



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio de corte para La detección del virus de influenza
y su relación con factores de riesgo y ambientales**

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:

SOPHIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA EUGENIA MANJARREZ ZAVALA
2013**



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.

1. Datos del alumno

**González
Martínez
Sophia
5534250658
55544255
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
091325307**

2. Datos del tutor

**Dra.
Manjarrez
Zavala
María
Eugenia**

3. Datos del 1^{er} propietario

**Dr.
Bernardo
Pérez
Zamorano**

4. Datos del 2^o propietario

**M en C.
Anjarath Lorena
Higuera
Iglesias**

5. Datos del 1^{er} suplente

**Dr.
Carlos
Cabello
Gutiérrez**

6. Datos del 2^o suplente

**M en C.
José Ignacio
De la Mora
De la Mora**

7. Datos del trabajo escrito

**Estudio de corte para La detección del virus de influenza y su relación con factores de riesgo y ambientales
84 p.
2013**

Dedicatoria

A mis padres

Ing. Jorge Manuel González y Vicente

Por su apoyo incondicional durante toda mi formación académica.

Amalia Martínez Aguilar

Por sus palabras de aliento

A mi esposo

Eduardo Terrazas Lugo

Por su apoyo, esfuerzo y paciencia durante la elaboración de este trabajo.

A mi hija

Michelle Terrazas González

Por ser mi motivo para seguir adelante

Agradecimientos

Agradezco a mi hermana Ruth González Martínez por todos sus consejos y palabras de aliento. A mi asesora Dra. María Eugenia Manjarrez Zavala por los conocimientos, apoyo y paciencia para la elaboración de esta tesis. A la M en C. Anjarath Lorena Higuera Iglesias por su aportación en la elaboración del análisis estadístico. A mis sinodales Dr. Carlos Cabello Gutiérrez, Dr. Bernardo Pérez Zamorano y M en C. Ignacio de la Mora de la Mora por su tiempo y útiles consejos. Por último quiero agradecer a mis compañeros de carrera Alma D. Hernández Pérez y Marco Antonio Briones Orta por ser los mejores compañeros, por su apoyo y por recorrer a mi lado las enseñanzas de la carrera.

Índice

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	9
CLASIFICACIÓN	14
CARACTERÍSTICAS VIRALES	17
CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL	21
MECANISMOS DE VARIACIÓN	23
Deriva antigénica o drift	23
Cambio antigénico o shift	23
EPIDEMIOLOGÍA	24
PERCEPCIONES FUTURAS	32
FORMA DE TRANSMISIÓN	34
PATOLOGÍA	35
CUADRO CLÍNICO	35
INMUNOLOGÍA	39
TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN	40
FORMAS MÁS COMUNES PARA AISLAR AL VIRUS DE INFLUENZA	44
DIFERENCIA DE GÉNERO Y ENFERMEDADES RESPIRATORIAS	47
EL VIRUS DE INFLUENZA Y LA CONTAMINACIÓN	49
PROBLEMA	52
OBJETIVO GENERAL	53
OBJETIVOS PARTICULARES	53
MATERIAL Y MÉTODO	54
Población de estudio y toma de muestras	54
Inoculación en embriones de pollo.....	57
Detección del virus de influenza por hemaglutinación	60
<i>Estandarización de eritrocitos</i>	60
<i>Hemaglutinación</i>	60
Análisis estadístico	61
RESULTADOS	62
DISCUSIÓN	68

CONCLUSIONES	74
PERSPECTIVAS	75
APÉNDICE 1: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	77
APÉNDICE 2: ABREVIATURAS.....	78
REFERENCIAS.....	80

Resumen

La influenza, enfermedad causada por el virus del mismo nombre, es altamente contagiosa. El virus se caracteriza por poder generar epidemias y pandemias con altos niveles de mortalidad. Tiene la capacidad de infectar diferentes animales incluyendo al humano. El objetivo principal de este estudio fue: Conocer la incidencia del virus de influenza en una población de niños de entre 8 a 12 años con un cuadro de IRA (infección respiratoria aguda), al sur de la Ciudad de México durante noviembre de 1999 a febrero del 2001. A los niños con IRA se les tomaron muestras de aspirado nasofaríngeo, que fueron inoculadas en embriones de pollo de 9 a 11 días en las cavidades amniótica y alantoidea. Los líquidos obtenidos fueron analizados por el método de hemaglutinación para el virus de influenza y para otros virus causantes de IRA. Se midieron las incidencias por grupo de edad, sexo, periodo y síntomas. Se aplicó la prueba de Chi^2 y se calculó el valor de P. Se encontró un 44.49% de eventos positivos para el virus de influenza y 55.51% para otros agentes causantes de IRA. En la población femenina se encontró la mayor incidencia de casos tanto para el virus de influenza como para otros agentes. El grupo de edad más afectado fue el de 9 años. Uno de los síntomas significativos para el virus de influenza fue la ronquera. Se encontró que durante un año se podían presentarse más de una infección con el virus de influenza en un mismo individuo. En relación a las estaciones del año, en invierno se observó un incremento del virus, pero se observaron otros incrementos en primavera y en otoño. También se realizó una comparación de la incidencia del virus de influenza con el fenómeno de inversión térmica, encontrando una relación entre estos. El virus de influenza es complejo y al parecer no se puede evitar que cause epidemias y pandemias, pero conocer más sobre su biología y relación con otros factores podría ayudar a diseñar estrategias para su mejor control.

Introducción:

El término influenza, fue utilizado por siglos para describir enfermedades respiratorias causadas por bacterias, virus, hongos, protozoarios u otros agentes infecciosos de las vías respiratorias, ya que los patógenos eran nombrados por los síntomas y la enfermedad que causaban ¹. Actualmente se sabe que el virus de influenza es el agente causante de la enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa conocida como influenza ². Esta enfermedad ha estado continuamente presente en el mundo por lo menos en los últimos siglos ²⁰.

La influenza, es una enfermedad viral respiratoria altamente contagiosa que se propaga de un individuo a otro por el aire en forma de pequeñas gotas de saliva al toser o estornudar; una vez expuesto al agente infeccioso el virus se incuba en el individuo de veinticuatro horas a cuatro o cinco días antes de presentar la enfermedad. Sus síntomas son semejantes a los del resfriado común: odinofagia, tos, rinorrea, fiebre, mialgias y debilidad así como anorexia. Todos estos síntomas pueden variar en severidad y usualmente las víctimas se recuperan. La influenza se caracteriza por presentar altos índices de morbilidad y una mortalidad relativamente baja durante los episodios epidémicos. El 80% de las muertes relacionadas al virus de influenza ocurren en personas mayores de 60 años, las cuales generalmente están asociadas con infecciones bacterianas secundarias, sin embargo el riesgo también está presente en pacientes de cualquier edad que sufran enfermedades crónicas del corazón, pulmones, riñones, o hígado; en niños con enfermedades congénitas o cualquier persona la cual haya sido sometida a un trasplante de órganos o afectada con alguna enfermedad como la diabetes o enfermedades inmunodepresora como con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El virus de la influenza tiene la capacidad de

infectar a humanos y animales como a mamíferos y aves. En general la influenza es una enfermedad estacional en latitudes templadas, con picos infecciosos anuales predecibles durante los meses de invierno ^{18, 20, 21}.

Debido a la capacidad del virus de influenza de saltar la barrera de especie, mutando e infectando al hombre desde el pollo o el cerdo generalmente, se convierte en un agente altamente pandémico. El termino Pandemia proviene del griego *pan*=todos *demos*=gente y se ha utilizado para definir una epidemia producida por un agente infeccioso el cual se propaga en la población atravesando grandes regiones, como continentes o incluso a nivel global. Las pandemias del virus de influenza se desarrollan en etapas y pueden provocar una desestabilización social y económica a nivel mundial, esto es provocado en parte por las altas tasas de mortalidad que pueden llegar a presentarse, sin embargo también es la consecuencia de las reacciones de miedo, histeria y pánico que se producen en la población. Anteriormente, la influenza era transportada por las personas contagiadas a lo largo de las carreteras o los transportes acuáticos, así la pandemia se esparcía a grandes distancias en cuestión de meses o posiblemente años. En la actualidad, la apertura a nuevas vías de comunicación, permite que la influenza alcance destinos lejanos en pocas horas. Esto facilita el escenario para la diseminación de una pandemia y la hace difícil de contener. Por lo anterior, el brote de una pandemia de influenza debe de ser detectado y contenido rápidamente, ya que de lo contrario puede causar altas tasas de morbilidad y mortalidad, aunadas al alto costo económico que conllevan ^{14,17, 18}.

Antecedentes

El virus de influenza ha provocado epidemias y pandemias desde tiempos inmemorables ². La primera epidemia fue reportada por Hipócrates en el año 412 A.C., la cual se cree que se expandió por Grecia siguiendo una ruta por todo el oeste de Europa ¹. En la Edad Media debido al surgimiento de ciudades intensamente pobladas y sucias numerosos episodios fueron reportados ^{2, 12, 20}. En América, existen descripciones de una epidemia de influenza que se extendió desde México a Perú entre 1545 y 1547, otro episodio fue descrito en 1550; en 1552 en Texcoco se documentó un problema respiratorio severo que fue denominado “Pestilencia catarral” y a mediados de 1570 México fue violentamente atacado por la influenza, lo cual resulto como en una década catastrófica para América ^{12, 20}. No obstante la primera pandemia reconocida ocurrió en 1580, el origen de esta pandemia se localizó en Asia, de donde luego se extendió a Europa, África y el continente Americano ^{12, 21}. Robert Johnson, un médico de Filadelfia, es conocido como el primero que realizó una descripción del virus de influenza durante la epidemia de 1973 ²¹. Con esta descripción disponible y con las mejoras en las estadísticas del sistema de salud, fue posible documentar epidemias de influenza en 1833, 1837 y 1847. En 1889-1890 ²¹ en el tiempo en el que un sistema de transportación por medio de ríos se establecía en el nuevo continente y la velocidad en la cual los humanos se trasportaban por tierra y mar se incrementaba, la transmisión de enfermedades también aumentaba (entre ellas la peste, el cólera y sarampión). En este periodo se presentó una gran epidemia de influenza la cual causó una alta morbilidad y mortalidad, y según algunos autores excedió las muertes alcanzadas por el cólera en el siglo XIX. El virus de influenza afectó a millones de ancianos, lo cual no alteró el ritmo de la sociedad ²⁰.

Desde que el virus fue aislado por primera vez por Wilson Smith y colaboradores en 1933, la estimación de la extensión y el impacto causado por el virus de influenza son indirectos e imprecisos ^{4, 12}. Varias pandemias se han presentado en la actualidad (tabla 1), las consecuencias potenciales de una pandemia futura pueden ser juzgadas por el impacto de la pandemia de 1918-1919, que se conoció como Influenza Española, ya que en solo unos meses el virus de influenza causó más muertes que la primera guerra mundial. Se estima que solamente en Inglaterra y en Gales murieron 200,000 personas a causa del virus de influenza, estimándose así 40 millones de muertes en todo el mundo en menos de un año ^{5, 12, 21}, esto representó de dos a tres veces más el número de fallecimientos durante los cuatro años que duro la primera guerra mundial; ósea del 2.5 al 5% de la población global y se calcula que al menos 20% de la población mundial fue infectada con el virus de influenza A H1N1 ¹². También se han presentado casos de alta mortalidad como la epidemia en Inglaterra y Gales durante 1989-1990 ⁵, la epidemia en Hong Kong en 1997-1998 ³, la epidemia de 1998-1999 en Europa ⁶, o la epidemia de Hong Kong en el 2003 por el subtipo H5N1; en donde el virus se extendió a varios países de Asia y para febrero del 2006 se difundió al Medio Oriente, Europa y a África. Este nuevo virus causa una mortalidad alrededor del 50% de los individuos infectados, sin embargo el virus se ha limitado, ya que no ha adquirido la capacidad de transmisión sostenida entre humanos ^{12, 13, 21}. En el 2009 se presentó la primera pandemia del siglo XXI por el virus de influenza con el subtipo H1N1 ^{40, 41, 42, 43}.

Tabla 1. Pandemias y epidemias causadas por el virus de influenza ^{5,12,13,20,40,43}.

Nombre con que se dio a conocer	Año	Subtipo de Influenza A causante	Grupo de población más afectado	Número de muertes
Influenza Española (pandemia)	1918-1919	H1N1	Adultos y jóvenes	40 millones
Influenza Asiática (pandemia)	1957	H2N2	Adultos mayores	2 millones
Hong Kong (pandemia)	1968	H3N2	Adultos mayores	1 millón
Influenza Rusa (pandemia)	1977	H1N1	Menores de 18 años	
Epidemia en Hong Kong	1997 Resurge 2003-2006	H5N1	Transmisión de humano a humano ineficiente.	6 (de 18 infectados, 50% de mortalidad)
Emergencia de la cepa A/Fujian/411/2002 (H3N2)	2003-2004	H3N2	Personas mayores de 60 años y niños en cuidados maternos	
Influenza AH1N1 (2009)	2009	H1N1	Jóvenes, infantes y mujeres embarazadas	163

Se han descrito otros virus de influenza de origen aviar que han infectado a humanos como en China (H9N2), Holanda (H7N7) y Canadá (H7N3), en donde los pacientes fueron desde asintomáticos o con conjuntivitis hasta con trastornos respiratorios, presentándose un caso fatal en Holanda. En Italia se demostraron seroconversiones en individuos que estuvieron en contacto con aves infectadas por virus H7N1 y H7N2 de 1999 a 2003. Recientemente se describieron seroconversiones en Japón en trabajadores de granjas afectadas con el virus de H5N2 de baja patogenicidad ¹².

La influenza surge estacionalmente como una enfermedad endémica y puede resurgir en poblaciones que tienen una cierta inmunidad debido a exposiciones previas. Estas epidemias ocurren con relativa frecuencia, pero con intervalos irregulares, de tal manera que la enfermedad parece desaparecer por algunos periodos, haciéndose presente en otros; las epidemias varían en severidad, pero en personas de edad avanzada usualmente causan alta mortalidad ^{2,14}.

La rápida evaluación epidemiológica de la mortalidad y la morbilidad relacionadas con el virus de influenza sigue siendo un reto para la salud pública, debido a la no especificidad de los síntomas, la escasa confirmación de las pruebas de laboratorio y la dificultad para obtener datos continuos, representativos y con especificidad de la edad. Por lo anterior en la mayoría de los casos los aspectos clínicos de influenza son generalmente indistinguibles de aquellos causados por otros virus respiratorios que pueden estar circulando en la comunidad al mismo tiempo ^{2,3,22}.

La prevalencia del virus de influenza en la población provee información importante de su circulación y del impacto potencial en caso de un brote de influenza. Esta información podría ser usada para coordinar una respuesta apropiada de las instituciones de salud pública, incluyendo guías de información para la vacunación, tratamiento antiviral y un asesoramiento adecuado, dada la necesidad de recursos médicos adicionales. Las epidemias de influenza generalmente siguen un patrón característico: pequeños brotes aislados, seguidos por un incremento en el número de casos reportados, los cuales alcanzan un pico en la 3^{ra} o 4^{ta} semana y declinan después de un tiempo similar. El grupo más susceptible son los niños pequeños, los cuales son de los primeros grupos en ser afectados.

La ausencia de trabajo de investigación, la falta de admisión hospitalaria y la falta de reportes de las muertes relacionadas con el virus de influenza pueden contribuir a incrementar los casos durante una epidemia ⁵.

Muchos casos son diagnosticados clínicamente, pero la confirmación del análisis de laboratorio juega un papel fundamental para verificar la escala de los brotes de influenza ⁵. Al respecto, un estudio ha comprobado que los aspirados nasofaríngeos presentan el doble de posibilidad en la detección del virus de influenza a comparación a la técnica tradicional del exudado nasofaríngeo ¹¹.

Las muertes producidas por influenza ocurren en niños y en personas que tienen enfermedades pulmonares y cardíacas. Entre 1972 y 1992 en Estados Unidos se reportó que el virus de influenza causó más de 11,800 muertes, tanto por neumonía como por influenza, y 47,200 muertes totales ya sean por enfermedad o accidentes durante una temporada de influenza ⁴.

Clasificación

Orden: No asignado

Familia Orthomyxoviridae

Género *Influenzavirus A*

Género *Influenzavirus B*

Género *Influenzavirus C*

Género *Isavirus*

Género *Thogotovirus Sp.*

Dhory virus

Thogoto virus

La clasificación anterior fue aprobada por el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés, “The International Committee on Taxonomy of Viruses”) en su última revisión en el 2011, en este comité se establece que la familia Orthomyxoviridae se separe del orden Mononegavirales, quedando ahora en un orden sin asignar. En esta familia se encuentran el género y especies de *Influenzavirus A*, *Influenza B*, e *Influenza C*, en esta familia también se encuentra los géneros *Isavirus* y *Thogotovirus*, este último con 2 especies; *Dhory virus* y *Togota virus* ⁸.

El nombre de la familia Orthomyxoviridae viene del griego *orthos* “común” *myxo* “moco” la cual ha sido denominada así ya que popularmente a la enfermedad causada por el virus de influenza se le conocía como resfriado común ².

Los virus de influenza A, B y C pueden distinguirse por las diferencias antigénicas entre las proteínas de la nucleocápside (NP) y de la matriz (M). También clasificado en subtipos con un sistema de nomenclatura que incluye; el género, el nombre del hospedero de origen en inglés (excepto el humano), la localización geográfica de su primer aislamiento, número de cepa y el año de su aislamiento, también se señala entre paréntesis la descripción de la hemaglutinina (HA) y de la neuraminidasa (NA), ejemplo A/Swine/Iowa/15/30(H1N1)^{2,12}. Los virus que tienen mezclas de genes de diferentes virus de influenza A se denominan genotipos y las variaciones genéticas dentro de un mismo subtipo de virus se denominan linajes¹².

Actualmente se han encontrado 16 subtipos de hemaglutinina (H1-H17)^{4, 12, 57} y nueve subtipos de neuraminidasa (N1-N10). Los 16 tipos de HA y los 9 tipos de NA se han aislado en virus de aves acuáticas silvestres, en las cuales se replican en el tracto respiratorio o en el intestinal, generalmente sin causar enfermedad. Se tiene registro que desde 1900, el virus de influenza A con hemaglutinina H1, H2 y H3 y neuraminidasa N1 y N2 han causado epidemias y pandemias en el hombre⁴. El tipo de HA determina el rango del hospedero del virus de influenza^{10, 14, 57}.

El virus de influenza A no solo infecta humanos sino que también infecta algunas otras especies de mamíferos, incluyendo al cerdo, caballo, mamíferos marinos, así como una gran variedad de especies de aves domésticas y silvestres siendo el responsable de epidemias y pandemias².

El virus de influenza B se identificó por primera vez en 1940, generalmente solo infecta al humano, provocando epidemias moderadas, aunque recientemente también se encontró en focas ^{2,12}.

Los virus de influenza C se describieron en 1950, infectando de manera limitada a humanos, sin embargo en China se ha encontrado también en cerdos y perros (tabla 2), este virus solo ha causado casos aislados en la población y se ha visto asociado al resfriado común presentado en niños generalmente ^{2,12,16}.

Tabla 2. Cuadro comparativo de las características de las especies del virus de influenza ^{2,12}.

Genero	Huésped	Efecto en la población	Proteínas de superficie	Proteínas estructurales	Proteínas no estructurales	Material genético
Influenza A	Humanos Cerdo Caballo Aves domesticas Aves silvestres	Causante de: epidemias y pandemias	HA NA	M1, NP, PB1, PB2, PB3	NS1, NS2	8 segmentos de ARN
Influenza B	Humanos Encontrado en Focas Recientemente	Causante de epidemias	HA NA	M1, NP, PB1, PB2, PB3	NS1, NS2	8 segmentos de ARN
Influenza C	Humanos Raramente en: Cerdos y Perros	Causante de casos aislados en la población	Solo una glicoproteína multifuncional HE	M1, NP, PB1, PB2, PB3	NS1, NS2	7 segmentos de ARN

Características virales

Se ha observado que el virus de influenza presenta variaciones en su forma, pero en general puede decirse que el virus de influenza son partículas de forma esférica o pleomórfica irregular de aproximadamente de 80 a 120 nm de diámetro, pero se ha observado que la forma varía según la cepa, ya que algunas pueden ser esféricas mientras que otras pueden presentarse heterogéneas en tamaño y largo^{2, 12}.

Los virus de influenza A y B presentan en su superficie proyecciones que se distribuyen radialmente, las cuales corresponden a las dos glicoproteínas de superficie HA, NA y además la proteína M2, que se encuentra en cantidades pequeñas y no está glicosilada. El virus de influenza C solo tiene a la proteína HE la cual tienen una actividad de esterasa. La HA es una glicoproteína integral de superficie que en los virus de influenza A y B, puede observarse en el microscopio electrónico en forma de varilla o espícula trimérica y desempeña tres funciones importantes: adherencia a la célula susceptible, fusión de membranas y reconocimiento antigénico que induce la respuesta inmune. La NA es un tetramero glicoprotéico, tiene como función principal catalizar el rompimiento del ácido siálico (AS) para liberar los viriones de la célula infectada; también permite el transporte del virus a través de la capa de mucina del tracto respiratorio. La proteína M2 es una proteína integral de la envoltura viral que forma un poro o canal iónico encargado de controlar el pH (potencial de hidrógeno) intracelular; esto lo logra al permitir la entrada de iones al virión durante la fase de desnudamiento en el ciclo de replicación. Tanto la HA como la NA se encuentran adheridas a la superficie viral en la envoltura lipídica por una secuencia corta de aminoácidos hidrófobos, la cual proviene de la membrana plasmática del huésped. La envoltura lipídica envuelve a la proteína de matriz M1, la cual juega un papel

estructural, dando soporte a la envoltura. En el interior de la cobertura de la matriz (núcleo), se encuentran los 8 segmentos de ARN de cadena sencilla y de sentido negativo para el caso de los virus de influenza A y B y 7 segmentos de ARN para el virus de influenza C, Los segmentos de ARN se encuentran asociados con la proteína de la nucleocapside (NP), que en el microscopio electrónico se observan como estructuras helicoidales, y tres proteínas grandes (PB1, PB2, y PA), que son polimerasas responsables de la replicación y transcripción del ARN. Cinco de los segmentos son monocistronicos y codifican para una proteína mientras que los otros tres contienen marcos de lectura abierta (ORF, por sus siglas en ingles; open reading frame) para dos proteínas de cada uno de los tres segmentos, (tabla 3). El virus codifica también para las proteínas no estructurales (NS1 y NS2) las cuales, solo han sido identificadas en las células infectadas, aunque NS2 también ha sido encontrada en el virión ^{2, 12} (figura 1, 2, 3 y 4).

Tabla 3. Segmentos de ARN del Virus de influenza A que codifican para proteínas virales y su función ^{12, 56}.

SEGMENTO DE ARN	PROTEÍNA	FUNCIÓN
1	PB-2	Polimerasa, soporta la formación del CAP, factor de virulencia.
2	PB-1	Subunidad catalítica de la ARN polimerasa, proteína participante en la apoptosis.
3	PA	ARN Polimerasa.
4	Hemaglutinina (HA)	Ligando del receptor, proteína de fusión, antígenos principales.
5	NP	Nucleoproteína (cápside), participa en la replicación.
6	Neuraminidasa (NA)	Rompe el ácido siálico, facilita la liberación del virus y permite el paso del virus por la capa de mucina del tracto respiratorio.
7	M1 (Matriz)	Interactúa con el genoma, da soporte a la envoltura viral.
	M2	Forma el canal iónico, controla el pH intracelular y el desnudamiento.
8	NS1 NS2	Controla la postranscripción, antagonista del interferón.

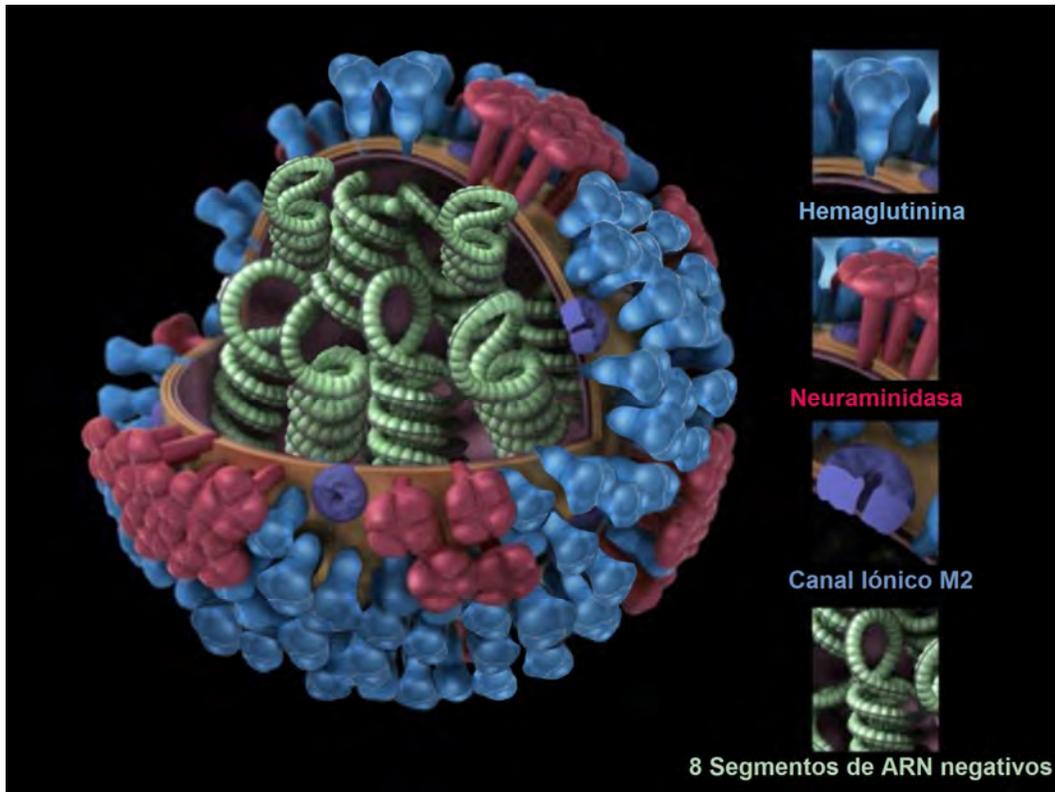


Figura 1. Representación esquemática del virus de influenza ²⁶.



Figura 2. Representación esquemática de la hemaglutinina ²⁶.



Figura 3. Representación esquemática de la neuraminidasa ²⁶.

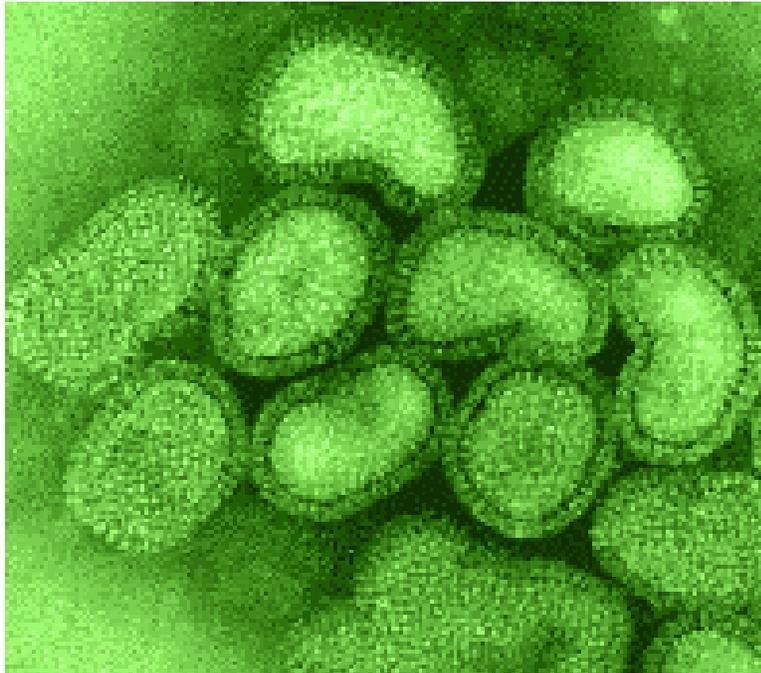


Figura 4. Fotografía electrónica del virus de influenza ⁹.

Ciclo de Replicación Viral

La replicación viral se inicia mediante la adherencia del virus a la célula, para lo cual se establece una interacción entre la región globular mayor de la HA (ligando) con el receptor de la célula. El receptor celular para los virus de influenza es el ácido siálico (AS), que se encuentra en la porción distal de los oligosacáridos y glicolípidos que forman el glicocálix de las células. Las diferencias en la forma de unión entre el AS con las dos moléculas adyacentes de azúcares determinan dos tipos de cadenas: AS- α 2-3-Gal- β -1-3-N-acetilglucosamina (AS- α 2,3-Gal) y AS- α 2-6-Gal- β -1-4-N-acetilglucosamina (AS- α 2,6-Gal), que se encuentran distribuidas de manera diferente en las especies animales. Las cadenas AS- α 2, 3-Gal se encuentran en las aves y caballos y las AS- α 2, 6-Gal en humanos. Ambas cadenas del sitio receptor están en el glicocálix de las células de los cerdos. Las mutaciones que ocurren en la región de unión de la HA favorecen la capacidad de los virus de influenza a cruzar la barrera de especie de aves a mamíferos. La presencia de ambos tipos de receptores en los cerdos sugiere que éstos pueden infectarse con virus de aves y de humanos, mezclando y amplificando a los virus con potencial zoonótico^{12, 14, 15}.

Una vez que el virus está adherido a la célula, ingresa mediante el proceso de endocitosis mediada por receptores, y forma un endosoma donde el pH ácido favorece el desnudamiento de los genes virales. A continuación la envoltura viral se fusiona con la membrana del endosoma, la fusión de membranas es mediada por la proteína HA del virus, ello permite la salida al citosol de los segmentos genómicos, que transitan hasta llegar al núcleo, en donde se lleva a cabo la transcripción que genera tanto ARN mensajero (mARN) como la replicación de los ARN virales (vARN), que corresponderán a los genomas de los nuevos virus. Los mARN se transportan al citoplasma para unirse a los ribosomas e iniciar

la síntesis de las proteínas virales necesarias para la transcripción y producción de las proteínas estructurales. Las proteínas regresan al núcleo mientras que las dos glicoproteínas se procesan en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, que finalmente migran y se expresan en la membrana celular, los segmentos del genoma viral se ubican en la membrana celular y se inicia el proceso ensamble y finalmente se presenta el fenómeno de gemación, tras el cual los viriones se liberan de la célula infectada (figura 5) ¹².

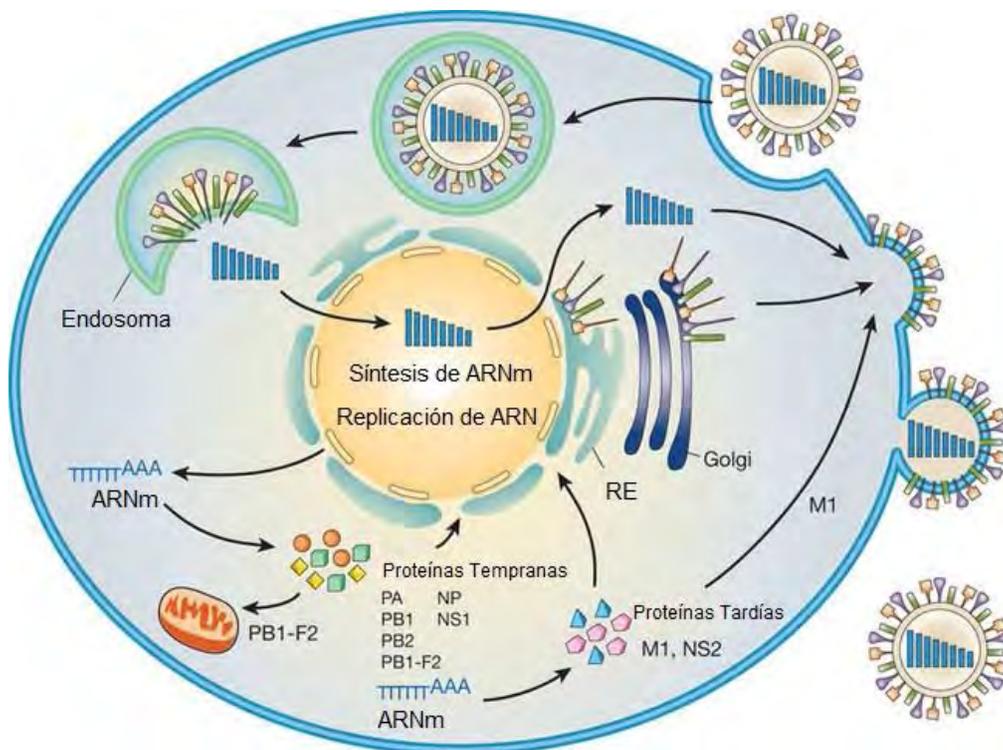


Figura 5. Replicación del virus de influenza ³⁹.

Mecanismos de variación

Los virus de influenza experimentan un proceso de evolución mediado por las mutaciones resultantes de los errores en la replicación del ARN de cadena sencilla y la capacidad de producir híbridos genéticos o un reareglo de virus por la combinación de segmentos genómicos de dos o más virus cuando una infección múltiple ocurre, ambas mutaciones contribuyen al éxito evolutivo de los virus de influenza. A continuación se explican estos dos tipos de mutaciones ¹⁶:

Deriva antigénica o drift.- Son cambios menores en las características del virus de influenza los cuales ocurren debido a la acumulación de cambios de aminoácidos debido a mutaciones puntuales, principalmente en las glicoproteínas HA y NA las cuales presentan elevados índices de mutación ya que la ARN polimerasa no repara con eficiencia los errores que se presentan durante la replicación del genoma, por lo que estos cambios se presentan con una frecuencia elevada. Estas substituciones son las responsables de evadir la unión de anticuerpos inducidos por una infección previa, por lo que el virus puede tener acceso al hospedero en múltiples ocasiones. Este proceso es el responsable de epidemias locales ^{1, 2, 44}.

Cambio antigénico o shift.- Son cambios fuertes que dan origen a nuevas cepas las cuales presentan antígenos de superficie distintos a los ya existentes. Los cambios se presentan principalmente en las glicoproteínas HA y NA sin descartar a las otras proteínas. Generalmente estos cambios son de baja frecuencia presentándose cada 10 a 40 años. Estos cambios antigénicos drásticos provienen del reareglo de un virus de influenza humana y un virus de influenza de origen animal y son los responsables del surgimiento de nuevas cepas

pandémicas^{2, 44}.

Epidemiología

Las aves silvestres acuáticas migratorias, tanto de lagos como costeras, son los reservorios naturales de toda la constelación genética de los virus de influenza A, en estas aves el virus de influenza se presenta de manera asintomática por lo que en ellas se ha establecido una relación estable de hospedero-parásito desarrollada durante un periodo prolongado de coevolución.^{12, 14} Todos los subtipos de HA se han aislado de patos y gaviotas, lo que demuestra que ocurrieron mayores cambios genéticos virales en estas aves. El análisis filogenético de un mismo subtipo de virus encontrado en aves migratorias muestra linajes diferentes entre aquellos que circulan en Europa y Asia y los del continente Americano, lo que pone en evidencia que las migraciones longitudinales son más importantes que las migraciones intercontinentales en la diseminación global de los virus¹².

En los patos silvestres infectados con el virus de influenza, este se replica en primer lugar en las células del tracto intestinal y se excreta por las heces en altas concentraciones (hasta $10^{8.7}$ dosis infectante en embrión de pollo (DIEP)_{50%} /g⁴)^{12, 14}. Los virus que se eliminan en heces frescas contaminan el suelo y agua de los lagos o canales, en donde las aves domésticas, en especial aquellas que se crían en espacios abiertos, buscan alimento y consumen agua, lo que constituye una eficiente ruta de transmisión. Los virus se diseminan con cierta facilidad hasta alcanzar gallináceas que se crían en traspatio y de ahí llegan a las explotaciones comerciales de pollos de engorda y gallinas de postura donde la diseminación es muy rápida, debido a los sistemas de manejo, que movilizan al virus entre granjas. A su vez, los virus de influenza de las aves acuáticas llegan a diferentes especies de mamíferos

de manera directa o a través de aves domésticas y se han descrito infecciones en mamíferos marinos como focas y ballenas, mamíferos terrestres como cerdos, caballos, bisontes, tigres y leopardos y en fechas recientes perros ^{2, 12}. Las aves de corral pueden estar íntimamente relacionadas en la emergencia del virus de influenza sirviendo como hospedero intermediario entre las aves acuáticas y el hombre ¹⁴.

El hombre desempeña un papel importante como transmisor directo o indirecto del virus, ya sea por transporte mecánico a través de la ropa, equipos o vehículos contaminados, o bien por el contrabando de aves silvestres, de ornato, de pelea y comerciales ¹².

También se reconoce el papel del cerdo como hospedero intermedio, adaptador y amplificador de ciertos subtipos virales para infecciones en humanos. Los estudios genéticos de los virus de influenza clásica del cerdo y en humanos de los subtipos H1 y H3 indican que tienen un ancestro común de origen aviar y una relación filogenética cercana entre ellos¹². La influenza endémica en cerdos se ha restringido a tres subtipos que son H1N1, H3N2 y H1N2. Otros subtipos como el H9N2, H4N6 y H1N7 han sido aislados de cerdos esporádicamente ¹⁴.

No se ha encontrado evidencia de que el virus de influenza establezca una infección latente en humanos. El virus se mantiene en los humanos por contagio directo de persona a persona durante la fase aguda de la enfermedad. Las poblaciones aisladas pueden ser infectadas por la introducción del virus por un individuo infectado, esto puede desembocar en una epidemia. Subsecuentemente las epidemias son iniciadas por la reintroducción del virus. Ha sido posible aislar al virus de humanos durante cualquier mes del año en todo el

mundo. En regiones templadas las epidemias se registran por lo general en los meses fríos, mientras que en las regiones tropicales y subtropicales se presentan infecciones a lo largo de todo el año, con uno o dos picos en los cuales se incrementa la actividad. Los registros en Estados Unidos indican que las epidemias por el virus de influenza se presentan generalmente durante los meses de enero hasta abril con epidemias ocasionales en diciembre o mayo ^{2, 16}.

Analizando los datos reportados para México por la Organización Mundial de la Salud (OMS) durante el 2000, 2001 y 2002, se puede apreciar que la mayoría de los casos se presentan en otoño (octubre, noviembre y diciembre), sin embargo en el 2000 se observa un incremento significativo de casos durante el invierno (enero, febrero y marzo) en comparación con los aislamientos registrados durante el 2001 y el 2002, lo cual podría indicar un brote epidémico en esta fecha ⁷, (figura 6, 7 y 8). En otros estudios se reportan picos epidémicos durante el invierno y primavera (Manjarrez 1999 y Manjarrez 2011) ^{3,44}.

Los datos anteriores concuerdan con lo reportado por Fiels en 1996, el cual menciona que se ha observado que las epidemias ocurren generalmente después de que los niños entran a la escuela entre septiembre y octubre. Claramente la concentración de personas que se da en las escuelas favorece la rápida propagación del virus, por lo que se cree que en la transmisión del virus los principales vectores en la comunidad son los niños en etapa preescolar y escolar ².



Figura 6. Aislamientos estacionales del virus de influenza en México durante el 2000, según datos de la OMS ⁷.

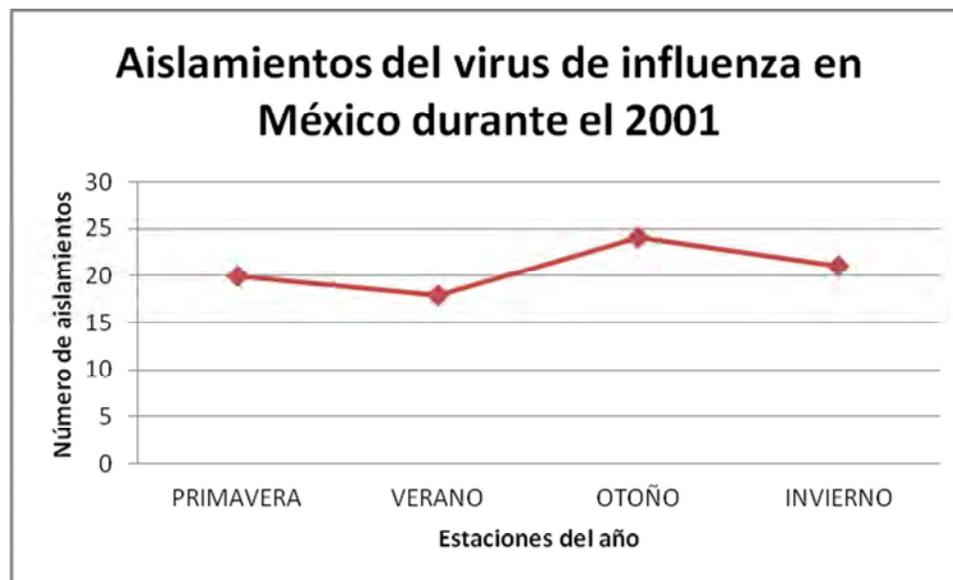


Figura 7. Aislamientos estacionales del virus de influenza en México durante el 2001, según datos de la OMS ⁷.

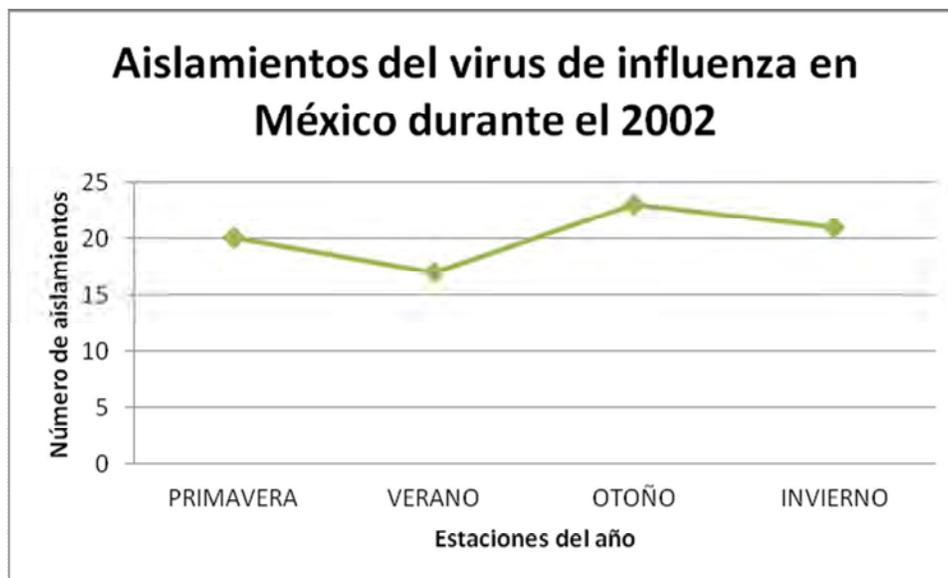


Figura 8. Aislamientos estacionales del virus de influenza en México durante 2002, según datos de la OMS ⁷.

Diversos estudios sugieren que las pandemias de influenza frecuentemente surgen en China y se extienden hacia el oeste por el resto de Asia, Europa y América, este proceso es facilitado por las prácticas agrícolas en el este de Asia, las cuales permiten una aproximación cercana entre humanos, patos y cerdos domésticos. Una alta densidad de población y la diferencia de estaciones entre el sur y el norte de China permiten que se presenten infecciones de influenza en cada mes del año ^{5, 14, 17}.

Durante los periodos interepidémicos, generalmente desde que empieza el invierno, se han reportado brotes de infecciones causados por diferentes virus de influenza A y B, dichos brotes varían en su severidad. La variabilidad antigénica durante dichos periodos es menos marcada, por lo que dichos brotes pueden ser originados por la deriva antigénica, provocando nuevas epidemias, ya que los virus circulantes son significativamente diferentes de las cepas previamente encontradas en la población ⁵.

A continuación se muestran las imágenes de la distribución mundial del virus de influenza del 2000 al 2002⁷.

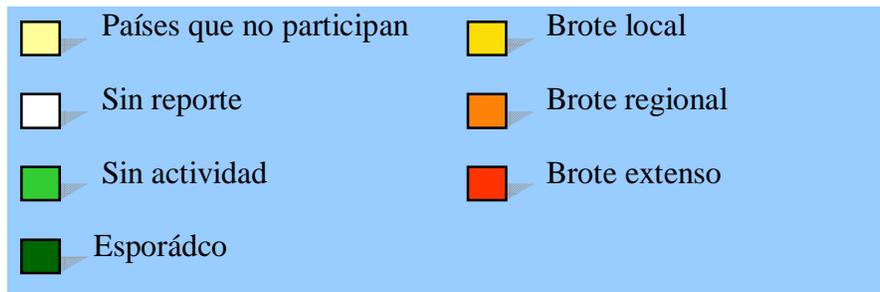
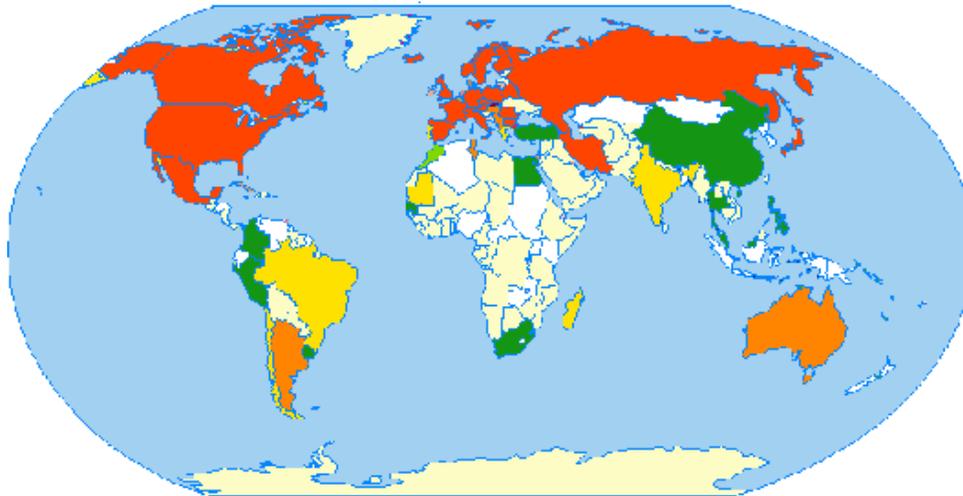


Figura 9. Distribución mundial del virus de influenza en el 2000⁷.

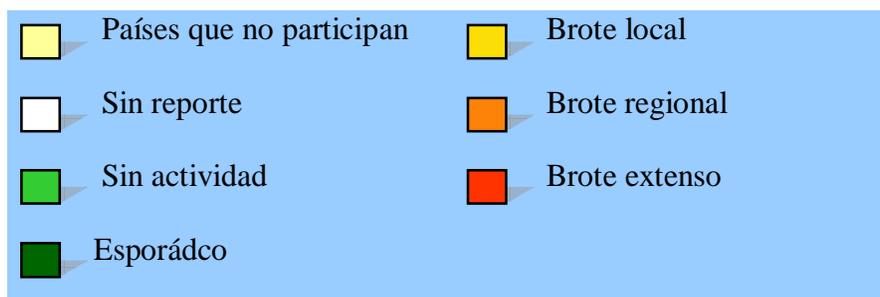
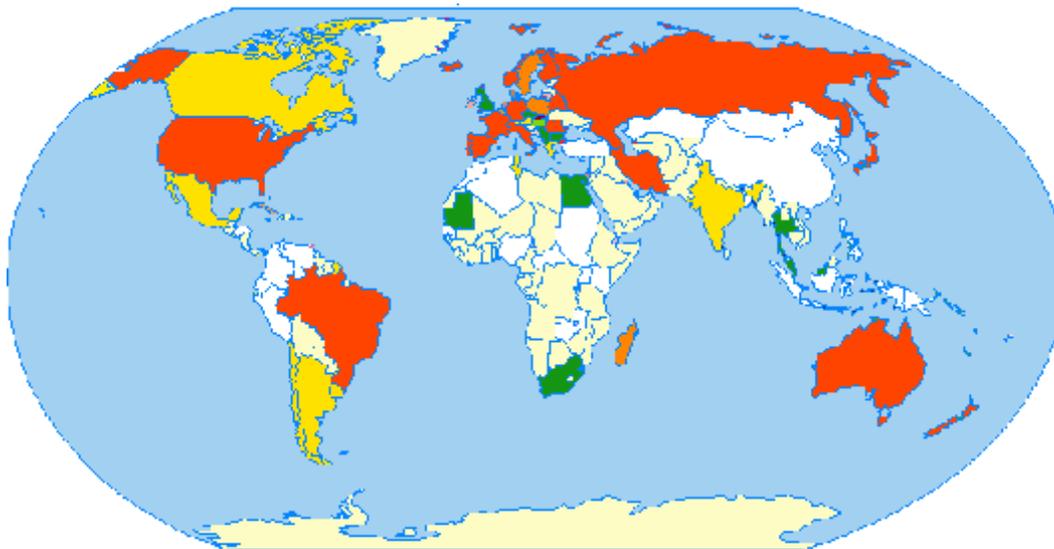


Figura 10. Distribución mundial del virus de influenza en el 2001 ⁷.

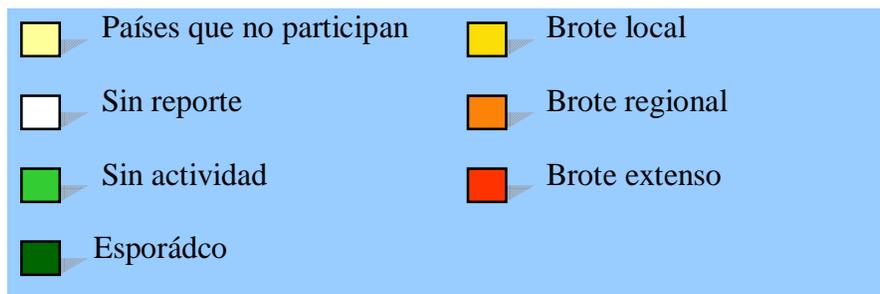
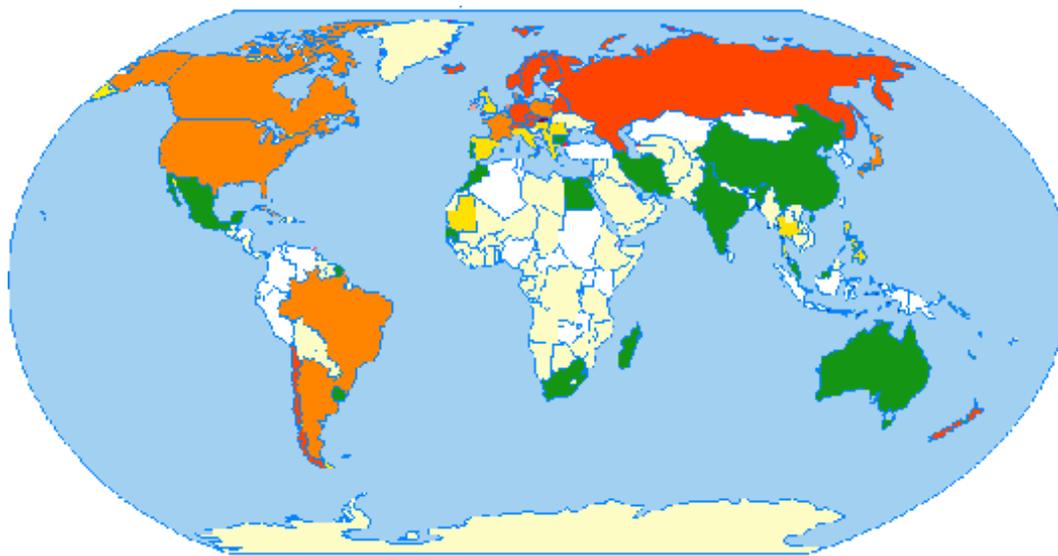


Figura 11. Distribución mundial del virus de influenza en el 2002 ⁷.

Percepciones futuras

El resurgimiento de otro brote pandémico podría tener un efecto devastador económica y socialmente. Si tomamos en consideración que desde la pandemia de 1918 el mundo ha sobrepasado tres veces la población de ese momento con casi 6.5 billones de personas, podemos estimar que en el mundo alrededor de 175 a 350 millones de personas podrían morir¹³. Para poder actuar en contra de una pandemia la OMS, ha establecido un sistema de fases relacionadas a las acciones para proteger a la población mundial (tabla 4)

13.

Tabla 4. Fases y metas principales para la salud pública de OMS en un plan de preparación ante una pandemia de influenza^{13,45}.

Fases		Metas Principales para la Salud Pública
Periodo interpandémico		
Fase 1	No se han detectado nuevos subtipos de influenza en humanos. Un subtipo del virus de influenza que ha causado infecciones en humanos puede estar presente en animales. Si se encuentra presente en animales, el riesgo de infecciones en humanos se considera bajo.	Fortalecer los preparativos para una posible pandemia de influenza a nivel global, regional, nacional y subnacional.
Fase 2	No se han detectado nuevos subtipos de influenza en humanos. Sin embargo un subtipo viral de influenza animal posee un riesgo substancial de infectar a humanos.	Minimizar el riesgo de transmisión en humanos; detectar y reportar dichas transmisiones rápidamente si llegaran a ocurrir.
Periodo de alerta pandémica		
Fase 3	Se detectan infección(es) en humanos con un nuevo subtipo viral, pero no hay contagio de humano a humano, o por lo menos, una rara incidencia debida a contacto muy cercano.	Asegurar una caracterización rápida del nuevo subtipo viral, detección temprana, notificación y una respuesta apropiada en casos adicionales.
Fase 4	Pequeños grupos con una limitada transmisión de humano a humano, pero el brote es altamente localizado, sugiriendo que el virus no se encuentra bien adaptado a los humanos.	Contener al nuevo virus dentro de focos limitados, o retrasar el esparcimiento y ganar tiempo para implementar medidas de preparación, incluyendo el desarrollo de una vacuna.
Fase 5	Grandes grupos infectados, pero con una diseminación de humano a humano todavía localizado, sugiriendo que el virus se está adaptando favorablemente a los humanos, pero no es completamente transmisible. (Riesgo substancial pandémico)	Esfuerzos máximos para contener o retrasar el brote, posiblemente prevenir una pandemia y ganar tiempo para implementar medidas de respuesta pandémicas. La OMS establece con gobiernos locales planes estratégicos para retrasar y posiblemente evitar una pandemia, tomando en cuenta los aspectos epidemiológicos, virológicos y clínicos de la infección. En dicha estrategia se cuenta con recursos globales para contener el brote ⁴⁵ .

Periodo Pandémico		
Fase 6	Pandemia. Se incrementa y se transmite substancialmente en la población.	<p>Minimizar el impacto de una pandemia.</p> <p>En esta fase la OMS entre otras acciones realiza:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Coordina un liderazgo global para minimizar la morbilidad y mortalidad; preserva la efectividad en el sistema de salud, minimiza trastornos sociales así como minimiza el impacto económico de la pandemia. • Promueve el acceso racional a recursos como vacunas y otros suministros farmacéuticos • Monitoriza aspectos epidemiológicos, virológicos y clínicos del virus. • Proporciona orientación para el cuidado de pacientes⁴⁵.

Durante cada fase la OMS enlista las siguientes acciones y recomendaciones para ser consideradas por cada país:

- 1) Planeación y coordinación.
- 2) Monitorización y valoración de la situación.
- 3) Prevención y contención.
- 4) Respuesta del sistema de salud.
- 5) Comunicación ⁴⁵.

Forma de transmisión en el humano

Las observaciones epidemiológicas indican que el virus de influenza se transmite de persona a persona por aerosol, gotas y el contacto con superficies contaminadas. Es probable que la mayoría de las infecciones causadas por influenza se deban a las gotas formadas al toser o estornudar y en menor proporción por medio del contacto directo o por fómites ya que el virus presenta una vida relativamente corta en la mayoría de las superficies^{2, 16}. La dosis infecciosa en humanos al 50% (DIH₅₀) del virus de influenza administrado intranasalmente es de 127 a 320 DICT₅₀ (Dosis infecciosa en cultivo de tejidos al 50%) y de virus liberados en aerosol corresponde de 0.6 a 3 DICT₅₀. En el tracto respiratorio se pueden encontrar títulos virales tan altos como 10^{8.0} DICT₅₀/ml, durante el estornudo o la tos se genera una gran porción de las partículas de menos de 2µm de diámetro, las cuales contienen al menos un título de 1 DICT₅₀/ml del virus. Las partículas de este tamaño son depositadas en las vías aéreas altas. El virus de influenza se puede replicar en todo el tracto respiratorio, incluyendo el pulmón. El pico de replicación se presenta 48 horas después de la inoculación y desciende despacio después de 6 a 8 días. En adultos, una vez superada la infección el virus no puede ser aislado, pero los antígenos virales pueden ser detectados durante algunos días en células y en secreciones. En niños el virus se puede aislar de 1 a 2 días después del aparecer los síntomas y puede ser recobrado hasta 13 días después².

Patología

Al realizar una broncoscopia a una persona infectada con el virus de influenza, se observa una inflamación aguda difusa de la laringe, la tráquea y los bronquios, así como una inflamación de la mucosa y edema. Las células columnares ciliadas de la mucosa comienzan a vacuolarse y pierden los cilios, posteriormente se produce una descamación de estas células, lo que provoca un descenso en número de células epiteliales, lo cual produce una capa basal con un espesor de tan solo 1 capa de células, en algunas áreas la membrana basal se encuentra expuesta. Los antígenos virales se encuentran presentes sobretodo en las células epiteliales y en las células mononucleares, pero es poco frecuente encontrarlos en la capa de células basales. El restablecimiento completo de la necrosis epitelial puede llegar a tomar hasta un mes después de que los síntomas clínicos han desaparecido ².

Cuadro clínico

Los adultos que padecen del síndrome de influenza sin complicaciones presentan una traqueobronquitis con una involución adicional de las vías aéreas. El periodo de incubación puede ser tan corto como de 24 horas o puede llegar a ser de 4 a 5 días, esto depende de la dosis del virus y del estado de inmunidad del hospedero. Los síntomas generales de la enfermedad se presentan en la tabla 5 ^{2, 23,24}. Más de la mitad de los casos de influenza presentados al 3er día de la enfermedad reportan fiebre (ya sea con influenza estacional o con H1N1(2009)), tos, laringitis y rinorrea también se encuentran presentes, sin embargo la mialgia y los dolores de cabeza han desaparecido, solo algunos casos presentan síntomas del tracto respiratorio inferior como disnea ^{5, 24}. Mientras la fiebre va descendiendo los síntomas como la rinorrea y la tos se van haciendo más intensos ², pudiendo persistir de 1 a 3 semanas ^{5, 25}. La tos cambia frecuentemente de una tos seca a

tos con expectoraciones, las cuales en ocasiones pueden presentar purulencia. La enfermedad es más frecuente y más severa en los fumadores. Algunos pacientes pueden presentar disminución y alteraciones en las sensaciones gustativas de manera temporal ²⁵. Es importante mencionar que esta enfermedad puede llegar a producir cuadros asintomáticos así como faringitis. La pérdida de la cobertura mucociliar puede ser un factor que predisponga a una neumonía causada por bacterias ².

Tabla 5. Cuadro clínico en adultos y niños causado por el virus de influenza ^{2,5,}

^{23,24}.

CUADRO CLÍNICO	ADULTOS	NIÑOS
Cefaleas	✓	✓
Escalofríos	✓	✓
Tos	✓	✓
Fiebre de 38.1 a 41 °C	✓	✓
Convulsiones febriles		✓
Expectoraciones	✓	✓
Mialgias significativas	✓	✓
Miositis		✓
Rinorrea	✓	✓
Congestión nasal	✓	✓
Debilidad	✓	✓
Anorexia	✓	✓
Vomito y nauseas (en algunos casos)	✓	✓
Dolor abdominal		✓
Rinitis	✓	✓
Disfonía	✓	✓
Dolor de garganta	✓	✓
Anormalidades conjuntivas (Infecciones y exceso de lagrimeo)	✓	✓
Estornudos	✓	✓
Laringitis	✓	
Otitis media		✓
Laringotraqueobornquitis		✓

En estudios con niños de zonas urbanas, se ha demostrado que el virus de influenza A, es una causa importante de faringitis, bronquitis, laringotraqueobronquitis y neumonía. En una pequeña proporción de los casos la infección causada por el virus de influenza A ha sido asociada epidemiológicamente con el síndrome de muerte súbita infantil ².

Complicaciones como una neumonía primaria ocurren predominantemente en grupos de alto riesgo, como las personas de edad avanzada y los pacientes con enfermedades cardiopulmonares crónicas, un 25% de los casos se han observado en individuos normales y un 13% en mujeres embarazadas. La neumonía primaria viral generalmente se presenta como un desarrollo abrupto después de la enfermedad de la influenza la cual progresa de 6 a 24 horas a una pulmonía severa con una frecuencia respiratoria muy rápida de 30 a 60 respiraciones por minuto, taquicardia (120 palpaciones por minuto), cianosis (en un 80% de los pacientes), fiebres altas (arriba de los 103°F / 39.44°C) e hipotensión. La enfermedad puede progresar rápidamente a la hipoxemia y a la muerte después de 1 a 4 días. En la patología se encuentra que la tráquea y los bronquios se observan similares que en la enfermedad aguda pero también se presenta una bronqueolitis. El virus de influenza B puede llegar a causar graves enfermedades, pero no se ha visto asociado con una neumonía viral primaria fatal en individuos normales ².

Otra complicación que puede presentarse es la neumonía secundaria bacteriana, ésta es tres veces más común que la neumonía primaria. Las bacterias frecuentemente observadas son *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, y *Hemophilus influenzae*. Clínicamente este síndrome puede no distinguirse de la neumonía primaria, excepto porque los síntomas de esta enfermedad tardan más en aparecer que los síntomas

de la influenza. El diagnóstico depende de la presencia de la bacteria en las expectoraciones o en el fluido pleural. Los rangos de fatalidad de esta enfermedad son del 10% al 12%, sin embargo *Staphylococcus aureus*, puede presentar una fatalidad superior al 42% ², presentando un rápido deterioro de la salud e hipoxia ⁵. El síndrome de choque tóxico puede seguir a una complicación asociada con una infección causada por *Staphylococcus* spp. La mortalidad por neumonía relacionada con el virus de influenza es alta, el 39% de los pacientes admitidos en hospitales de Nottingham, Inglaterra, durante la epidemia de 1989-1990 murieron a causa de este padecimiento ⁵.

También se pueden presentar complicaciones como la exacerbación en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas, bronquitis y enfermedades meningococales subsecuentes asociadas al virus de influenza. En el embarazo la influenza suele ser particularmente severa, sin embargo no hay evidencias concluyentes de anormalidades congénitas asociadas. Algunos estudios sugieren que la exposición del feto al virus durante el segundo trimestre de embarazo puede incrementar el riesgo del desarrollo subsecuente de esquizofrenia ⁵.

La frecuencia de infecciones severas con el virus de influenza B que requieran de hospitalización, son cuatro veces menores que las que causa el virus de influenza A. El virus de influenza C puede causar enfermedades esporádicas del tracto respiratorio y raramente es asociado con enfermedades del tracto respiratorio inferior ².

Inmunología

Las células dendríticas (DC) son las más eficientes para la presentación de antígenos, las cuales inician la respuesta inmune primaria. Estas células reconocen al virus y después maduran y migran a los nódulos linfáticos en donde presentan los antígenos específicos ante las células T. La infección del virus de influenza induce una respuesta de quimiocinas altamente coordinada en diferentes subconjuntos de DC humanas ⁴⁷. Componentes críticos de la respuesta de memoria anti-influenza incluyen células B y células T CD4⁺ y CD8⁺. Después de una reinfección las células T CD4⁺ direccionan la activación de la memoria de las células B y células T CD8⁺ mediante la producción de citocinas. Las células T CD8⁺ activadas se multiplican, maduran y se movilizan al sitio de infección donde participan directamente en la lisis de las células infectadas por el virus, liberando citocinas antivirales incluyendo: interferon alfa y beta (IFN- α/β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α por sus siglas en ingles) para perpetuar la respuesta celular antiviral. La memoria de las células T CD8⁺ puede residir en depósitos linfoides o en tejidos periféricos como el parénquima pulmonar. Dentro del parénquima pulmonar las células T CD8⁺ pueden ser rápidamente activadas y multiplicarse de manera exponencial dentro del tejido pulmonar ⁴⁶. Componentes del complemento pueden estar presentes en el fluido del revestimiento alveolar, de forma complementaria puede participar en la respuesta innata al virus de influenza por medio de la IgM debido a la activación de la vía clásica del complemento ⁴⁸. Los anticuerpos que se generan durante la infección son contra las proteínas HA, NA, NP y M, siendo los más importantes los dirigidos contra la HA y la NA. Los anticuerpos dirigidos en contra de la HA principalmente pueden proteger en contra de la infección, mientras que los anti-NA no protegen pero limitan el esparcimiento de la infección ¹².

Después de una exposición inicial a una nueva cepa viral de influenza, toma de 5 a 7 días antes de que anticuerpos específicos y células T lleguen al pulmón para eliminar al virus. Las células B son el recurso predominante de IgM (inmunoglobulina M) la cual tiene una actividad inhibidora del virus de influenza. IgM específica para el virus de influenza producida por las células B₂ comienza a elevarse aproximadamente al día 7 de la infección y permanece elevada hasta el día 21⁴⁶.

Debido a la velocidad de mutación del virus de influenza, los epitopes inmunogénicos en las proteínas HA y NA cambian rápidamente y los anticuerpos neutralizantes no son eficientes para detener una reinfección con un virus mutado. También se ha demostrado que la proteína NS1 bloquea la producción de IFN- β en las células infectadas, incluyendo las células epiteliales y las DC, esto permite que el virus de influenza evada la inmunidad innata⁴⁷.

Tratamiento y Prevención

El impacto sobre la morbilidad y la mortalidad humanas ocasionadas por la infección con virus de influenza endémica estacional se puede prevenir con el uso de vacunas. En la actualidad la OMS tiene un sistema de vigilancia global de influenza que le permite identificar las variantes antigénicas y virus con potencial pandémico, para lo cual dispone de una red internacional de personal multidisciplinario que informan a lo largo del año sobre el desarrollo de padecimientos respiratorios compatibles con la enfermedad y envían muestras de pacientes a laboratorios y centros nacionales e internacionales dedicados a aislar y caracterizar los virus. La información se concentra en el Centro de Vigilancia de Enfermedades de la OMS, localizado en la CDC (por sus siglas en inglés

Center for Disease Control, Centro para el Control de Enfermedades) en Atlanta, Georgia. Después de analizar los informes anuales, un grupo de expertos de la OMS recomienda las cepas virales que deben incluirse en la elaboración de la vacuna para la siguiente temporada invernal en los hemisferios norte y sur. Las mutaciones puntuales que se acumulan en la región de la HA de los virus de los subtipos H1 y H3 se reconocen y se evalúa su distribución mundial anualmente porque son las que están circulando desde hace varios años y se recomiendan como las cepas virales capaces de inducir la inmunidad contra los virus circulantes. Las pruebas de eficacia en inocuidad del producto concluyen para el hemisferio norte aproximadamente en agosto de cada año e inician su distribución en septiembre para que la vacuna se aplique en octubre. La campaña termina en enero del siguiente año, debido a que se recomiendan dos aplicaciones, con lo que se espera que la población se encuentre protegida adecuadamente durante el invierno ¹².

Actualmente Australia, Canadá, Francia, Alemania, Italia, Japón, Los países bajos, el Reino Unido, Estados Unidos y a partir de octubre del 2012 México son los países que albergan las 14 compañías que producen vacunas contra la influenza humana, por lo que su disponibilidad es limitada. La capacidad de manufactura de la vacuna se estima en 565 millones de dosis por año de vacuna trivalente o de virus atenuado, esta capacidad de producción podría en teoría proveer 1.7 billones de dosis para por lo menos 18% de la población. Tomando en consideración que se requieren dos dosis de la vacuna para tener una adecuada protección, 850 millones de personas podrían recibir la vacuna, dejando del 80 al 90 % de la población mundial sin protección. En países industrializados la vacuna se aplica a todos los individuos que la solicitan, además de la población de alto riesgo. En la mayoría de los países en desarrollo la vacuna no está disponible para toda la población. A

continuación se presentan las vacunas utilizadas para el virus de influenza (tabla 6) ^{12, 13, 58}.

Tabla 6. Vacunas utilizadas para el virus de influenza ^{12, 13}.

TIPO DE VACUNA	CARACTERÍSTICAS	EFFECTIVIDAD
<i>Vacuna inactivada</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Compuesta por antígenos o virus inactivados de los subtipos H1N1, H3N2 e influenza B. • Se produce en embriones de pollo. • Se recomienda para adultos y niños de 6 meses a 8 años. • Es la vacuna más utilizada 	Del 60 al 90%
<i>Vacuna de subunidades</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Compuesta por HA y NA. • Se recomienda para niños de 3 a 12 años. 	Poco eficiente
<i>Vacuna adaptada al frío</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Compuesta por virus vivo atenuado adaptado al frío. • Contiene 6 segmentos genómicos del virus incluyendo el de la HA y NA de los virus recomendados por la OMS. • El virus de la vacuna solo puede replicarse a 20°C. • Se administra intranasalmente 	Altamente inmunogénica.
<i>Vacuna de ADN (en desarrollo)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Compuesta por plásmidos con genes clonados (como HA, NA y NP) 	Protección satisfactoria en ratones.
<i>Vacuna en base al cultivo celular</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Es similar a la vacuna inactivada. • Se produce en cultivo celular lo que puede generar grandes cantidades de vacuna en menor tiempo que la vacuna inactivada. 	
<i>Vacunas antigénicas de la hemaglutinina recombinante en baculovirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Al igual que la vacuna en base al cultivo celular se puede producir en grandes cantidades en poco tiempo. 	

Una vacuna pre pandémica para el virus de influenza se puede desarrollar como

respuesta a una amenaza de pandemia antes de que comience la fase 6 del plan de la OMS (tabla 4). En este caso dos dosis de la vacuna serían requeridas para proveer una adecuada protección (una dosis de preparación seguida por una de refuerzo) ¹³.

En el caso de una pandemia, la vacuna estacional podría brindar poca o ninguna protección a la población. La producción de una vacuna específica para el nuevo virus emergente de influenza no puede realizarse hasta después de que el virus pandémico ha comenzado, por lo que dicha vacuna no podrá estar disponible hasta que el virus este circulando en la población. Por lo anterior, el desarrollo de una vacuna pandémica llevaría de cuatro a siete meses a partir de que se ha declarado la pandemia por la OMS y podría utilizarse para vacunar a niños menores y adultos mayores por considerarlos erróneamente de mayor riesgo ya que en una pandemia todos los individuos están en riesgo ¹².

En cuanto a agentes antivirales contra la influenza, actualmente se cuenta con cuatro medicamentos para el control de la infección. La amantadina y la rimantadina son compuestos que bloquean el canal iónico que forma la proteína M2 en la envoltura viral, de manera que evitan el cambio de pH requerido para separar la nucleoproteína de los segmentos genómicos durante el proceso de desnudamiento y la fusión de la envoltura vírica con la membrana endosómica. Los inconvenientes de su uso se deben a la rápida resistencia que se produce a la acción de ambos medicamentos y a la producción de efectos colaterales, que en el caso de la amantadina se registran en el sistema nervioso central y el hígado y en el de la rimantadina en los riñones. La rimantadina puede utilizarse en una dosis diaria y la amantadina en dos dosis diarias. Además la rimantadina provoca menos reacciones adversas. La dosis recomendada en el adulto es de 200 mg diarios para ambos

medicamentos y 5 mg por kg de peso sin exceder 150 mg de dosis total en niños; también puede administrarse la misma dosis como medida profiláctica en sujetos de alto riesgo. Recientemente se desarrollaron y registraron nuevos medicamentos inhibidores de la neuraminidasa. Las moléculas son inhibidores competitivos análogos del AS que compiten con éste para prevenir la liberación en el tracto respiratorio. Estas sustancias son el Oseltamivir y Zanamivir que se administran por vía oral y en aerosol intranasal, respectivamente. El Oseltamivir se administra en dosis de 75 mg en individuos de trece años de edad en adelante o mayores de 40 kg de peso, para fines profilácticos y terapéuticos. El Zanamavir se recomienda en disparos nasales a dosis de 10 mg diarios en una sola aplicación, cuando es profiláctico, o en dos aplicaciones de 5 mg cada una en pacientes infectados^{12, 13}, sin embargo también existe el riesgo de que el virus se vuelva resistente a estos medicamentos por lo que deben ser utilizados con control¹⁸.

Formas más comunes para aislar al virus de influenza

El virus de influenza puede propagarse en huevos embrionados de gallina o en algunos cultivos celulares de tejidos como en las células de riñón de perro (MDCK), células de riñón de mono, células de riñón de hámster y células de riñón de pollo, en dichos cultivos es necesario adicionar tripsina para permitir que la HA sea activada y pueda adherirse al receptor celular. En el cultivo celular se observa un efecto citopático provocado por la replicación del virus de influenza el cual causa placas de células redondeadas y en grupos^{2, 17}.

Los huevos embrionados son utilizados en el laboratorio para la producción de la vacuna de influenza, también permiten la producción de grandes cantidades del virus para su estudio, mientras que el cultivo celular permite un aislamiento primario del virus.

Muchos tipos del virus de influenza A pueden ser aislados en la cavidad alantoidea de huevos embrionados, otros tipos de influenza A y B necesitan ser aislados en la cavidad amniótica. La detección de la presencia del virus de influenza en estos fluidos se realiza por medio de la hemaglutinación de eritrocitos, para lo cual pueden ser utilizados eritrocitos de gallina o de cobayo ^{2, 17}.

Para la detección del virus de influenza pueden ser utilizados varios métodos, como la hemaglutinación (utilizada en este estudio), la rRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real), inmunofluorescencia directa (IFD), inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo rápido en vial (VC), prueba en base al ácido nucleico (PAN) y prueba de detección rápida de influenza (PDRI). En la tabla 7 se comparan algunas de las características de estas pruebas ^{49, 50}.

Tabla 7. Comparación de las técnicas más utilizadas para la detección del virus de influenza ^{49, 50}.

PRUEBA	OBSERVACIONES
<i>rRT-PCR</i>	Es el método más específico y más utilizado para la detección del virus de influenza Alta sensibilidad Alta especificidad
<i>VC</i> (cultivo en ensayo rápido en vial)	Se lleva a cabo junto con la rRT-PCR, IFD ó IFI Acorta el tiempo de encontrar casos positivos
<i>Inmunofluorescencia Directa e Inmunofluorescencia Indirecta</i>	Sensibilidad de un 80% Tarda de 2 a 4 horas en realizarse Detecta antígenos Permite distinguir entre influenza A y B
<i>Prueba en Base al Ácido Nucléico (PAN)</i>	Se lleva a cabo junto con la rRT-PCR Tarda de 24 a 96 horas Detecta ARN Tiene una alta especificidad Sensibilidad del 86-100% Junto con la rRT-PCR es el método de rutina más utilizado para identificar influenza A y B
<i>Prueba de Detección Rápida de Influenza (PDRI)</i>	Sensibilidad limitada Especificidad razonable Puede dar falsos negativos Se utiliza solo cuando no se tienen otros recursos
<i>Cultivo Viral</i>	Se aísla al virus Tarda de 2 a 10 días Se requiere de rRT-PCR o inmunofluorescencia directa o indirecta para confirmar el tipo de Influenza
<i>Hemaglutinación</i>	Bajo costo Sensibilidad razonable Solo proporciona positivos o negativos, no diferencia tipo de influenza o cepa viral.

Diferencia de género y enfermedades respiratorias

No existen datos específicos en relación al género y la infección del virus de influenza, pero se ha observado en otras infecciones respiratorias que existe una relación con la diferencia hormonal, fisiológica y genética causada por la diferencia de sexo. Las diferencias de género en la anatomía de las vías respiratorias son importantes y deberían de ser consideradas tanto en estudios epidemiológicos como en estudios clínicos. Se sabe que los pulmones de las mujeres tienden a ser más pequeños en comparación a los de los hombres en todas las etapas de la vida. También se ha observado que las vías aéreas en las mujeres son más largas y angostas que en los hombres y tanto la tasa de flujo forzado como la capacidad vital forzada son mayores en las mujeres que en los hombres por lo que se infiere que estas tasas están relacionadas con el largo de las vías aéreas. Estas diferencias son más evidentes en la infancia y disminuyen hacia la edad adulta donde el radio del volumen residual de la capacidad pulmonar total aumenta en las mujeres, pero no en los hombres ⁵².

Avitsur ³⁸ y colaboradores mencionan que existe evidencia de que los hombres son más susceptibles a enfermedades infecciosas mientras que las mujeres son más vulnerables a los desordenes autoinmunes. El autor también atribuye a la diferencia de sexo la variación de la respuesta del organismo ante desafíos inmunológicos ya que las mujeres presentan una respuesta inmune humoral vigorosa en tanto que los hombres presentan una actividad celular inmune mayor ³⁸. También se ha reportado que el contenido de células del sistema inmune es menor en mujeres que en hombres ⁵².

En cuanto a la respuesta inmunológica, se ha visto que las mujeres expresan una respuesta inmune mayor a las infecciones virales ³⁸. Varios genes (como el Tlr7 que codifica un receptor el cual reconoce a los virus de ARN) los cuales codifican para las proteínas inmunológicas, se encuentran en el cromosoma X, lo cual resulta en altos niveles de expresión en mujeres. El impacto de esteroides sexuales que incluye andrógenos, oestrógenos y progesterona (P4), contribuyen en la diferencia de la reacción inmunológica en los sexos. Los andrógenos (hormonas sexuales masculinas), incluyendo dihidrotestosterona y testosterona, suprimen la actividad de las células inmunológicas, este efecto inmunosupresor del mecanismo de señalización de los andrógenos en los factores transcripcionales, median la producción de citocinas pro-inflamatorias y antivirales. Bajas concentraciones de E2 (estradiol, hormona sexual femenina) promueve la respuesta de células T ayudadoras del tipo 1 (TH1) y la inmunidad celular mediadora. Mientras que altas concentraciones de E2 aumentan la respuesta de las células T ayudadoras del tipo 2 (TH2) y de la inmunidad humoral, la cual puede ser responsable por los cambios en la respuesta inmune en mujeres. La P4, suprime la respuesta inmune innata, también inhibe la producción de anticuerpos durante la infección ³⁷. Por lo anterior la respuesta inmune innata altamente excesiva del sistema inmune de mediación celular, el cual incluye la producción de citocinas y quimiocinas, puede contribuir a incrementar la severidad de la influenza en mujeres ^{37, 38} ya que se ha visto que puede favorecer a la morbilidad y mortalidad debido al proceso inflamatorio ⁴⁸. Cabe mencionar que la pubertad se presenta antes en las niñas (de los 11 a los 13 años) que en los niños, por lo que los cambios en la respuesta inmune en las niñas debido a las hormonas pueden comenzar a edades tempranas ⁵².

No existe un registro específico para México que relacione al virus de influenza con el género o la edad, pero en cuanto a las enfermedades del sistema respiratorio el INEGI reporta para los años de 1999 al 2001 que los hombres presentaron una mayor mortalidad con 589 muertes, mientras que las mujeres presentaron 510 muertes en niños de 5 a 14 años de edad (tabla 8.)⁵⁴. En cuanto a la morbilidad hospitalaria causada por enfermedades respiratorias en 1999 el INEGI reporta para los hombres 147 060 casos (54.1%) y para las mujeres 124 625 casos (45.9%)⁵⁵.

Tabla 8. Mortalidad a causa de enfermedades respiratorias en México de 1999 al 2001 en hombres y mujeres de 5-9 años y de 10-14 años⁵⁴.

Año de registro	Edad	Total	Hombre	(%)	Mujer	(%)
1999	5-9 años	221	114	51.58	107	48.42
1999	10-14 años	198	101	51.01	97	48.99
2000	5-9 años	188	100	53.19	88	46.81
2000	10-14 años	155	92	59.35	63	40.65
2001	5-9 años	183	101	55.19	82	44.81
2001	10-14 años	154	81	52.60	73	47.40
Total		1099	589	53.59	510	46.41

El virus de influenza y la contaminación

Existen pocos estudios que relacionen la contaminación con las enfermedades respiratorias, en particular con la influenza, no obstante se ha podido comprobar que existe una relación entre la contaminación ambiental y las enfermedades respiratorias. En un estudio realizado en Londres³⁶ se sugiere que los contaminantes se depositan durante la inspiración a través de la nariz y son absorbidos por la mucosa nasal, resultando en efectos severamente perjudiciales para el organismo. Estos agentes contaminantes pueden causar irritación e inflamación que favorece el desarrollo de IRA que se pueden extender a las vías respiratorias inferiores con síntomas como la tos con producción de flemas y la opresión de

pecho y en altas concentraciones y exposiciones prolongadas pueden generar daño de tejidos ⁵³. Este estudio ³⁶ junto con un estudio en Hong Kong³⁵, concuerdan en que las IRA pueden estar relacionadas principalmente con la presencia de partículas suspendidas menores a 10µm (PM₁₀), pero también se mencionan otros contaminantes como el ozono (O₃), el dióxido de azufre (SO₂), dióxido de nitrógeno (NO₂). También refieren que los dos grupos de alto riesgo son niños y adultos mayores, sin embargo en el estudio de Hong Kong³⁵, se observó que la población relativamente sana también se vio afectada ^{35, 36}. Se ha sugerido que la exposición a NO₂ antes de una infección incrementa la susceptibilidad de las células del tracto respiratorio a ser dañadas por virus, mientras que una exposición concurrente exagera la inflamación inducida por el virus ⁵³.

En el Valle de México se observa muy frecuentemente el fenómeno de inversión térmica, esto se debe a la posición geográfica y la configuración territorial (ya que es una cuenca), aunado a los efectos que producen los sistemas de alta presión fundamentalmente cuando se encuentran al norte del mismo ya que desplazan el aire frío hacia el centro del país frecuentemente con bajo contenido de humedad, estas condiciones provocan cielos despejados durante la noche ³³. Existen dos tipos de inversiones térmicas: *las de superficie*, en las cuales se presenta una atmósfera muy estable por las noches y en las primeras horas de la mañana, con cielos despejados y vientos ligeros. El aire cerca del suelo es más frío que en la parte superior, al medio día cuando sale el sol y la superficie se calienta la inversión se debilita. El segundo tipo son las *inversiones térmicas de subsidencia*, las cuales pueden durar varios días y están asociadas a los peores episodios de contaminación por ozono en la Ciudad de México, estas atrapan el aire frío bajo una capa de aire caliente que impide que el aire frío pueda elevarse, esto hace que cualquier emisión de

contaminantes permanezca atrapada. Los días con peor calidad de aire se presentan cuando existen estas condiciones de inversión térmica en donde se presenta una acumulación fuerte de contaminantes, principalmente de partículas suspendidas ^{33, 34}. Como se explicó previamente estos episodios de contaminación favorecen los episodios de IRA lo cual incluye también al virus de influenza.

Problema

En México como en el mundo las IRA causan altas tasas de morbilidad y mortalidad, más altas que cualquier otra enfermedad infecciosa. El virus de influenza es uno de los principales agentes causantes de IRA afectando gravemente a niños, personas de edad avanzada así como personas inmunocomprometidas; sin embargo, en México, específicamente en la Ciudad de México y en niños de 8 a 12 años, a pesar de la importancia del virus de influenza como causante de epidemias y pandemias se desconoce la frecuencia y la prevalencia del virus, así como su relación con otros factores como la contaminación, su estacionalidad y los grupos más vulnerables, por lo que es necesario realizar estudios que den a conocer la frecuencia del virus y su relación con los factores antes mencionados para poder prevenir y/o manejar un posible cuadro epidémico o pandémico, el cual puede alcanzar altos niveles de morbi-mortalidad.

Objetivo General

- Conocer la incidencia del virus de influenza en una población de niños de entre 8 a 12 años con un cuadro de infección respiratoria aguda al sur de la Ciudad de México, durante noviembre de 1999 a febrero del 2001.

Objetivos Particulares

- Analizar la afinidad a la replicación viral en las diferentes cavidades embrionarias del pollo.
- Describir la frecuencia de los síntomas asociados al inicio del cuadro clínico
- Conocer la frecuencia de la incidencia en el mismo individuo durante el tiempo de estudio.
- Describir factores de riesgo asociados a la incidencia de infecciones por virus de influenza (sexo, edad).
- Describir factores ambientales relacionados a la incidencia de influenza (estacionalidad e inversión térmica).

Material y método

Población de estudio y toma de muestra

Las muestras fueron tomadas a un grupo de 124 niños de 8 a 12 años de edad con IRA, de los cuales 65 son del sexo femenino y 59 del sexo masculino. Los niños eran estudiantes de una escuela primaria ubicada en Xochimilco, al sur de la Ciudad de México. Los individuos fueron examinados de lunes a viernes en el periodo comprendido de noviembre de 1999 a enero del 2001, se tomaron muestras de aquellos que presentaban IRA. El número de muestras por individuo es directamente proporcional al número de IRA que presentó (ver tabla R2). Para formar el grupo de trabajo, se dio una plática a los padres de familia o a los tutores de los niños, para explicarles la importancia del estudio y en qué consistía así como el objetivo. Se les invito a participar y se les explicó que se llevaría un registro de los niños desde el inicio a la terminación del estudio para detectar cuadros de IRA en cada niño cuando se presentaran tres de los siguientes síntomas: tos productiva o seca, elevación de temperatura, estornudos frecuentes, rinorrea, rinitis, ronquera, dolor de garganta o de cuerpo, se les explico que se tomaría un aspirado nasofaríngeo, en qué consistía éste y que la toma de muestra no representaba ningún problema ni molestias. Para formalizar las acciones se firmo un formato de participación voluntaria.

Para la toma de muestras se empleó el método de aspirado nasofaríngeo, empleando tubos Falcon de 10 ml estériles, conectados de un extremo a una bomba de vacío, del otro extremo se introducía a la nariz del niño para extraer la muestra como se muestra en la figura 12.



Figura 12. Toma de aspirado nasofaríngeo

Para la correcta transportación y manejo de la muestra, se adicionaron 10 ml de medio de transporte Leivovitz L-15 (Invitro) estéril, al cual se le adiciono una solución de antibióticos, bencilpenicilina sódica cristalina en una concentración de 1 000 000U (Pisa), estreptomycin en una concentración de 0.5 g/ml (Pisa) y antimicótico, anfotericina 100X. Finalmente las muestras fueron colocadas en baño de hielo para su trasportación al laboratorio.

La muestra se centrífugo para retirar la mucosidad, el sobrenadante se alicuotó en tubos Ependorf de 1 ml a -70°C en un ultracongelador marca Revco como se puede apreciar en la figura 13 y 14.



Figura 13. Centrifugación de la muestra para retirar el exceso de mucosidad.



Figura 14. Alicuotación de la muestra en tubos Ependorf para su almacenamiento.

Inoculación en embriones de pollo

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente. Se colocaron 200 μ l de la muestra en jeringas de 1ml, cambiando la aguja de la jeringa por una aguja amarilla, las jeringas se colocaron con su tapón en tubos de ensaye estériles.

Para la inoculación en embrión se utilizaron embriones de pollo de la casa fabricante ALPES II (en la tabla 9 se muestran las características de calidad de los embriones), los cuales tenían de entre 9 a 11 días, con la ayuda de un ovoscópio se marcó la cavidad de aire con un lápiz, posteriormente se desinfectó el cascaron con etanol al 70%, con la ayuda de una aguja amarilla de jeringa se realizó una perforación en el cascaron, se inocularon en la cavidad amniótica 100 μ l de la muestra y 100 μ l en la cavidad alantoidea. Se selló el orificio del cascaron con esmalte (figura 15). Este procedimiento se llevó a cabo por duplicado.

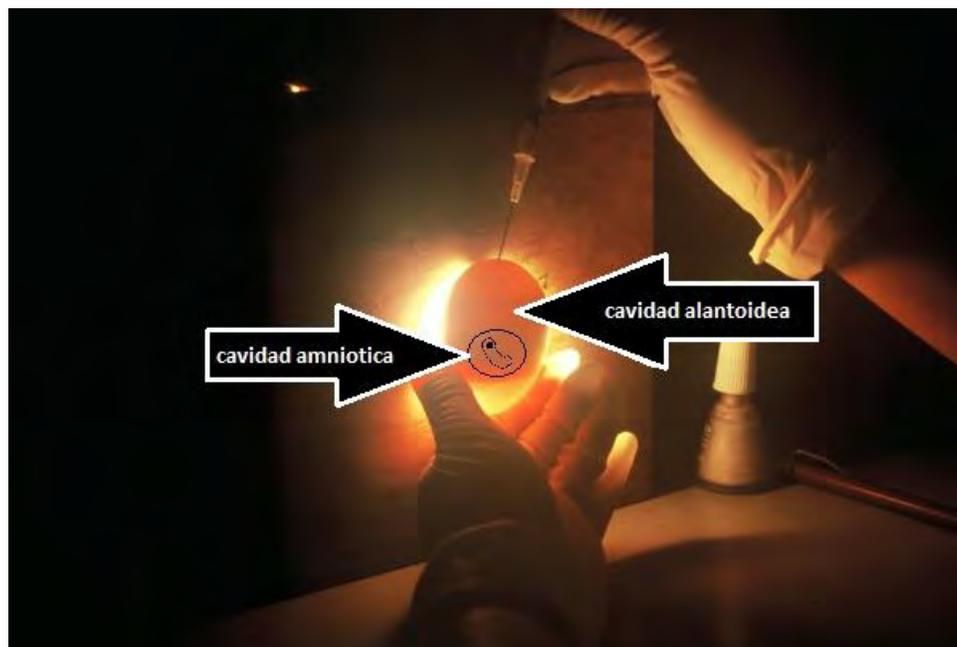


Figura 15. Inoculación de las muestras en embrión de pollo.

Los embriones se incubaron de 3 a 4 días a 27 °C en atmósfera húmeda en una estufa eléctrica. Transcurrido el tiempo de incubación, los embriones se colocaron a 4°C en un refrigerador de 1 a 2 noches.

Para cosechar los líquidos embrionarios, en un gabinete de bioseguridad, en condiciones de esterilidad, se desinfectó nuevamente el cascarón con benzal. Con unas tijeras de disección, previamente esterilizadas, se cortó la parte superior del cascarón correspondiente a la cavidad de aire, se retiró el cascarón y la membrana del mismo y con una jeringa de 5ml se extrajo el líquido de la cavidad alantoidea, el cual se colocó en un tubo de ensaye estéril. Se realizó el mismo procedimiento para extraer el líquido de la cavidad amniótica (figura 16).

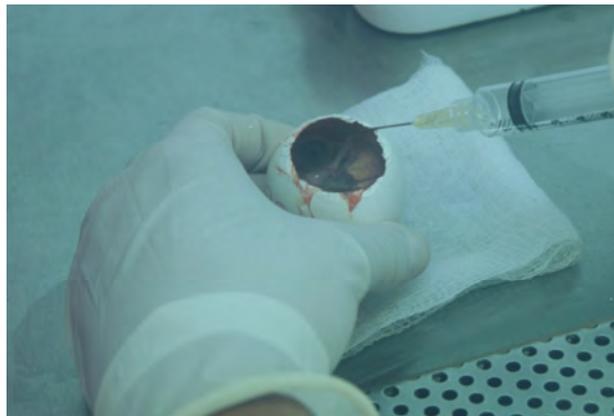


Figura 16. Extracción del líquido amniótico y alantoideo de embriones de pollo inoculados con las muestra.

Tabla 9. Características de calidad de los huevos embrionados de pollo de la casa fabricante Alpes II. (Datos proporcionados por el fabricante)

Agente	Cepa	Ensayo	Titulo/Resultado	
Síndrome de baja postura	McFerran	IH	MG. 15	
Leucosis Linfoide	RSV-RAV A	MN		(-)
Leucosis Linfoide	RSV-RAV B	MN		(-)
Leucosis Linfoide	A, B, C, D, E.	COFAL, EIA.		(-)
Mycoplasma Synoviae	Comercial	ARP, IH, EIA. AB.		(-)
Mycoplasma Gallisepticum	Comercial	ARP, IH, EIA. AB.		(-)
Salmonella Pul-Gall	Comercial	ARP, MA, AB		(-)
Bronquitis infecciosa	MASS	IH	MG, 140	
Enfermedad de Newcastle	SOTA	IH	MG, 260	
Influenza Aviar		Inmunodifusión, IH		(-), (-) < 5

AB = Aislamiento bacteriológico

ARP = Aglutinación rápida en placa

COFAL = Fijación de complemento para detectar virus de la Leucosis Linfoide

EIA = Inmuno Ensayo Enzimático

IH = Inhibición de la Hemaglutinación

MA = Micro Aglutinación en Placa

MN = Micro Virus Suero Neutralización

Los líquidos del amnios y el alantoides fueron centrifugados a 2000 RPM. El sobrenadante fue alicuotado en criotubos de 1 ml, 2.5 ml y 4 ml, dichas alícuotas se conservaron a -70°C en un ultracongelador marca Revco.

Detección del virus de influenza por hemaglutinación

Estandarización de eritrocitos:

Para la preparación de la solución de eritrocitos de pollo, se tomó la sangre de pollo en un tubo, el cual contenía una solución alcevers con heparina en igual volumen al que se tomó de sangre. Se centrifugaron los eritrocitos a 1800 RPM por 10 minutos y se retiró el sobrenadante, se adicionó PBS aproximadamente en el mismo volumen del sobrenadante retirado, se centrifugó nuevamente y se repitió esta operación 2 veces más con el objeto de lavar las impurezas que pudieran contener los eritrocitos. Del botón de la última centrifugación, se tomó 1 ml, el cual se colocó en una botella para 100ml, a esto se le adicionaron 100ml de PBS.

Hemaglutinación:

El virus de influenza tiene la propiedad de aglutinar (unir) eritrocitos debido a su proteína de superficie HA la cual une a los eritrocitos formando una red ². Debido a esta propiedad es posible detectar al virus de influenza mediante la prueba de hemaglutinación, para la cual se utilizaron placas de microtitulación con 96 pozos con fondo en forma de "U". Se realizaron diluciones seriadas, se marcó cada columna de la placa con el número de muestras por duplicado, se agregó 50 µl de la muestra en la primera fila, se colocó 25 µl de PBS en cada pozo, excepto en la primera fila, hasta llegar a una dilución 10^{-5} , se agregaron 25 µl de solución de eritrocitos de pollo, se agitó la placa suavemente para homogeneizar la muestra, se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente sobre un lienzo húmedo y blanco. Transcurrido el tiempo especificado, se procedió a leer el título, en las muestras positivas se aglutinaron los eritrocitos mientras que en las muestras negativas se observa un

botón rojo al fondo de la placa (figura 17).

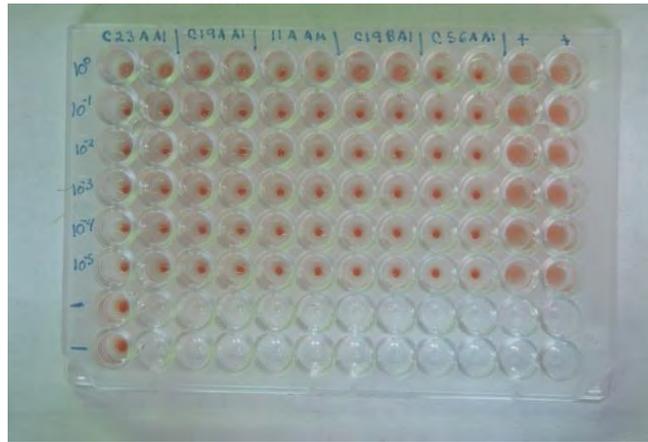


Figura 17. Detección del virus de influenza en placa de microtitulación de 96 pozos con fondo en forma de “U”.

En el apéndice 1 se proporcionan los contenidos de cada reactivo:

Análisis estadístico:

Para analizar los casos positivos para el virus de influenza y los casos positivos para otras IRA en los cuales se midieran las incidencias por grupo de edad, sexo, periodo y síntomas, se realizó un estudio de corte. También se aplicó la prueba de Chi^2 y P la cual fue considerada como significativa con un valor de < 0.05 . Se utilizó el programa estadístico Epi Info versión 6.

Resultados

El estudio se realizó en una población de 124 niños de 8 a 12 años de edad con una media $X = 10.02$ y una desviación estándar $DS = 1.03$. Los niños eran estudiantes de una escuela primaria ubicada en la delegación Xochimilco al sur de la Ciudad de México. Se incluyeron 65 (52.41%) individuos del sexo femenino y 59(47.58%) individuos del sexo masculino (tabla R1). A lo largo del estudio se analizaron 254 eventos infecciosos con toma de muestra por aspirado nasofaríngeo durante el periodo comprendido de noviembre de 1999 a enero del 2001. Las muestras se inocularon en embriones de pollo y se buscó la concentración del virus de influenza a través de la técnica de hemaglutinación, corroborando la incidencia del virus en la población estudiada. Se obtuvieron 113 (44.49%) eventos positivos para el virus de influenza y 141 (48.12%) positivos para otros agentes infecciosos (virales o bacterianos) causantes de enfermedades respiratorias agudas (IRA). En la población femenina se registró la mayor incidencia tanto para virus de influenza 73 (64.60%) como para la incidencia de otras infecciones respiratorias agudas (IRA) 89 (63.12%); se encontró una $Chi^2 = 19.21$ y una $P = 0.000011$; mientras que la población masculina presentó una incidencia para el virus de influenza de 40 (35.39%) y una incidencia para otras IRA de 52 (36.88%). El grupo de edad más afectado fue de 9 años con una Chi^2 de 5.96 y una P de 0.014.

Se valoró la sintomatología en 167 (65.75%) casos de IRA. De los casos positivos para el virus de influenza los síntomas además de la rinorrea, rinitis y conjuntivitis otros síntomas sobresalientes por sus significancia estadística fueron: ronquera 40 (23.95%) $Chi^2=8.15$, $P=0.004$, sibilancias 24 (14.37%) $Chi^2=3.70$, $P=0.054$, dolor de tórax 23 (13.77%) $Chi^2=4.45$, $P= 0.03$ y fiebre 13 (7.78%) $Chi^2=5.77$, $P=0.06.5$ (tabla R1)

Tabla R1. Características generales de la población y sintomatología. En rojo se muestran los datos que tuvieron una P significativa < 0.05.

SEXO	IRA				SANOS	TOTAL n = 124	X	DS	Chi ²	P
	INFLUENZA A		OTROS MICROORGANISMOS							
	TOTAL 113 (44.49%)		TOTAL 141 (55.51%)							
MASCULINOS n= 59 (47.58%)	40 (35.39%)	52 (36.88%)	24 (61.54%)	116						
FEMENINOS n= 65 (52.42%)	73 (64.60%)	89 (63.12%)	15 (38.46%)	177				19.21	0.0001	
EDAD						10.02	1.03			
8	14 (13.39%)	13 (9.22%)	0 (0%)	27				0.66	0.416	
9	37 (32.74%)	50 (35.46%)	6 (15.39%)	93				5.96	0.014	
10	40 (35.40%)	43 (30.49%)	6 (15.39%)	89				0.408	0.68	
11	20 (17.70%)	33 (23.40%)	26 (66.66%)	79				0.26	1.23	
12	2 (1.77%)	2 (1.42%)	1 (2.56%)	5				0.823	0.05	
SINTOMATOLOGÍA	Porcentaje		Porcentaje							
ESTORNUDOS	61 36.53	70 11.35	131	0.27	0.6					
RINORREA	48 28.74	59 9.56	107	0.01	0.91					
RINITIS	48 28.74	54 8.75	102	0.25	0.62					
CONJUNTIVITIS	46 27.54	51 8.27	97	0.34	0.56					
RONQUERA	40 23.95	28 4.54	68	8.15	0.004					
CEFALEA	39 23.35	37 6.00	76	1.89	0.17					
LARINGITIS	38 22.75	34 5.51	72	2.68	0.1					
DISNEA	33 19.76	31 5.02	64	1.52	0.22					
TOS CON ESPUTO	32 19.16	33 5.35	65	0.59	0.44					
ESCALOFRÍOS	30 17.96	38 6.16	68	0.09	0.76					
RINORREA CON MOCO	28 16.77	32 5.19	60	0.15	0.61					
MIALGIAS	27 16.17	26 4.21	53	0.96	0.34					
TOS SECA	27 16.17	24 3.89	51	1.63	0.2					
CARRASPEO	26 15.57	25 4.05	51	0.88	0.35					
SIBILANCIAS	24 14.37	17 2.76	41	3.7	0.054					
DOLOR DE TÓRAX	23 13.77	15 2.43	38	4.45	0.03					
FIEBRE	13 7.78	5 0.81	18	5.77	0.06					
AUSENTISMO ESCOLAR	13 7.78	11 1.78	24	0.86	0.36					
ESPUTO	6 3.59	11 1.78	17	0.79	0.037					

El virus se detectó y tituló utilizando la técnica de hemaglutinación como se menciona en métodos.

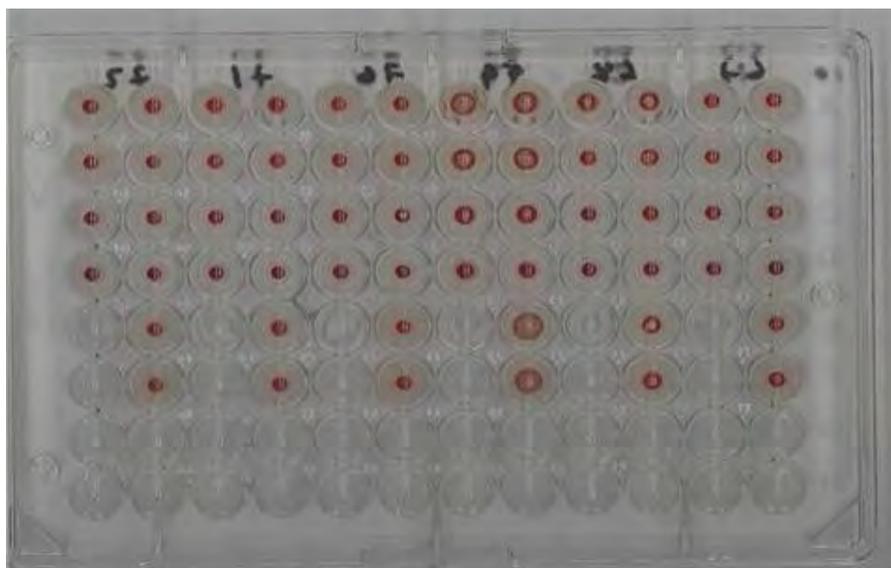


Figura R1. Detección del virus de influenza por hemaglutinación en placa de 96.

En la población estudiada durante un año, en un mismo individuo, se detectaron varios eventos de influenza, casos con repeticiones de 2- 3 eventos al año 29 (23.39%) y una $\text{Chi}^2 = 4.58$, $P = 0.032$.

Tabla R2. Repeticiones de casos por individuo

#CASOS	INFLUENZA		OTRAS IRAS		CHI ²	P
0-1	33	(26.61%)	33	(26.61%)	1.09	0.295
2-3	29	(23.39%)	21	(16.94%)	4.58	0.032
4 +	3	(2.42%)	12	(9.68%)	0.049	3.86

El comportamiento de las IRAS incluyendo a la influenza así como las causadas por otros agentes infecciosos, presentan los niveles más altos durante el invierno con una tasa de incidencia para el virus de influenza de 5.4 para el virus de influenza y para otras IRA de 7.7 por 1000 niños, en el caso del virus de influenza se presenta el segundo incremento en primavera con una tasa de incidencia de 4.4 por 1000 niños y un tercer incremento en otoño con una tasa de incidencia de 3.4 por 1000 niños. Para otras IRA el segundo incremento se presenta en otoño con 4.8 por 1000 niños

y un tercer incremento en primavera con 4.3 por 1000 niños (tabla R3 y figura R2.)

Tabla R3. Relación de casos del virus de influenza y de otros agentes por estación del año, en tasa por día.

ESTACIONES DEL AÑO	TASA DÍA INFLUENZA	TASA DÍA OTROS AGENTES DE IRA
Otoño 99	2.8	4.8
Invierno 00	5.4	7.7
Primavera 00	4.4	4.3
Verano 00	2.5	2.8
Otoño 00	3.4	2.5
Invierno 01	2.3	6.9

Tasa por 1000 individuos.

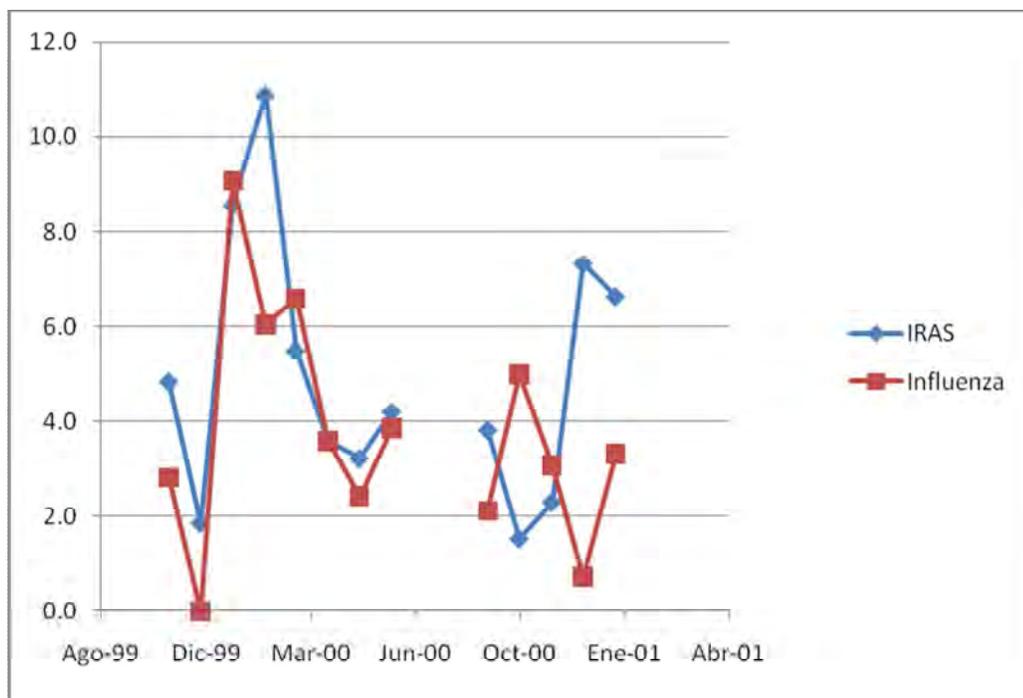


Figura R2. Incidencia del virus de influenza y otras IRAS de noviembre 1999 a diciembre 2001. Tasas día mes.

Las muestras se inocularon en dos cavidades de embriones de pollo. El virus de influenza fue aislado en un 70% de la cavidad amniótica y en un 57% de la cavidad alantoidea y en un 27% fue posible aislarlo de ambas cavidades (figura R3).

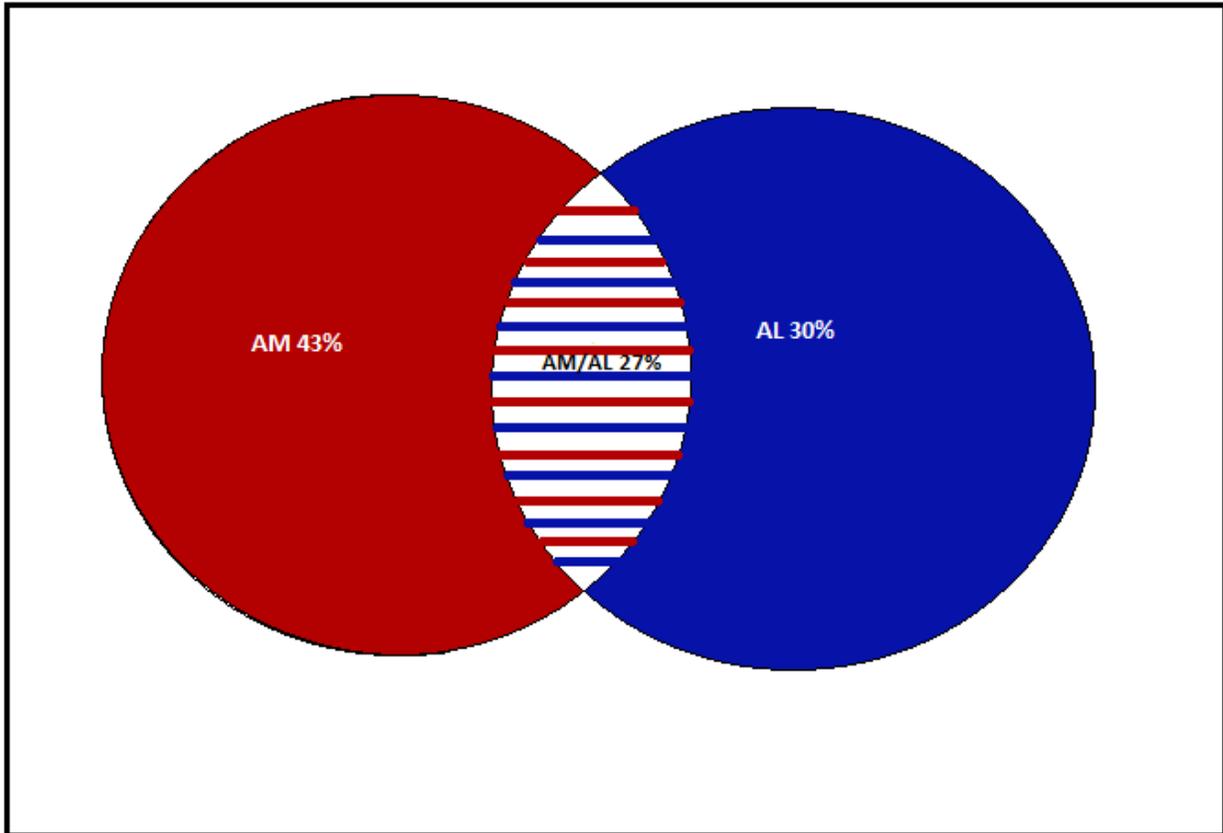


Figura R3. Aislamientos del virus de influenza en las diferentes cavidades embrionarias del pollo. AM= cavidad amniótica, AL= cavidad alantoidea.

En la Ciudad de México la inversión térmica es frecuente, por lo que para valorar si había una relación entre los casos de IRA tanto por el virus de influenza A, como por otros agentes patógenos con la inversión térmica, se analizaron los niveles de ésta y de los síntomas registrados en los niños durante los meses del año. Se encontró una relación entre la incidencia de los casos tanto del virus de influenza como de IRA causadas por otros agentes infecciosos con los episodios de inversión térmica presentes en la Ciudad de México, las cuales se pueden observar en la figura R4. Así en marzo del 2000 se registró el mes con mayor número de días con inversión térmica (18 días) y con una tasa para el virus de influenza de 6.6 y para otras IRA 5.5; en el mes de enero del 2000 se

tuvieron 14 días con inversión térmica y una tasa para el virus de influenza de 9.1 y para otras IRA de 8.6; en el mes de febrero se registraron 8 días con inversión térmica y una tasa para el virus de influenza de 6 y para otras IRAS de 10. El valor más bajo de inversiones térmicas se presentó en septiembre con 1 día en el cual encontramos una tasa de 2.1 para el virus de influenza y de 3.8 para otras IRAS ^{32,33}.

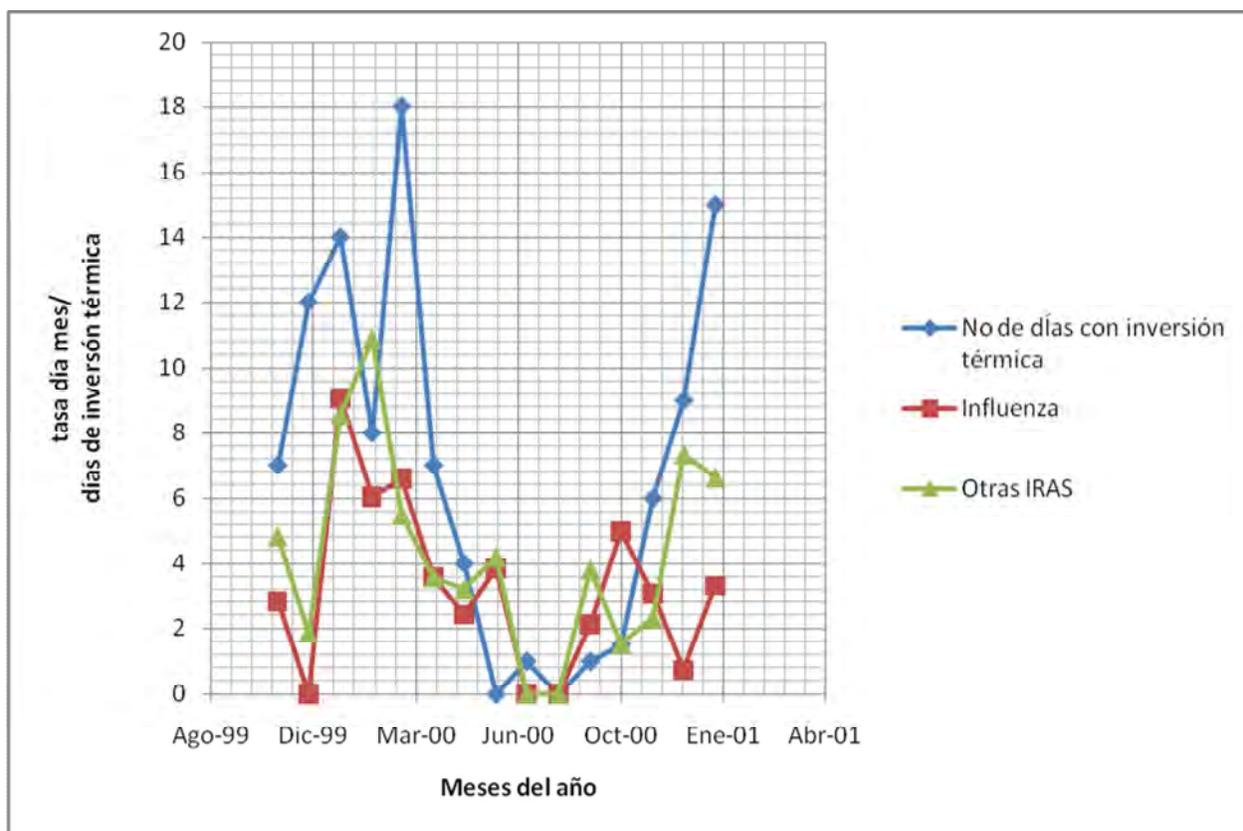


Figura R4. Relación de la de la tasa de incidencia para el virus de influenza y otros agentes causantes de IRA con los días de inversión térmica durante los meses del año (tasa por 1000 individuos)

Datos de las inversiones térmicas de: Estadísticas del Medio Ambiente del Distrito Federal y Zona Metropolitana 2000”, INEGI ³² y del Inventario de Emisiones a la Atmósfera, Zona Metropolitana del Valle de México 2000, Gobierno del Distrito Federal ³³.

Discusión

Se incluyó una corte de 124 niños de 8 a 12 años de edad con una edad media de 10.02. El estudio comprendió el periodo de noviembre de 1999 a enero del 2001. El número de muestras en el estudio, se pudo ver afectado por la inasistencia que se presenta durante las vacaciones registradas en el calendario escolar (diciembre, julio y agosto). Del total de niños incluidos, 65 (52.42%) corresponden al sexo femenino y 59 (47.58%) al sexo masculino.

En el 44.49% de los niños estudiados se detectó al virus de influenza y en el 55.51% se detectaron otros agentes causantes de IRA, estos datos representan una frecuencia alta e importante ya que no se toma en cuenta esta edad para aplicar la vacuna aunado a que los niños son un foco importante para la transmisión del virus.

La literatura cita como los síntomas característicos de la influenza en niños la fiebre, otitis, laringotraqueo-bronquitis, miositis, faringitis, bronquitis, rinorrea, mialgias, rinitis, cefalea, escalofríos y debilidad^{23,24,25}, sin embargo en el estudio encontramos que la ronquera (P=0.004), las sibilancias (P=0.054), el dolor de tórax (P=0.03) y la fiebre (P=0.06) fueron los síntomas representativos. Aunque estos síntomas son fácilmente confundibles por los causados por algún otro virus o agente causante de IRA, por lo que es de vital importancia que se realicen pruebas de laboratorio más frecuentes para verificar o descartar la presencia del virus de influenza e incluso se determine el subtipo, lo que puede ayudar para decidir un tratamiento adecuado de la enfermedad.

Para aislar al virus se usan varios sustratos, en este trabajo utilizamos embriones de pollo en los cuales inoculamos las muestras tanto en la cavidad amniótica como en la cavidad alantoidea del embrión de pollo. En diversos estudios se sugiere que solo se utilice la cavidad alantoidea para la inoculación de la muestra. En los resultados obtenidos encontramos que el 43% de las muestras positivas para el virus de influenza fueron encontradas solamente en el amnios del embrión de

pollo, 30% de las muestras fueron encontradas solamente en el alantoides del embrión de pollo y 27% fueron positivas en ambas cavidades. Con excepción de Murphy B. R. y Webster R. G. 1996, el cual menciona que algunas cepas del virus de influenza A y B solo pueden crecer en la cavidad amniótica, en los estudios encontrados no se hace mención de la cavidad en la cual obtienen sus resultados. Los resultados de este estudio muestran que el virus puede ser inoculado en las dos cavidades y que ambas deben ser analizadas ya que encontramos que ciertas cepas del virus solo crecen en una cavidad específica ^{2, 39, 40, 41}.

Al analizar los grupos de edad de los niños con relación a la infección del virus de influenza A y a otras enfermedades causantes de IRA, se observó en la corte estudiada, que la edad para adquirir la infección con mayor frecuencia fue de 9 años, estos concuerda con la mortalidad por enfermedades respiratorias en México de 1999 al 2001 reportada por el INEGI (tabla 6), ya que se presenta una mayor mortalidad en todos los años en el grupo de 5 a 9 años (en 1999: 221 muertes; en el 2000: 188 muertes, 2001:183 muertes) que en el grupo de 10 a 14 años (en 1999; 198 muertes, en el 2000; 155 muertes y en el 2001; 154 muertes) ⁵⁴ según nuestros resultados este grupo en especial los niños de 9 años son los más vulnerables para contraer Influenza así como otras enfermedades causantes de IRA. Es importante mencionar que para los niños de 9 años la vacuna no se incluía en las cartillas de vacunación oficial, y sigue sin ser obligatoria en el esquema de vacunación actual(2012-2013), ya que se administra a los 6, 7 y 59 meses de edad ^{28, 30}. Por los resultados de esta investigación y considerando que los niños son una fuente de contagio muy eficiente, propongo que se debe ampliar el esquema de refuerzo anual hasta los 10 años de edad. La CDC hace hincapié en que las personas que han recibido una dosis de la vacuna, necesitan reforzarla anualmente ya que se ha demostrado que la efectividad de la vacuna disminuye, y cuando el individuo recibe una segunda dosis la efectividad de la vacuna puede prolongarse de 7 a 10 años, la CDC recomienda la revacunación anual ³². Cada año los virus incluidos en la vacuna pueden cambiar ya que la vacuna se prepara con las cepas y tipos virales que circularon el año anterior,

teniéndose que aplicar cada año la vacuna correspondiente. Este estudio refuerza esta afirmación ya que detectamos varios eventos de influenza en un año para el mismo individuo, 29 (23.39%) casos con repeticiones de 2-3 eventos al año ($\text{Chi}^2=4.58$ $P=0.032$) y aunque en este trabajo no se tipificó, los resultados sugieren que podrían ser varios tipos de virus de influenza circulando durante el año.

La vacunación contra el virus de influenza se oficializó en México a partir del 2004 en niños de 6 a 23 meses ampliándose en el 2005 a niños de 6 a 25 meses, actualmente se administra a niños de 6, 7 y 59 meses como ya se mencionó ^{28,30}. Por lo anterior los niños participantes en el estudio no se encontraban incluidos en las campañas de vacunación, lo que concuerda con los resultados obtenidos, donde la incidencia anual es de 2 a 3 eventos al año estadísticamente significativo. La vacuna contiene ²⁹ 3 subtipos del virus de influenza que incluye 2 subtipos de influenza A y 1 de influenza B, en el 2004 los subtipos de influenza que se encontraban en la vacuna de acuerdo a la CDC eran los siguientes: A/Fujian/411/2002/(H3N2)-similar, A/NewCaledonia/20/99(H1N1)-similar, B/Shangahi/361/2002-similar ²⁹, aunque los fabricantes también pueden utilizar otras cepas similares, para el 2011-2012 se utilizaron los antígenos de las cepas: A/California/7/2009 (H1N1)-similar(virus de la pandemia del 2009), A/Perth/16/2009 (H3N2)-like, y B/Brisbane/60/2008-similar ³¹, todas estas cepas se recomiendan por la CDC, sin embargo hacen falta estudios locales para verificar si estas cepas son las únicas y más frecuentes circulantes en nuestro país, ya que nosotros encontramos que un individuo puede llegar a ser infectado hasta 6 veces por el virus de influenza lo cual puede indicar que existen más de tres cepas circulantes en la población. O bien, la respuesta inmune que despierta el virus es de poca duración o poca efectividad, como se sabe que se puede presentar los virus causantes de IRA.

Se ha descrito que el virus de influenza se comporta de manera estacional acentuándose en los meses fríos y disminuyendo en los meses calurosos, en este estudio, encontramos un incremento en otoño (tasa de 3.4 para el virus de influenza y 4.8 para otros agentes causantes de IRA por 1000

niños) y en invierno (tasa de 5.4 para influenza y 7.7 para otros agentes causantes de IRA por 1000 niños), siendo invierno la estación con más casos de IRA tanto por influenza como las causadas por otros agentes causantes de IRA, sin embargo también encontramos picos altos en primavera (4.4 para el virus de influenza y 4.3 para otros agentes causantes de IRA tasa por 1000 niños) que son los meses con mayor temperatura en la Ciudad de México esto puede deberse a que el clima en esta ciudad es muy estable siendo catalogado como tropical de montaña con temperatura moderada definida por la elevación y las lluvias regulares típicas de los trópicos, presentándose el mes más frío en enero y los meses de más calor en el trimestre de marzo a mayo, temperatura promedio anual de 16.5°C, temperatura máxima anual promedio de 18.86°C y temperatura mínima anual promedio de 13.26 °C^{32, 33, 34}. De acuerdo a estos datos tanto en los meses fríos como en los meses de mayor calor no se presentan temperaturas extremas, lo cual puede influir en el comportamiento del virus. Por lo anterior hicimos una comparación con el comportamiento a lo largo del estudio con las inversiones térmicas que se presentan en el Valle de México, encontrando una relación entre los casos positivos de influenza y de otras IRAS con los meses que presentaron mayor días con inversión térmica, que fueron marzo (tasa de 6.6 para influenza , 5.5 para otros agentes de IRA por 1000 niños y 18 días de inversión térmica) y enero del 2000 (tasa de 9.1 para influenza , 8.6 para otros agentes de IRAS por 1000 niños y 14 días de inversión térmica)³². No se encontraron registros de los contaminantes individualmente por mes, pero debido a que estos tienen un incremento durante la inversión térmica principalmente el O₃ y las PM₁₀, los cuales causan problemas respiratorios provocando inflamación e irritación de las vías respiratorias, por lo que esta situación puede estar influyendo con la respuesta inmune, que podría encontrarse saturada por los contaminantes y así no poder evitar o detener la intrusión de agentes infecciosos, los cuales según los resultados de nuestro estudio, se incrementan al presentarse niveles altos de contaminación^{35,36}.

Este es uno de los primeros estudios que se realizan en la Ciudad de México para correlacionar la contaminación con un agente patógeno, por la información que vierten los resultados, hacen ver que son necesarios nuevos trabajos de investigación que aporten mayor información sobre los efectos y relaciones entre los agentes patógenos y la contaminación para que en el futuro permitan encontrar herramientas y soluciones para disminuir tanto la contaminación como las IRA ya sean causadas por el virus de influenza como por otros agentes infecciosos causantes de IRA, ya que estos son responsables de altas tasas de morbi-mortalidad en México y en el mundo. El INEGI reportó para México que en 1999 la morbilidad hospitalaria causadas por IRA en niños de 5 a 14 años fue del 13.7% ⁵⁵, en cuanto a la mortalidad general causada por enfermedades respiratorias en 1999 fue del 9.4%. En el caso de los niños en edad escolar la mortalidad por enfermedades respiratorias para 1999 fue del 5.6% y en el 2000 del 2.6%. En cuanto a la mortalidad infantil causada por influenza y pulmonía en 1999 el INEGI reportó un 7.7%⁵⁴. Estos datos afirman la importancia de realizar más estudios de los factores de riesgo relacionados con el virus de Influenza y otras enfermedades causantes de IRA para poder controlarlos y disminuir así los casos de morbilidad y mortalidad.

Con respecto al género de los niños participantes, los resultados de este estudio muestran que el sexo femenino tiene una predisposición mayor a contraer infecciones tanto del virus de influenza como otros agentes causantes de IRA con una $\text{Chi}^2 = 19.21$ y una $P = 0.0001$. Como se explico previamente este fenómeno puede ser debido a que las mujeres presentan diferencias anatómicas y fisiológicas en el sistema respiratorio con respecto a los hombres. Otro factor puede ser el factor inmunológico que en las mujeres se expresa de manera mayor ante una infección viral que en los hombres facilitando así el proceso inflamatorio el cual agrava el cuadro clínico, no obstante el sistema inmune está altamente relacionado con factores hormonales y la corte estudiada son niños también se ha observado que las niñas comienzan la adolescencia de manera temprana ³⁷, ^{38, 48, 52}. Analizando la mortalidad presentada por enfermedades respiratorias en México de 1999 al

2001 (tabla 6), se encontró que los hombres de 5 a 14 años presentan una mayor mortalidad en todos los años (1999:215 [51.31%]; 2000: 192 [55.98%] y 2001: 182 [54.01%]) que las mujeres (1999: 204 [48.69%]; 2000: 151 [44.02%] y 2001: 155 [45.99%])⁵⁴ ya que estos datos no concuerdan con lo encontrado en este estudio y dado que existen diferencias tanto fisiológicas, inmunitarias como sociales entre hombres y mujeres, lo cual indica que sería importante considerar nuevos estudios que relacionen la diferencia de género en distintas edades con relación a infecciones causadas por virus respiratorios y que estos ayuden a implementar campañas de prevención enfocadas a las mujeres. Esto es importante ya que en nuestra sociedad las mujeres tienen un papel importante en el cuidado de niños y ancianos, que son grupos de riesgo ya que en estos grupos se presenta altas tasas de morbi-mortalidad relacionada con el virus de influenza.

El virus de influenza ha sido un problema desde el inicio de la humanidad, ya que provoca desde un brote, una epidemia, y hasta una pandemia y cada año causa la muerte de miles de personas. Todo parece indicar que es imposible su extinción, pero a medida que se vayan realizando estudios sobre su patogenia, es posible que por lo menos se logre controlar su severidad. Con este estudio, esperamos contribuir al conocimiento del virus y su comportamiento en nuestra ciudad.

Conclusiones

1. El virus de influenza se detectó en el 44.49% de los casos.
2. Se detectaron de 2 a 3 eventos de influenza por niño.
3. Como los síntomas no son específicos para la infección por el virus de influenza y ya que se pueden confundir con algún otro agente infeccioso, se sugiere que se implementen pruebas de laboratorio para la detección del virus de influenza y así poder realizar un tratamiento clínico adecuado para esta enfermedad.
4. El uso de ambas cavidades embrionarias (amnios y alantoides) aumenta la eficiencia del aislamiento del virus.
5. Por el grupo de edad estudiado y los resultados observados, se considera que el ampliar el esquema de vacunación actual hasta los 10 años, podría reducir la infección de niños y por lo tanto de la población en general, ya que los niños son fuentes de propagación del virus muy eficientes.
6. La vacuna se elabora para el hemisferio norte y otra para el hemisferio sur, y las cepas incluidas en estas vacunas son generales, por lo que sería importante hacer estudios en nuestro país para detectar y tipificar las cepas circulantes en la población y así verificar que la población esté siendo vacunada con las cepas correctas.
7. Como en estudios previos, se pudo comprobar el incremento de casos de influenza en la estación otoñal e invernal, con incrementos en primavera.
8. Los resultados del análisis de contaminación ambiental en la Ciudad de México y la infección del virus de influenza, indican una relación entre la infección y los altos niveles

de contaminación, en particular con el fenómeno de inversión térmica, el cual es común en la Ciudad de México por las características geomorfológicas de la misma.

9. Los meses donde se presentaron un mayor número de inversiones térmicas fueron marzo y enero. Lo que concuerdan con altas tasas de casos de IRA por el virus de influenza y por otros agentes infecciosos causantes de IRA. Por lo anterior se sugiere realizar más estudios para poder disminuir los casos de influenza y de otras IRA en estos periodos.
10. El sexo femenino presentó una mayor predisposición a contraer infecciones tanto por el virus de influenza, como por otros agentes causantes de IRA.
11. El virus de influenza es un agente infeccioso muy complejo que se relaciona con varios factores, haciendo así difícil su contención. Es importante conocer su relación con todos estos factores para poder implementar estrategias para su control y así poder proteger a la población de nuevas epidemias y posibles pandemias.

Perspectivas

- Ya que actualmente se aplica la vacuna para el virus de Influenza a niños de 6, 7 y 9 meses, sería conveniente realizar un estudio que comprenda niños en edad escolar (de 5 a 12 años) para comprobar la protección de la vacuna en la edad de mayor riesgo (según nuestro estudio 9 años).
- Sería conveniente realizar un estudio tipificando las cepas circulantes del virus de Influenza en México, con el fin de corroborar la efectividad de la vacuna así como efectuar una monitorización para observar el comportamiento de las epidemias locales y poder detectar a tiempo una posible pandemia.
- Ya que en este estudio comprobamos que la contaminación es un factor de riesgo para contraer el virus de Influenza y debido a que en la Ciudad de México se presentan fuertes

episodios de contaminación elevada se podría realizar un estudio caracterizando los contaminantes específicos relacionados con la infección, de esta manera podrían tomarse medidas para proteger a la población de dichos contaminantes reduciendo así la morbilidad y mortalidad a causa de IRA y específicamente por el virus de influenza.

- El género parece contribuir como un factor de riesgo importante, sería apropiado ampliar este estudio incluyendo a otros grupos de edad para observar el comportamiento del virus de influenza.

Apéndice 1: Preparación de soluciones

Tabla A 1.1. Solución Alcevers ⁵¹.

Dextrosa	20-500 gr
Citrato de sodio Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ H ₂ O	8.0 gr
Acido Cítrico C ₆ H ₈ O ₇ H ₂ O	0.550 gr
Cloruro de sodio NaCl	4.200 gr
Agua Destilada H ₂ O	1000 ml

Tabla A 1.2. Preparación de heparina, de la cual se adicionaron 4 µl por cada 2 ml de sangre ⁵¹.

Heparina (1 ampolleta de 5,000 UI/ml) marca Inhepar lab PISA)	200 ml
Solución salina	80 ml

Tabla A 1.3. Preparación de PBS para hemaglutinación 1X en 1 litro, a un pH de 7.45⁵¹.

NaCl	8 gr
Na ₂ HPO ₄ anhidro	1.44 gr
KH ₂ PO ₄	0.24 gr
KCl	7.45 gr

Apéndice 2: Abreviaturas

A.C.	Antes de Cristo
AB	Aislamiento bacteriológico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARP	Aglutinación rápida en placa
AS	Ácido siálico
CDC	Center for disease control por sus siglas en ingles (Centro para el control de enfermedades)
COFAL	Fijación de complemento para detectar virus de leucosis linfoide
DC	Células dendríticas
DICT ₅₀	Dosis infecciosa en cultivo de tejidos al 50%
DIH ₅₀	Dosis infecciosa en humanos al 50%
DS	Desviación estándar
E2	Estradiol
EIA	Inmuno ensayo enzimático
EUA	Estados Unidos de América
H1-H16 ó HA	Hemaglutinina
HE	Proteína de superficie con actividad de esterasa, característica del virus de Influenza C
IA	Influenza Aviar
ICTV	The international Committee on Taxonomy of Viruses, por sus siglas en ingles (Comité Internacional en Taxonomía de virus)
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN α	Interferon alfa
IFN β	Interferon beta
IgM	Inmounoglobulina M
IH	Inhibición de la hemaglutinación
IRA	Infección respiratoria aguda

M	Proteínas de la matriz
MA	Micro aglutinación en placa
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
MN	Micro virus suero neutralización
N1-9 ó NA	Neuraminidasa
NO ₂	Dióxido de nitrógeno
NP	Proteínas de la nucleocápside
O ₃	Ozono
OMS	Organización mundial de la salud
ORF	Open Reading frame por sus siglas en ingles (marcos de lectura abierta)
P4	Progesterona
PAN	Prueba en base al ácido nucleico
PDRI	Prueba de detección rápida de influenza
pH	Potencial de hidrógeno
PM ₁₀	Partículas suspendidas menores a 10µm
rRT-PCR	Transcriptasa reversa en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa
SO ₂	Dióxido de azufre
TH1	Células T ayudadoras del tipo 1
TH2	Células T ayudadoras del tipo 2
vARN	Ácido ribonucleico viral
VC	Ensayo rápido en vial
VIH	Virus de inmuno deficiencia humana
X	Media

Referencias

- 1 Levin A. Viruses. New York: Scientific American Library, 1992: 155-175p.
- 2 Fields, B., Knipe, D., Hoelwy, P., Chanock, R., Monath, T., Melnick, J., Roizman, B. y Straus, S. Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996:1353-1433p.
- 3 Manjarrez M. E., Arenas G. Virus de Influenza: Enigma del Pasado y del Presente Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 1999 oct-dic: Vol. 12(4) 290-299p.
- 4 Cox N J, Subbarao K. Influenza. Lancet 1999 Oct 9:Vol 354:1277-1282p.
- 5 Wiselka M. Influenza: Diagnosis, management, and prophylaxis. BMJ.1994, May 21, Vol. 308:1341-1345p.
- 6 Heikkinen T, Salim A A, Ruuskanen O. Comparative Study of Nasopharyngeal Aspirate and Nasal Swab specimens for detection of influenza. BJM. 2001 Jan 20:Vol 322,138p
- 7 FluNet.OMS. oms2.b3e.jussieu.fr/flunet/index.html
- 8 "Virus Taxonomy: 2011 Release." *International Committee on Taxonomy of Viruses*. ICTV, 2012. Web. 5 Sep 2012. <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp.version=2011>>.
- 9 Standard, Linda. "Influenza Virus." Virology.net. 1995. 9 Jan 2009 <<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/fluivirus.html>>.
- 10 Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, et al. Characterization of an Avian Influenza A (H5N1) Virus Isolated from a Child with a Fatal Respiratory Illness. Science, 1998 Jan 16; 279 (5349): 393-396p.
- 11 Schmid M, Kudesia G, Wake S, Read R. Prospective Comparative Study of Culture Specimens and Methods in Diagnosing Influenza in Adults. BMJ. 1998 Jan 24: Vol 316, 275p.
- 12 García-García J, Ramos C, La Influenza, un Problema Vigente de Salud Pública. Salud Pública de México, 2003 Mayo-Junio; Vol. 48 (3): 244-267p.
- 13 Jennings C L, Monto S A, Chan P, Szucs S T, Nicholson G K, Stockpiling prepandemic influenza vaccines: a new cornerstone of pandemic preparedness plans. Lancet infectious diseases, 2008 October; Vol. 8: 650-658p.
- 14 Webby R. J., Webster R. G. Emergence of Influenza A viruses. The Royal Society London. 2001: Vol 356, 1817-1828p.

- 15 Myers K. P, Olsen C. W, Gray G. C, Cases of Swine Influenza in Humans: A review of the Literature. *Clinical Infectious diseases*, 2007 April 15; 44 (8): 1084-1088 p.
- 16 Hampton A. W, Mackenzie J S. The Influenza Viruses. *MJA*. 2006 November 20: Vol 185 (10):39-43p.
- 17 Snacken R, Kendal A. P, Haaheim L. R, Haaheim L. R, Wood J. M. The Next Influenza Pandemic: Lessons from Hong Kong, 1997. *Emerging Infectious Diseases*, 1999 Marc-April: Vol.5 (2):195-202p.
- 18 Haugen D. Musser S. Pandemics. Miami, Greenhaven Press, 2007: 7-32p.
- 19 Wikipedia, The free encyclopedia. 2009. Web.29 Jul 2009. <<http://en.wikipedia.org>>.
- 20 Hayas J. N., The Burdens of Disease, Epidemics and Human Response in Western History. New Brunswick, New Jersey and London. Rutgers University Press. 1998. 35-274p.
- 21 Oldsone M. B. A., Viruses, Plagues and History. Oxford University Press, 2000:172-204p.
- 22 Oldson R. D., Heffernan R., Paladini M., Kontoy K., Weiss D., Mostashari F., Monitoring the Impact of Influenza by Age: Emergency Department Fever and Respiratory Complaint Surveillance in New York City. *Plos Medicine*, 2007 August: Vol. 4 (8), 1349-1361p.
- 23 Michaels B., Thomas I., Royen P. V., Coenen S., Clinical Prediction Rules Combining Signs, Symptoms and Epidemiological Context to Distinguish Influenza from Influenza-like Illnesses in Primary Care: a Cross Sectional Study. *Bio Med Central*, 2011, Vol 12:4, 1471-2296p.
- 24 Ong A. K., Chen M. I., Lin L., Tan A. S. New N. W., Barkham T. Tay S. Y., Leo, Y. S., Improving the Clinical Diagnosis of Influenza-A Comparative Analysis of New Influenza A (H1 N1) Cases. *Plos One*, 2009 December: Vol 4 (12), 8435-8453.
- 25 Williams L., Wilkins, Professional Guide to Signs & Symptoms, New York, Library of Congress, 2007, 5th Edition, 174, 175, 305, 391, 751 p.
- 26 3D View - Full Sliced w/Key." CDC Centers for Disease Control and Prevention. Web. 13 Jun 2011. <<http://www.cdc.gov/h1n1flu/images.htm>>.
- 27 Mahy B. WJ, Kangro H. O. "Virology Methods Manual" California, Academic Press. 1996: 29-43p.

- 28 Richardson L. V. L., González G. A., Coronel M. D. L., Aldama C. O., Gómez A. C. M., Desentis. L. J. F., Ramón R. T.A., del Valle G. A. I., García V. Leopoldo. Coreño J. M. O., Matías M. D. R., Vega D. M., Ramírez. R. K. C., “Manual de Vacunación 2008-2009” Centro Nacional Para la Salud de la Infancia y la Adolescencia. 2008. 23. 99-102p.
- 29 Harper S. A., Fukuda K, Uyeki T. M, Cox N. J, Bridges C. B, “Prevention and Control of Influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices” (ACIP) CDC, May 28, 2004/53 (RR06);1-40p.
- 30 Estados Unidos Mexicanos. Gobierno Federal. “Esquema de Vacunación” 2013
- 31 Grohskopf L., Uyeki T., Bresee J., Cox N., Bridges C., “Prevention and Control of Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices” (ACIP) CDC, August 2011, 60 (33), 1128-1132
- 32 “Estadísticas del Medio Ambiente del Distrito Federal y Zona Metropolitana 2000”, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, 2001, México, 86-125p.
- 33 Soler A.A., Avendaño V.B., Ramírez H. F. Gonzáles S. JL., Ibarra E. JC. Martínez A. MM., Román F. MA, Olivero J. R., Máximo P. R., Rodríguez P. C. “Inventario de Emisiones a la Atmósfera, Zona Metropolitana del Valle de México 2000”, Gobierno del Distrito Federal, México, 161 pp.
- 34 “Calidad del Aire en la Ciudad de México 2008”, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, 2009, México, 38-43p.
- 35 Wong T.W., Tam W, Sun Yu I. T., Wun Y. T. Wong A. H. S. Wong C. M., “Association Between Air Pollution and General Practitioner Visits for Respiratory Diseases in Hong Kong”, Thorax, March 2006, 61:585-591p.
- 36 Hahat S., Anderson H. R. Atkinson R. W., Hains A., “Effects of air pollution on general practitioner consultations for upper respiratory diseases in London”, Occup Environ Med, October 2002: 59, 294-299p.
- 37 Klein S.L., Passaretti C., Anker M., Olukoya P., Pekosz A., “The impact of sex, gender and pregnancy on 2009 H1N1 disease”, Biology of Sex Differences, 2010, 1:5, 1-12p.
- 38 Avitsur R., Mays J. W., Sheridan J. F., “Sex Differences in the Response to Influenza Virus Infection: Modulation by Stress”. National Institute of Health. Febrero 2011, 59(2):257-264.

- 39 Neumann G., Noda T., Kawaoka Y., “Emergency and Pandemic Potential of swine-origin H1N1 Influenza Virus” *Nature*. 18 de Junio 2009, Vol. 459. 931-939.
<<http://www.nature.com/nature/journal/v459/n7249/images/nature08157-f2.2.jpg>>
- 40 Christman MC, Kedwaini A, Xu J, Donis Ro, Lu G. Pandemic (H1N1) 2009 Virus revisited: an Evolutionary Retrospective. *National Institute of Health*, Julio 2011; 11 (5) 803-811.
- 41 Higuera A I L, Kudo K, Manabe T, Corcho B A E, Corrales B A, Alfaro R L, Guevara G R, Manjarrez Z M E, Takasaki J, Izui Shinyu, Bautista E, Peres P J R. Reducing Occurrence and Severity of Pneumonia Due to Pandemic H1N1 2009 by Early Osetamivir Administration: A retrospective Study in Mexico. *Plos one*. Julio 2011, 6 (7) 1-8.
- 42 Pourbohloul B, Ahuedc B A, Davoudia B, Mezaa R, Meyersd A L, Skowronskie D M, Villaseñor I, Galván F, Cravioto P, Earng D J D, Dushoffg J, Fismanh D, Edmundsi W J, Huperj K N, Scarpinod D S, Trujillo J, Lutzowc M, Morales J, Contreras A, Chávez C, Patricke D M, Brunhama C R. Initial human transmission dynamics of the pandemic (H1N1) 2009 virus in North America” *National Institute of Health*. Septiembre 2009, 3 (5), 215-222.
- 43 Leung G. M., Nicoll A. “Reflections on Pandemic (H1N1) 2009 and the International Response” *Plose Medicine*. Octubre 2010, 7 (10), 1-6.
- 44 Manjarrez Z M E, “Antecedentes y Origen de la Epidemia” *Neumología y Cirugía de Tórax*, Vol.66 (S1):S4-S11, 2007.
- 45 World Health Organization. Department of Communicable Disease Surveillance and Response Global Influenza Program. “WHO Global Influenza Preparedness Plan”. Suiza: Minimum Graphics, 2005. 53pp.
- 46 Mays W. J., Bailey T. M., Hunzeker T. J., Powell D. N., Papenfuss T., Karlsson A. E., Padgett A. D., Sheridan F. J. “Influenza Virus-Specific Immunological Memory Is Enhanced by Repeated Social Defeat”, *The Journal of Immunology*, Vol. 184:2014-2025, 2010.
- 47 Fernandez-Sesma A., Marukian S., Ebersole J. B., Kaminski D., Park M., Yuen T., Sealfon C. S., García-Sastre A., Moran M. T. “Influenza Virus Evades Innate and Adaptive Immunity via the NS1 Protein”, *Journal of Virology*, Vol 80(13):6295-6304, 2006.
- 48 White R. M., Doss M., Boland P., Tecle T., Hartshorn L. K., “Innate Immunity to Influenza Virus: Implications for Future Therapy”, *Expert Reviews Clinical Immunology*; Vol. 4(4):497-514, 2008.

- 49 Canadian Public Health Laboratory Network. National Microbiology Laboratory. "Guidance for Laboratory Testing for Detection and Characterization of Human Influenza Virus for the 2010 – 2011 Respiratory Virus Season", Manitoba: 1-16p. 2012
- 50 Pérez-Ruiz M., Yeste R., Ruiz-Pérez M. J., Ruiz-Bravo A., de la Rosa-Fraile M., Navarro-Marí J. M. "Testing of Diagnostic Methods for Detection of Influenza Virus for Optimal Performance in the Context of an Influenza Surveillance Network". Journal for Clinical Microbiology. Vol. 45 (9)3109-3110, Septiembre 2007.
- 51 Mahy B, Kangro O. H. "Virology Methods Manual", London. Academic Press. 1996: 374 pp.
- 52 Buist S. Mapp C. E. "Respiratory Diseases in Women" European Respiratory Monograph. Vol.8 (25) 1-242. Junio 2003.
- 53 Australian Institute of Health and Welfare. "Chronic Respiratory Diseases in Australia: their Prevalence, Consequences and Prevention". Canberra: 73pp 2005.
- 54 "Mortalidad: Información de 1990 al 2011." Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Web. 30 Mayo 2013.
http://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/Proyectos/bd/continuas/mortalidad/MortalidadGeneral.asp?s=est&c=11144&proy=mort_mg?s=est&c=11144>.
- 55 México. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. "Indicadores Sociodemográficos de México (1930-2000)". Aguascalientes, Ags., 2001. 1-355p.
- 56 Li J, Arévalo M. T. y Zeng M. "Engineering influenza viral vectors", Bioengineered. Vol 4(1). 9-14p. Enero 2013.
- 57 Sun X, Shi Y, Lu X, He J, Gao F, Yan J, Qi J, Gao GF, "Bat-derived Influenza Hemagglutinin H17 Does Not Bind Canonical Avian or Human Receptors and most Likely Uses a Unique Entry Mechanism", Cell reports, Vol 3(3):769-78 p. Marzo 2013.
- 58 Cruz-Martínez A. "Incumplió la Ssa compromiso de fabricar en México la vacuna contra la influenza - Con Salud y en Forma". La Jornada. 09-06-12. Pag 41.