontró que los porcentajes más altos de personas positivas a la presencia de anticuerpos contra NA15 y HA15, estuvieron en el rango de edad que va de 41 a 60 años, sin embargo, en este estudio, no existió asociación significativa entre edad y ser positivo a producción de anticuerpos (cuadro 6).

Rango de edad	Resultado	
	HA15 Positivo (%)	NA15 Positivo (%)
15 a 20	4.1	5.6
21 a 30	6.1	11.9
31 a 40	15.3	20.6
41 a 50	22.4	19
51 a 60	21.4	17.5
61 a 70	16.3	14.3
71 a 90	14.3	11.1

Cuadro 6: Comparación de individuos positivos a anticuerpos IgA en saliva contra los péptidos HA15 y NA15 del virus AH1N1 por grupo de edad. En negritas se muestran los grupos donde hubo mayor presencia de anticuerpos.

En el caso de las personas con obesidad y sobrepeso, se observó que fueron positivos en la producción de anticuerpos contra ambos péptidos, ya que del total de personas con sobrepeso, el 37.8 % fue positivo para HA15 y el 44.4% para NA15. Mientras que en las personas con obesidad, el 37.8% fue positivo para HA15 y el 30.2% para NA15 y (cuadro 7). Sin embargo no hubo diferencias estadísticas.

	POSITIVO A NA15	POSITIVO A HA15
SOBREPESO	44.4%	37.8%
OBESIDAD	30.2%	37.8%

Cuadro 7: Porcentaje de positividad a HA15 Y NA15 según el índice de masa corporal de los participantes.

En los participantes que mencionaron padecer asma, diabetes, hipertensión, cáncer, enfisema, alergias y enfermedades autoinmunes no se encontró ninguna relación con el desarrollo de anticuerpos IgA contra los dos péptidos probados. Por otro lado, haber estado cerca de una persona enferma resultó ser un factor que estuvo relacionado con la producción de anticuerpos, al igual que el hábito de consumir tabaco.

7.4 Factores asociados a la presencia de anticuerpos contra el virus AH1N1

En el presente estudio se utilizó el método de razón de momios para conocer si existió asociación entre la presencia de anticuerpos IgA contra los péptidos HA15 y NA15 del virus de influenza con alguno de los factores poblacionales estudiados. Se encontraron dos factores asociados a la producción de anticuerpos: ser fumador y haber estado cerca de una persona enferma de gripa (cuadro 8).

Factor	Frecuencia	% de positivos	χ^2	α	RM	Positivo a
Sí fuma	336	37.3	4.323	0.038	1.5	NA15
Sí estuvo cerca de alguien con gripa	320	17.5	5.740	0.017	0.52	HA15

Cuadro 8. Factores asociados a la presencia de anticuerpos IgA contra péptidos del virus de influenza AH1N1. Se muestra el valor de chi cuadrado (χ^2), el valor de la significancia (α), la razón de momios (RM) y el péptido al que resultó positivo.

En este estudio, ser fumador estuvo asociado al desarrollo de anticuerpos anti NA15. Del total de los encuestados, 336 dijeron sí fumar y el 37.3% de los fumadores resultaron ser positivos a la producción de anticuerpos contra dicho péptido. De acuerdo a la prueba de razón de momios, la probabilidad de generar anticuerpos IgA contra NA15 es 1.5 veces

mayor en los fumadores que en los no fumadores. (RM= 1.5), esto se ve reafirmado con el valor de $p = 0.038$ en el análisis de chi cuadrada.

En cuanto a la frecuencia de individuos que dijeron haber estado cerca de alguna persona con gripa, del total de los encuestados, 320 dijeron que sí y el 17.5% de ellos fueron positivos a la presencia de anticuerpos anti HA15 (RM= 0.52, $p=0.017$), esto quiere decir que las personas que estuvieron cerca de individuos con gripa tuvieron 0.5 veces más probabilidad de generar anticuerpos contra el péptido HA15.

8. Discusión

8.1 ELISA

El uso de saliva ha sido aplicado para detectar anticuerpos específicos para distintos agentes infecciosos, por ejemplo, se ha reportado la detección de IgA en saliva contra el virus de hepatitis, para *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae* y *Taenia solium* en humanos por medio de ELISA (Romagosa *et al.*, 2012). Para el caso del dengue se ha reportado una sensibilidad del 70 al 92% en la detección de IgA en saliva para el diagnóstico temprano de la enfermedad (Yap *et al.*, 2011). El método que hemos desarrollado recientemente, utilizando la prueba de ELISA, exhibe el potencial de servir como una herramienta que puede ser empleada en estudios epidemiológicos usando la saliva como reactivo biológica para la búsqueda de anticuerpos específicos contra el virus. Además, los anticuerpos IgA del tracto respiratorio juegan un papel importante en la defensa contra el virus debido a que proveen protección cruzada contra diferentes variantes del virus de influenza tipo A (Tamura *et al.*, 2004). En un estudio reportado recientemente, se demostró el potencial neutralizante de los anticuerpos IgA contra virus de influenza estacional en muestras nasales de adultos sanos que recibieron vacuna contra influenza (Tadaki *et al.*, 2015)

8.2 Datos Poblacionales:

Previamente al presente trabajo de investigación, se aplicó un cuestionario a los participantes, el cual permitió conocer algunas características relevantes de la muestra de los habitantes de CDMX seleccionados. En este estudio como en otras encuestas de salud que se han realizado, hubo una mayor participación de mujeres, el 62% de los participantes fueron mujeres y el 38% correspondió a los hombres; éstos datos variaron un poco con respecto a la información poblacional reportada por el INEGI para la CDMX en el 2010, donde informó que el 47.8% de la población eran hombres y el 52.1% eran mujeres.

En cuanto a los datos de IMC (Índice de Masa Corporal) de la población, según reportes de la OMS, casi una tercera parte de los adultos mexicanos son obesos, esto se ve reflejado en

nuestra población de estudio, ya que 70.1% tenían sobrepeso y/u obesidad. En cuanto a las enfermedades reportadas en el grupo de estudio, el 33.9% de la población mencionó que tenían algún padecimiento, las de mayor frecuencia fueron hipertensión y diabetes, enfermedades altamente relacionadas con el sobrepeso, y en estudios previos se ha visto que constituyen un factor de riesgo que aumenta la probabilidad de contraer el virus de influenza. El estudio de Van Kerhove y colaboradores (2011) enfocado a buscar factores de riesgo asociados con la presentación grave de influenza, hospitalización, y/o muerte, reportó en su investigación que la población obesa presentó una RM de 2.9 veces mayor en el agravamiento de la enfermedad en comparación con la población en general. De igual manera, describen que el riesgo de muerte por influenza aumenta estando asociado a obesidad mórbida. En una investigación realizada en Australia, Jen y colaboradores (2013), reportaron que los pacientes con obesidad tienen más probabilidad de desarrollar neumonía en comparación con los pacientes no obesos. Estas investigaciones pueden apoyar lo que se reporta en el presente trabajo, ya que en este estudio, los participantes con obesidad no presentaron asociación significativa con la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza.

Ahora bien, como se ha mencionado anteriormente, el virus de la influenza A se caracteriza por causar enfermedad moderada a grave y tiende a afectar a todos los grupos etarios, sin embargo, se ha reportado que las personas jóvenes son más vulnerables al virus, debido a que no han tenido experiencia previa o contacto con virus similares al nuevo virus AH1N1 (Fajardo *et al.*, 2009). En México, según reportes realizados por el InDRE, en la temporada alta de influenza 2015-2016, el grupo etario con más número de casos es el de personas de 35 a 65 años, seguido de personas de 30 a 34 años y de 25 a 29 años. En este estudio, la edad promedio de los encuestados fue de 47 años, ninguna de las personas encuestadas dijo haberse enfermado de influenza durante la epidemia y las personas que presentaron anticuerpos contra los dos péptidos del virus de influenza estuvieron en el rango de edad de 31 a 40, seguido de los 41 a 60 años, seguido de los de 61 a 70, y 71 a 90 años, aunque no se encontró asociación entre la edad y el desarrollo de anticuerpos.

En una investigación sobre la evolución del virus de influenza, se describe que el virus AH1N1 afecta principalmente a la población joven debido a que no cuentan con memoria inmunológica ante este tipo de virus, es decir, no tienen experiencia previa de exposición al mismo (Hay *et al.*, 2001). Esto ocurre puesto que el virus desaparece de forma temporal y después tiene una repentina reaparición, un ejemplo es lo ocurrido en el año 1950, cuando un virus tipo AH1N1 circulaba alrededor del mundo, después estuvo ausente de la población humana cerca de 20 años y reapareció en 1977. Como consecuencia de esta relación, las personas de edad de 27 años o más que habían tenido exposición previa a este virus, tenían

inmunidad sustancial a esta infección, y por eso la enfermedad atacó principalmente a los jóvenes. Este nivel de inmunoprotección en grupos de mayor edad, se determina por su nivel de experiencia previa con virus similares al que emerge. En otro estudio, Reichert (2012) mencionó la existencia de una línea temporal de las personas que se han salvado del virus en las últimas pandemias según la edad; por ejemplo, personas de 45 a 55 años de edad se salvaron en 1918 de la cepa AH1N1, personas mayores de 26 años se salvaron en la reaparición del virus H1N1 en 1977-1978 y en la pandemia de 2009 por H1N1 el mayor número de personas que se salvaron eran mayores a 62 años.

Algo similar se observó en la pandemia de 2009, en donde la población de más edad se vio menos afectada, por consiguiente, parece que una proporción significativa de individuos por encima de un determinado umbral de edad estuvieron inmunológicamente protegidos contra el virus emergente y es por esta razón que la población joven resultó ser la más afectada durante la pandemia. En nuestro estudio se observó que el mayor número de individuos que desarrollaron anticuerpos contra los péptidos HA15 y NA15 del virus AH1N1 fueron mayores a 30 años y los porcentajes más altos de positividad estuvieron en los grupos de 41 a 60 años de edad.

8.3 Factores poblacionales asociados a la presencia de anticuerpos contra dos péptidos del virus AH1N1

En los resultados del estudio se mencionó que existe una relación directa entre producir anticuerpos contra el péptido HA15 y convivir con personas con gripa. Las personas que conviven frecuentemente con enfermos de gripa o influenza, como son los médicos, enfermeras, trabajadores sanitarios y los familiares de los pacientes infectados son consideradas un grupo de riesgo específico, debido a la constante exposición que tienen al virus. En un estudio reportado por Sandoval y colaboradores se puede apreciar la relación entre estos factores, ya que se midió la cantidad de anticuerpos en trabajadores de la salud que estaban en contacto con enfermos en la sala de emergencia, y en quirófanos; las muestras fueron tomadas tres semanas después de finalizar el periodo de pandemia (última semana de noviembre de 2009) y antes de la campaña de vacunación de marzo de 2010. Los títulos de anticuerpos fueron medidos por inhibición de la hemaglutinación y ambos grupos mostraron mayor cantidad en los niveles de anticuerpos comparado con la población en general, sin embargo el personal de la sala de emergencias mostró títulos más elevados de anticuerpos específicos contra el virus H1N1 del 2009 (Sandoval *et al.*, 2016).

Por otra parte, las personas que convivieron con individuos que presentaron gripe durante la pandemia, afirmaron haberse aplicado la vacuna contra influenza. En varios estudios se

ha reportado que quienes se vacunan tienden a presentar títulos elevados de anticuerpos contra el virus después de la inmunización. En la investigación reportada por Strengell (2012), se evaluó la respuesta de anticuerpos en profesionales de la salud que trabajaban con pacientes infectados, se observó que 21 días después de aplicar la vacuna, los títulos de anticuerpos medidos por inhibición de la hemaglutinación habían aumentado notablemente y se concluyó que hubo protección. Un año después, al aplicar la vacuna de influenza estacional, se incrementó el título de anticuerpos. Este tipo de estudios demuestran que las personas que están en contacto con individuos infectados o con síntomas de influenza tienen mayor riesgo de exposición al virus y desarrollan una mayor respuesta de anticuerpos, lo que apoya nuestra investigación, ya que encontramos una asociación directa con ser positivo a la producción de HA15.

Ahora bien, refiriéndonos a la población que consume tabaco, el 29.3% de los voluntarios dijeron ser fumadores y este factor estuvo asociado a la producción de anticuerpos contra el péptido NA15. Está reportado que fumar cigarrillos está asociado con el incremento a la susceptibilidad de contraer influenza, probablemente por la baja regulación de la respuesta inflamatoria primaria del hospedero. Una investigación realizada para analizar la sintomatología clínica en los pacientes con influenza durante la pandemia de 1969, encontró que la incidencia de infecciones sintomáticas y asintomáticas fue mayor en jóvenes fumadores frecuentes (Wong *et al.*, 2013). También reportaron que la tendencia de mortalidad por influenza es mayor en fumadores frecuentes y ex fumadores que en personas que nunca han fumado, además de que se sabe que el humo de tabaco y muchos de sus componentes ocasionan cambios estructurales en el aparato respiratorio (inflamación y fibrosis peribronquiolar, disminución de las mucosas, disrupción del epitelio respiratorio) que predisponen al desarrollo de infecciones respiratorias, ya que suprimen la inmunidad contra infecciones de influenza y otros virus (Wong *et al.*, 2013). Sin embargo, en la presente investigación se reporta que fumar es un factor que favorece la producción de anticuerpos anti NA15, ya que el 37.7% de los fumadores, fueron positivos para producir anticuerpos contra este péptido. Un resultado similar al nuestro se reportó en un trabajo de investigación realizado por Cruiff y colaboradores en 1999, en el que se examinó la eficacia de la vacuna y el desarrollo de influenza en grupos de fumadores y no fumadores, encontrando que los fumadores que se habían vacunado presentaban menos incidencia de influenza que los no fumadores. Una explicación que dan los autores a este hecho, es que los fumadores tienden a desarrollar una mejor protección inmunológica después de la vacunación, resultando en una baja incidencia de influenza comparada con los no fumadores. Esta idea apoya nuestro estudio, siendo importante resaltar que en nuestra población, las 336 personas que dijeron sí ser fumadoras, 249 también afirmaron haberse aplicado la última vacuna contra influenza. Además de esto, Cruiff y colaboradores (1998)

mencionaron que aunque la respuesta de anticuerpos en suero contra influenza es más alta en fumadores durante los primeros tres meses después de la inmunización, esos niveles tienden a disminuir de manera importante después de un año, comparado con los no fumadores.

En otra investigación se estudió la relación entre fumar y la respuesta de anticuerpos séricos por inhibición de la hemaglutinación contra el virus de influenza después de la vacunación. Los títulos de anticuerpos fueron más altos en los fumadores que en los no fumadores. Una explicación que dan los autores es que esto se debe probablemente a que los fumadores tienden a sufrir infecciones subclínicas más frecuentes, por lo tanto desarrollan mayor cantidad de anticuerpos (Finklea *et al.*, 1971).

9. Conclusiones

- La saliva puede ser un buen reactivo biológico para la búsqueda de anticuerpos específicos.
- Los péptidos HA15 y NA15 del virus AH1N1 pueden utilizarse en sistemas de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos IgA en fluidos orales.
- Las personas con mayor cantidad de anticuerpos IgA contra el virus AH1N1 fueron los adultos, cuyas edades oscilaron de los 41 a 60 años de edad.
- Se analizaron 1147 muestras de saliva por medio del ELISA. Para el caso del péptido HA15 98 muestras fueron positivas (8.6%) y 126 (11%) para el péptido NA15.
- Ser fumador fue un factor asociado a la producción de anticuerpos contra el péptido NA15 del virus de influenza tipo AH1N1 en la población analizada de CDMX
- Haber estado cerca de una persona con gripa fue un factor asociado a la producción de anticuerpos contra el péptido HA15 del virus de influenza tipo AH1N1 en la población analizada de CDMX

BIBLIOGRAFÍA:

1. (CDC) Centros para el Control y Prevención de Enfermedades [En línea]; 19 de agosto de 2015. Los síntomas y la gravedad de la influenza. Disponible en <http://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/disease/symptoms.htm>
2. Castro CL, Llaca DJ, Pérez ChF, Hem D, Gómez EI, Flores AA. Estudio comparativo entre una prueba rápida y RT-PCR tiempo real en el diagnóstico de influenza AH1N1 2009. *Influenza: prueba rápida y RT-PCR tiempo real*. 2009 (53): 329-333.
3. Cheng VC, To KK, Tse H, Hung IF, Yuen KY. Two years after pandemic influenza A/2009/H1N1: What have we learned? *Clin Microbiol*. 2012; 25(2):223-63.
4. Childers NK, Greenleaf C, Li F, Dasanayake AP, Powell WD, Michalek SM. Effect of age on immunoglobulin A subclass distribution I human parotid saliva. *Oral Microbiol Immunol*. 2003; 18(5): 298-301.
5. Finklea JF, Victor H, Riggan WB, Nelson WC, Hammer DI, Newill VA. Cigarette Smoking and Hemagglutination Inhibition Response to Influenza after Natural Disease and Immunization. *American Review of Respiratory Disease*. 1971; 104 (3): 368-376.
6. Dhakad S, Mali PC, Kaushik S, Lal AA, Broor S. Comparison of multiplex RT-PCR with virus isolation for detection, typing and sub-typing of influenza virus from influenza-like illness cases. *Indian J Med Microbiol*. 2015; 33(1):73-7.
7. ELUNIVERSAL
<http://www.eluniversal.com.mx/articulo/nacion/sociedad/2016/02/19/ssa-activa-protocolo-contra-la-influenza-febrero-2016>.
8. Fajardo DG, Hernandez TF, Santacruz VJ, Rodríguez SJ, Lamy OP, Arboleya CH, et.al. Perfil epidemiológico de la mortalidad de la Influenza Humana AH1N1 en México. *Salud Pública Mex*; 2009; 51:361-371.
9. Garske T, Legrand J , Donnelly Ch , Ward H , Cauchemez S, Fraser Ch. Assessing the severity of novel influenza A(H1N1) pandemic. *Research methods and reporting*. *BMJ* 2009; 339:b2840
10. Hay AJ, Gregory V, Douglas AR, Lin YP. The evolution of human influenza viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001; 356(1416): 1861–1870.
11. <http://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/disease/symptoms.htm> [En línea]. 2016

12. <http://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/disease/symptoms.htm> Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). 2015
13. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/2015/influenza/influenza15_05.html [En línea]. 2015
14. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/informesh/2014/influenza/influenza14_28.html [En línea]
15. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/informes/informesh/2014/influenza/influenza14_40.html [En línea]
16. James M, James L, Orenstein W, Watson M. Prevention and control of Influenza. Recommendations of the advisory committee on immunization Practices (ACIP). National Center of Infectious Diseases. 2003; 51 (RR-3)1-31.
17. Jen K, Christopher C, Hong F, Michael J, David V, Steven A, Ian M, Dominic E, Jonathan R. 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. Epub 2013.
18. Kreijtz JH, Fouchier RA, Rimmel GF. Immune responses to influenza virus infection. Virus Research. 2011; 162, 19 - 30.
19. Mancipe JL, Ramírez NG, Jaime CJ, Vera AV. Cultivos celulares como alternativa para el aislamiento y la producción de biológicos contra el virus de influenza. 2011; (9): 83-93.
20. Montoya VH. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2008. pp 129.
21. Paredes F, Rodríguez M, Santos P. Aspectos Clínicos y Epidemiológicos de la Influenza. CIMEL. 2006; (11): 27-34.
22. Prevention and control of Influenza. Recommendations of the advisory committee on immunization Practices (ACIP). National Center of Infectious Diseases. 2003.
23. Rafart JV, Julieta GC, María BA. Principales características de la pandemia por el nuevo virus influenza A (H1N1). Medicina Clínica. 2009; 133(13): 513-521.

24. Reichert T, Chowell G, McCullers J. The age distribution of mortality due to influenza: pandemic and peri-pandemic. *BMC Med.* 2012. 12; 10:162. doi: 10.1186/1741-7015-10-162.
25. Rojas EKM. Presencia de anticuerpos IgG contra virus de influenza AH1N1 en una población de tres delegaciones políticas del Distrito Federal. 2014. Tesis de Licenciatura, QFB, Facultad de estudios Superiores de Cuahutitlán.
26. Romagosa A, Gramer M, Joo HS, Torremorell M. Sensivity of oral fluids for detecting influenza A virus in populations of vaccinated and non-vaccinated pigs. *Influenza and Other Respiratory Viruses.* 2012; 6(2): 110–118.
27. Romero JM. Salud y medicina [En línea] // <http://es.slideshare.net/cuantaciencia/estructura-del-virus-de-la-gripe> (2009)
28. Sandoval C, Barrera A, Ferrés M, Cerda J, Retamal J, García-Sastre A, et al. Infection in Health Personnel with High and Low Levels of Exposure in a Hospital Setting during the H1N1 2009 Influenza A Pandemic. *PLoS ONE* 2015.11(1): e0147271.
29. Siachoque M. H. Inmunología. Diagnóstico e interpretación de pruebas de laboratorio. Colección Lecciones de Medicina. 200; 20-26.
30. Strengell M, Ikonen N, Ziegler T, Kantele A, Anttila VJ, Julkunen I. Antibody responses against influenza A(H1N1)pdm09 virus after sequential vaccination with pandemic and seasonal influenza vaccines in Finnish healthcare professionals. *Influenza Other Respir Viruses.* 2012; 7(3):431-8.
31. Tadaki S, Akira K, Akira A, Shin-ichi T, Ryo I, Pretty M, et al. Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus. *PNAS.* 2015; 112 (25):7809–7814.
32. Tamura S, Kurata T. Defense Mechanisms against Influenza Virus Infection in the Respiratory Tract Mucosa. *Jpn J Infect Dis.* 2004; 57 (6):236-47.
33. Van Kerhove MD, Vandemaele KA, Shinde V, Jaramillo G. G, Koukounari A, Donnelly CA. Risk Factors for Severe Outcomes following 2009 influenza A(H1N1) infection: A global Pooled Analysis. *PLoS Med.* 2011 8(7):e1001053.

34. Vega E. INFLUENZA, ¿Por qué algunos mueren? Ciencia y cultura elementos, 2009.16 (75): 53-60.
35. Wong CM, Yang L, Chan KP, Chan WM, Song L, Lai HK, Thach TQ, Ho LM, Chan KH, Lam TH, Peiris JS. Cigarette smoking as a risk factor for influenza-associated mortality: evidence from an elderly cohort. Influenza Other Respiratory Viruses. 2013; 7(4): 531-539.
36. Yap G, Sil BK, Nq LC. Use of Saliva for Early Dengue Diagnosis. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(5): e1046. doi: 10.1371/journal.pntd.0001046.

ANEXOS.

Anexo 1: Estructura secuencial reportada de HA del virus AH1N1. En rojo se encuentra marcado el péptido HA15

MKAILVLLY TFATANADTL CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNIL EDKHNGKLCK
LRGVAPLHLG KCNIAGWILG NPECESLSTA SSWSYIVETS SSDNGTCYPG DFIDYEELRE
QLSSVSSFER FEIFPKTSSW PNHDSNKGVT AACPHAGAKS FYKNLIWLVK KGNSYPKLSK
SYINDKGKEV LVLWGIHPS TSADQQSLYQ NADAYVFGS SRYSKKFKPE IAIRPKVRDQ
EGRMNY**YWTLVEP**GDKITFE ATGNLVVPY AFAMERNAGS GIIISDTPVH DCNTTCQTPK
GAINSLPFQ NIHPITIGKC PKYVKSTKLR LATGLRNVPS IQSRGLFGAI AGFIEGGWTG
MVDGWYGYHH QNEQSGSYAADLKSTQNAID EITNKVNSVI EKMNTQFTAV GKEFNHLEKR
IENLNKKVDD GFLDIWTYNA ELLVLENER TLDYHDSNVK NLYEKVRSQL KNNAKEIGNG
CFEFYHKCDN TCMESVKNGTYPKYSEEAKLNKEEIDGV KLESTRIYQI LAIYSTVASS
LVLVSLGAI SFWMCSNGSLQCRICI

Anexo 2: Estructura secuencial reportada de NA del virus AH1N1. En rojo se encuentra marcado el péptido NA15

MNPNQKIITIGSVCM TIGMANLILQIGNIISIWISHSIQLGNQNIETCNQSVITYENNTWVNQTYV
NISNTNFAAGQSVSVKLAGNSSLCPVSGWAIYSKDNSIRIGSKGDVVFVIREPFISCSPLCRT
FFLTQGALLNDKHSNGTIKDRSPYRTLMSCPIGEVPSPYNSRFESVAWSASACHDGINWLTI
GISGPDNGAVAVLKYNGIITDTIKSWRNILRTQESECACVNGSCFTVMTDGPSNGQASYK
ILRIEKGKIVKSVEMNAPNYHYEECSYCPD**SEITCVCR**DNWHGSNRPWVSFNQNLEYQIG
YICSGIFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFYNGVWIGRTKISSRNGFEMIW
DPNGWTGTDNNSIKQDIVGINEWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPKENTI
WTSGSSISFCGVNSDTVGVSWPDGAELPFTIDK