

Universidad Autónoma de Guadalajara

10
2ej

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



"EVIDENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS
DE INFLUENZA B/SINGAPORE/222/79 EN PERSONAS DE LA
CD. DE GUADALAJARA, JALISCO".

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ISABEL YOSHIMI KISHI LOYO

Asesor: Q.B.P. Julio Jaime Mendiola Gómez

GUADALAJARA, JAL.

1988

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

	PAG.
DEDICATORIAS	
CAPITULO 1	
Introducción -----	1
CAPITULO 2	
Generalidades:	
2.1. Aspectos generales del virus de influenza.	7
2.2. Características inmunológicas de: virus de Influenza -----	17
2.3. Aspectos generales de la enfermedad causa_ da por el virus de influenza -----	31
2.4. Fundamento de la prueba inmuno-enzimática-	53
CAPITULO 3	
Material y Método -----	67
CAPITULO 4	
Resultados -----	82
CAPITULO 5	
Conclusiones -----	123
CAPITULO 6	
Bibliografía -----	129

CAPITULO 1.

- * Introducción.

CAPITULO 2.

*Generalidades:

- 2.1. Aspectos generales del virus de -
Influenza.
- 2.2. Características inmunológicas del
virus de Influenza.
- 2.3. Aspectos generales de la enferme-
dad causada por el virus de in-
fluenza.
- 2.4. Fundamento de la prueba inmuno-en-
zimática.

CAPITULO 3.

- * Material y Método.

CAPITULO 4.

- * Resultados.

CAPITULO 5.

- * Conclusiones.

CAPITULO 6.

- * Bibliografía.

DEDICATORIAS.

DEDICACION ESPECIAL

A DIOS:

Por brindarme esta oportunidad

A MIS PADRES:

Ing. Yoshihiro Kishi Okasaki

Irma Loyo de Kishi

Por haberme ayudado a realizar la meta de mi vida.

A MIS HERMANAS:

Midori

Mie

Sayuri

Megumi y

Emy

Por su entusiasta ayuda en todos mis trabajos.

A MI ABUELITA:

Isabel Zapata de Loyo

Por la ayuda espiritual tan grande que me brindó.

A MIS TIOS:

Isabel Loyo Zapata

Pilar Loyo de San Román

Manuel San Román

Por su ayuda en los momentos más difíciles.

A MI MAESTRA:

Q.F.B. Ma. del Refugio Soto Rizo

Por su enseñanza durante mi carrera.

AL DOCTOR:

Fernando Santoscoy

Por su ayuda desinteresada.

A MI DIRECTOR Y ASESORES:

Dr. Guillermo Santoscoy Gómez

Q.B.P. Julio Jaime Mendiola Gomez

Q.F.B. Ma. Socorro Pulido

Por su orientación.

A MIS COMPANEROS:

Por los gratos momentos que vivimos juntos.

A MI ALMA MATER.

**"EVIDENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE
INFLUENZA B/SINGAPUR/222/79 EN PERSONAS
DE LA CIUDAD DE GUADALAJARA
JALISCO".**

CAPITULO I

Introducción.

INTRODUCCION.

Las enfermedades que en la actualidad padece el hombre con mayor frecuencia y más conocidas, son las causadas por los virus.

El ser humano tiene que enfrentarse a una variedad de virus desde que nace, hasta que muere, pudiendo alguno de estos virus causarle la muerte. Entre estos se encuentran los virus de la varicela, sarampión, parotiditis, rubéola, poliomielitis, herpes, entre otros. Así también los virus respiratorios, varias veces al año aquejan al hombre infectándolo, produciéndole el catarro común y otros trastornos respiratorios superiores como faringitis bronquiolitis, laringitis, bronquitis hasta neumonía. Posteriormente tendrá que enfrentarse a aquellos que provocan gastroenteritis, hepatitis, meningitis viral y pueden en circunstancias especiales adquirir el de la rabia y a los arbovirus.

Las enfermedades del aparato respiratorio en el hombre pueden deberse no solamente a los virus, sino a otros microorganismos como las bacterias, Mycoplasma, hongos, rickettsias, y chlamydias, por lo que dichas enfermedades pueden tener dificultad para encontrar su etiología com-

pleja, sin embargo, puede ser menos complicada su clínica.

La enfermedad provocada por el virus de Influenza es una enfermedad respiratoria aguda, que puede ser causada por Influenza virus tipo A y B. La enfermedad usualmente ocurre en epidemias, empezando con un rudo ataque y una extensión muy rápida en una determinada región geográfica. Dicha extensión puede empezar desde pequeños brotes focales, hasta el desarrollo de grandes epidemias y pandemias. Dentro de los virus de Influenza se encuentran el Influenza virus tipo C que causa un suave resfrío o una enfermedad subclínica teniendo epidemias aún no documentadas.

Esta enfermedad causada por el virus de Influenza afecta fundamentalmente el tracto respiratorio superior. Es frecuente encontrar síntomas generales que suelen ser benignos y autolimitados en los cuadros clínicos que se presentan, pero en muchas ocasiones puede complicarse y provocar mayor gravedad hasta llegar a desarrollar neumonías y en varios casos, la muerte.

Ante estos acontecimientos tan importantes, se seleccionó el trabajo realizado por no haber investigaciones en México respecto al virus de Influenza B/SINGAPORE/222/

79, virus que más causó graves daños durante sus epidemias y en México no ha habido ningún reporte acerca del mismo.

En muchos casos puede ocurrir que una persona que cursa con Influenza o gripe no se le dé atención ni diagnóstico adecuado produciendo esto, un desencadenamiento de la - enfermedad y tener un desenlace fatal. En este y muchos - casos, los métodos serológicos de laboratorio pueden con-firmar un diagnóstico clínico virológicamente, determinan-do la presencia de anticuerpos contra dicho virus o del virus mismo, determinando sus antígenos, en el paciente.

En la actualidad hay varios métodos para obtener el - virus puro, libre de contaminaciones como bacterias, hongos, etc., método que necesitan de aparatos sofisticados y material exclusivo, sin embargo, también hay métodos que - determinan los antígenos o anticuerpos que produce o provoca el virus con mucha mayor facilidad y economía, como por ejemplo, las técnicas o métodos inmuno-enzimáticos que dala evidencia del antígeno o anticuerpo. En el caso del antigeno se necesitan anticuerpos monoclonales y en el del - anticuerpo, antígenos puros. Se probará en este trabajo a partir de lo anterior, la eficacia que tiene la prueba de-ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay) para determinar- si la persona estuvo en contacto con el virus de Influenza

B/SINGAPORE/222/79. En este caso el antígeno del virus de Influenza B/SINGAPORE/222/79 se obtuvo a partir de cultivos puros de embriones de pollo.

El método de ELISA puede emplearse no solo para determinar la presencia del virus B/SINGAPORE/222/79, sino también para diferentes virus y microorganismos, solo se necesita tener, ya sea el antígeno o anticuerpo respectivo de lo que se quiere detectar. Con esto se demuestra que la técnica de ELISA es útil por ocupar cantidades pequeñas de reactivos y sustancias químicas, y por ser más sensible y exacta para muchas pruebas diagnósticas.

Dentro del método de ELISA existen diferentes variantes de los ensayos para determinar antígenos o anticuerpos, según se requiera. Entre estos, dos de los más utilizados están el método indirecto y el método de doble anticuerpo o comúnmente llamado de sandwich, que tiene una inmensa gama de variantes. En el método indirecto podemos detectar y medir las cantidades de anticuerpos específicos contra un antígeno, usando la fase sólida con el mismo; en el método del doble anticuerpo o sandwich se utilizan para detectar antígenos o anticuerpos específicos absorbidos a la fase sólida.

Este método como se verá, es fácil manejarlo y muy económico así como eficaz para diagnosticar muchas enfermedades y para prevenir el desarrollo de las mismas, pudiendo evitar el contagio y la producción de epidemias o pandemias.

CAPITULO 2.
GENERALIDADES.

- 2.1.) Aspectos generales del virus de Influenza.**
- 2.2.) Caracterfsticas inmunológicas del virus de Influenza.**
- 2.3.) Aspectos generales de la enfermedad causa_ da por el virus de Influenza.**
- 2.4.) Fundamento de la prueba inmunoenzimática.**

GENERALIDADES.

2.1. Aspectos Generales del Virus de Influenza.

Dentro de la familia Orthomyxoviridae se encuentra - el virus que provoca la gripe humana. Dentro de esta familia existe un género conocido como Influenza que tiene - dos especies: el tipo A y el tipo B, aunque en la actualidad se conoce otro nuevo género con el nombre de In - fluenza virus tipo C.

En el género de Influenza los tipos A y B, son muy - semejantes entre sí, por lo que es muy difícil diferen - ciar a ambos, aunque en algunas ocasiones las cepas de In - fluenza B son mayores en tamaño que las cepas de Influen - za A. Desde el momento en que empieza el crecimiento del virus en el huevo embrionado, o durante el primer asila - miento, se puede observar que el virus puede tener forma - de esferas o de filamentos y no importando la forma, son - infectantes por igual.

En la estructura del virus de Influenza podemos ver - que dicho virus está formado por una nucleocápside de for - ma helicoidal, y que esta cápside a su vez, está formada - por cinco u ocho segmentos de RNA asociándose con una nu -

cleoproteína. Una membrana glucolípida envuelve a la nucleocápside, dicha membrana es derivada de la membrana plasmática del huésped durante un proceso de gemación. La membrana glucolípida tiene una capa interna de proteína (M) electrodensa, la cual ha sido especificada por el virus, representando así la capa externa de la cápside viral. Dentro de la superficie externa de la bicapa lipídica se encuentran insertados dos glucopéptidos específicos del virus: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), teniendo ambos la forma de "espinas" o peplómeros, proyectándose de la superficie del virión.

La nucleocápside es una doble hélice formada por especies simples de proteínas, nucleoproteínas (NP), y por algunos segmentos del genoma RNA.

Asociados a la nucleocápside se encuentran uno o más péptidos (P), pudiendo estos representar a la transcriptasa que es requerida para la síntesis del mRNA, utilizando al genoma del RNA viral (vRNA) como plantilla. Sin embargo, hay otros elementos contenidos como son las proteínas no estructurales (NS) especificadas también por el virus, en el núcleo de las células que han sido infectadas.

El virión RNA contiene 8 segmentos, de los cuales, -

los tres más largos contienen los códigos genéticos para los polipéptidos (P_1 , P_2 , P_3) requeridos para la actividad específica del RNA dependiente y RNA polimerasa; los tres segmentos de tamaños intermedios contienen el código para la hemaglutinina, nucleoproteínas (NP) y neuramidas; y por último, los dos segmentos más pequeños constituyen el código para la estructura interna proteica del virión (M Protein) y para la proteína no estructural (NS) - polipéptida establecida solo en células infectadas por el virus.

En cuanto a la forma del virus de Influenza se puede decir que son polimorfos, con un diámetro aproximado de 100 nm, en forma de espiral o de varias micras en forma de filamentos. Este polimorfismo ha sido comprobado durante los aislamientos del virus en los embriones de pollo. La proyección superficial mide de longitud aproximadamente de 8-10 nm, teniendo unos intervalos espaciales de 8 nm en el virus. En el virus de Influenza tipo C puede poseer una estructura reticular en la superficie. En Influenza virus tipo A y B la nucleocápside puede ser un largo rollo, como paquete con un diámetro de 50 nm y de varias micras de largo.

CARACTERISTICAS DEL VIRUS DE INFLUENZA

Orthomyxoviridae (Virus de la gripe)

Virión

Forma _____ Esférica, filamentosa.
 Tamaño (nm) _____ 80-120, 80-120x=400

Membranas y Proyecciones

Hemaglutinina _____ Si
 Neuraminidasa _____ Si
 Hemolisina _____ No

Nucleocápside

Diámetro (nm) _____ 9
 No. de Fragmentos _____ 8
 Localización en células
 (replicación) _____ Núcleo

Los peplómeros: Neuraminidasa y Hemaglutinina tienen diferentes características:

HEMAGLUTININA (HA): La forma de la Hemaglutinina es como espigas o peplómeros, las cuales miden 4 nm de diámetro por 14 nm de largo, teniendo un peso molecular de - - 225,000. Cada "espiga" puede ser constituida por tres HA

polipéptidas con peso molecular de 75,000-80,000, teniendo enlaces hidrofóbicos e hidrofílicos para formar la membrana. Los sitios antigénicos y las células rojas residen en la región hidrofílica de la molécula. El estudio del mapa peptídico revela grandes diferencias en la secuencia de los amino ácidos entre las HA del subtipo de Influenza A. Las glicoproteínas con una marcada diferencia en la secuencia de los amino ácidos son capaces de ser funcionalmente activas y el grado de diferencia puede ser relativo al grado de variación antigénica.

Por medio de la Hemaglutinina, el virus de Influenza cuando se mezcla con eritrocitos de muchas especies animales, produce una aglutinación, esto se debe a que las hemaglutininas reaccionan específicamente a las glucoproteínas que contienen ácido neuramínico presente en la superficie del eritrocito. Mediante este tipo de reacción que puede llevarse a cabo, se ha podido titular el virus in vitro, por medio de diluciones seriadas que contengan virus en suspensiones de eritrocitos, las cuales muestran un punto terminal indicando así la concentración viral.

NEURAMINIDASA (NA): La neuraminidasa, al igual que la Hemaglutinina, es uno de los antígenos más importantes del virus de Influenza, éstas están constituidas por antf

genos comunes en cada subtipo mostrando algunas variaciones antigénicas. La neuraminidasa se establece con menor frecuencia en la envoltura del virión que la Hemaglutina. Estos peplómeros aparentemente constan de un tetrámero de polipéptidos de Neuraminidasa, cada uno con un peso molecular de 58,000.

La neuraminidasa es producida también por otros microorganismos como *Vibrio cholerae* y *Clostridium perfringens*, cuando los eritrocitos son tratados con este tipo de enzimas, estos ya no son aglutinables por acción de los mixovirus, por lo que se les dió el nombre a este tipo de enzimas bacterianas de RDE (Enzimas Destructoras de Receptores).

Con esto se explica que cuando se ha llevado a cabo la hemaglutinación con el virus de Influenza, esta si se deja un tiempo determinado, las partículas virales sufren una elución espontánea.

Dicha elución puede deberse a la degradación de los receptores específicos de la célula huésped por acción de la neuraminidasa.

COMPONENTES DEL VIRION DE INFLUENZA.

Componente	Localización	Peso molecular (daltones)	
RNA(-)	Nucleocápside	4.8×10^6 +	Genoma viral, se presenta en 5 a 7 segmentos de tira simple.
HA	Peplómero en la superficie viral.	80,000 ++	Glucoproteínas - con propiedades - hemaglutinantes.
NA	Peplómero en la superficie viral	60,000	Glucoproteínas - con actividad de neuraminidasa (enzimática).
NP	Asociado con RNA viral	60,000	Proteína con afinidad para RNA; - puede enlazar segmentos de RNA.
M	Membrana	25,000	Proteína (s) de la membrana.
P	Asociado con nucleocápside	90,000	Proteína (s) con posible actividad de transcriptasa.

+ Peso molecular de los segmentos de RNA.

++ Constituidos por dos subunidades enlazadas en forma NO covalente, HA₁ (55,000 daltones) y HA₂ (25,000 daltones).

Durante la multiplicación viral, los componentes del virión se unen por medio de la membrana plasmática del hues

ped. Las proteínas HA y NA migran hacia la membrana plasmática donde son insertadas en la parte interna, glicosilándose. La proteína M se sitúa en la parte interna de la membrana, acumulándose ahí, en el sitio donde se llevará a cabo la gemación, los componentes de la nucleocápside rodean a los otros elementos fijándose a la membrana del huésped, liberándose los viriones de la superficie de la célula huésped, por posible acción de la neuraminidasa.

El virus de influenza al igual que otros microorganismos, puede ser inactivado, sin embargo, las formas de inactivación suelen ser diferentes a la de otros microorganismos.

Los virus infecciosos de Influenza pueden ser destruidos mediante varios tratamientos: Calentamiento a 56 grados centígrados, con solventes de lípidos, ácidos, formaldehído, beta propiolactona o irradiación con luz ultravioleta. La infectividad está afectada por congelamiento y descongelamiento sucesivos o en una temperatura estándar de -20 grados centígrados. La preservación de estos virus puede ser por medio de liofilización con 0.5% de gelaína, manteniéndose a 4 grados centígrados o por congelación de suspensiones líquidas a una temperatura de -60-grados centígrados con la presencia de cantidades mínimas

de 1% de proteínas estabilizadoras.

En lo referente a su nomenclatura, el virus de In_ -
 fluenza recibe su nombre en base a sus tipos de antígenos,
 información epidemiológica, incluyendo el huésped de ori_
 gen, lugar y año de aislamiento. Para el virus de Influen_
 za tipo A, su nomenclatura sigue la descripción de un an_
 tígeno de la hemaglutinina y los subtipos de neuraminida_
 sa. Por ejemplo los prototipos de cuatro subtipos de he_
 maglutininas humanas son: A/PUERTO RICO/8/34 (H0N1), A/
 FORT MONMOUTH/1/47 (H1N1), A/SINGAPORE/1/57 (H2N2) y A/
 HONG KONG/1/68 (H3N2).

También podemos encontrar 11 diferentes subtipos de
 hemaglutininas y 7 diferentes subtipos de neuraminidasa -
 reconocidas en los aislamientos de los virus tipo A de ca_
 ballos, puercos y pájaros. En este caso las designacio_
 nes del nombre se basan en el origen del huésped; como -
 por ejemplo: A/equine/Prague/1/56 (Hq1 Nq1) y A/tern/
 South Africa/61 (Hav1 Nav1).

Algunos subtipos de hemaglutininas y neuraminidasas -
 son compartidas en muchos aislamientos de diferentes espe_
 cies. Cada uno de los subtipos de hemaglutininas y neura_
 minidasas pueden tener un grado considerable de heteroge_

nicidad antigénica; como por ejemplo A/HONG KONG/8/68 y - A/VICTORIA/3/75 que pueden dar reacciones cruzadas dentro de la inmunodifusión siendo ambos antígenos considerados como H3N2, sin embargo, esto puede ser fácilmente diferenciable por medio de pruebas como: Inhibición de la Hemaglutinación (NAI) y Neuraminidasa Inhibición (NI). Con dichas pruebas se pueden designar los nombres representativos de las agrupaciones de antígenos dentro de un subtipo.

2.2. Características Inmunológicas del Virus de Influenza.

Dentro de las características inmunológicas del virus de Influenza, podemos citar como una de las más importantes; su composición antigénica, ya que debido a esta se promueve y produce la respuesta inmunológica del paciente que ha estado en contacto con dicho virus.

El virus de Influenza está constituido por dos clases de antígenos:

- 1) Antígenos profundos.
- 2) Antígenos superficiales.

1.- Antígenos profundos: En el tejido infectado como en las células libres y en el virus, podemos encontrar un antígeno soluble, conocido también como antígeno "S", llegándose a pensar que puede ser la nucleoproteína que constituye la nucleocápside, la cual puede extraerse del virus por medio del éter. Este antígeno "S" son antígenos específicos tipos de Influenza virus tipo A, B o C, en donde también podemos incluir a la proteína M (Membrana o Matriz) como otro antígeno específico tipo.

El antígeno "S" puede demostrarse por medio de prue-

bas de Fijación de Complemento. Ante este antígeno se forman anticuerpos como respuesta inmunológica a la infección, cosa que no sucede cuando la persona ha sido inmunizada con el virus inactivado o parcialmente puro.

2.- Antígenos superficiales: Dentro de estos antígenos incluimos a la hemaglutinina y neuraminidasa. Antígenos que a su vez están formados por factores antigénicos que pueden ser: Mayores o específicos de subtipos y Menores o específicos de cepas.

Los antígenos profundos se dividen en tres tipos: Tipo A, Tipo B y Tipo C. Donde el Tipo A sufre otra división de acuerdo a sus antígenos superficiales en: subtipos y cepas o variantes antigénicas, las cuales han dado lugar a cuatro subtipos del virus gripal; H0N1, H2N2, H3N2, H1N1, sin embargo, por la semejanza que se ha encontrado entre los antígenos H0 y H1 se subdividen en la actualidad solo en tres tipos; H1N1, H2N2, H3N2.

El virus de influenza sufre variaciones antigénicas primordiales en la superficie de los viriones, es decir, la variación es medida por múltiples determinantes en la hemaglutinina y neuraminidasa, (antígenos superficiales); presentándose la variación en mayor proporción -

en Influenza virus tipo A y en menor escala en Influenza-virus tipo B. En los Influenza virus tipo C, la variación antigénica ha sido estudiada muy poco por medio de aislamientos. Los determinantes antigénicos de la hemaglutinina son: H0, H1, H2, H3, de los cuales los más compartidos por los virus son el H0 y H1 y los menos comparados los H2 y H3. Dentro de los determinantes antigénicos de la neuraminidasa tenemos a N1 y N2.

Así las variaciones antigénicas del virus de Influenza las podemos dividir en dos grandes grupos:

- 1) Variaciones mayores.
- 2) Variaciones menores.

1.- Variaciones mayores: Se deben a grandes cambios en el genoma viral, que por lo general afectan a solo un fragmento o gen, llamado, fenómeno del salto antigénico o "antigenic shift" lo cual supone una nueva aparición de antígenos en la hemaglutinina o neuraminidasa, o en ambas. Dicho fenómeno se produce cada 10 ó 20 años formando nuevos subtipos.

Estas variaciones se han observado primero en las hemaglutininas y posteriormente en las neuraminidasas dando lugar a cuatro subtipos que han predominado en el mundo -

en diferentes períodos de tiempo, mencionados anteriormente (H0N1, H1N1, H2N2, H3N2).

2.- Variaciones menores: Se deben a pequeños cambios producidos en una parte limitada del genoma viral, formándose por medio de mutaciones (mutaciones puntuales) y que afectan a uno o pocos amino ácidos. Estas variaciones frecuentes que se presentan en forma progresiva y acumulativa se conocen como fenómeno de cambio o deslizamiento antigénico o "antigenic drift", condicionando la aparición de variantes antigénicas en las cuales las personas-inmunizadas actúan como un mecanismo de selección de las nuevas mutantes. Las variantes antigénicas se presentan en todos los subtipos del tipo A y causan los brotes interpandémicos, cuya intensidad está relacionada con la importancia de la variación.

Existen otros tipos de variaciones, las cuales incluyen cambios morfológicos del virion, tipo de huésped y patogenicidad. Las hemaglutininas que actúan con los eritrocitos de cobayos y humanos pero no de aves de corral, son las que constituyen los virus obtenidos durante un aislamiento primario, dicho virus se ha desarrollado más fácilmente en la cavidad amniótica que en la cavidad allantoidea del huevo de gallina embrionado, dándole el nombre

a estos aislamientos primarios de "estado original o estado O". Por lo contrario, las hemaglutininas que actúan con los eritrocitos de aves de corral, forman parte de los virus que han sido desarrollados en la cavidad alantoidea, por medio de varios pasos adicionales, estos pasos adicionales producen una rápida pérdida de virulencia para el hombre. Los virus que tienen estas características se dicen que están en "estado derivado o estado D" y al cambio se le llama "variación O-D". Otro tipo de cambios serían la variante endoteliotrópica producida por el paso del virus en la membrana corioalantoidea y la variante neurotrópica como resultado del paso del virus en el cerebro del ratón, por ejemplo, una cepa inculada en el cerebro de ratón y no es adaptada para este tipo de inoculación produce un virus incompleto o no infeccioso.

Dentro del género de Influenza, sabemos que existen tres tipos: el tipo A aislado en 1933, el tipo B aislado en 1940 y el tipo C aislado en 1949, presentando variantes antigénicas, las cuales cursan con períodos de prevalencia; por ejemplo, los primeros virus que fueron aislados, relacionados con la gripe porcina, contaban con una composición antigénica HON1 cuyo período de prevalencia duró 12 años, desde 1933 a 1945; en 1946 se observó un cambio en la hemaglutinina y aunque no fue un cambio im-

portante, fue considerada como una variación mayor dando lugar al subtipo H1N1, que duró 10 años, de 1946 a 1956.- Posteriormente, como ya se mencionó se demostró que no había mucha diferencia entre las hemaglutininas H0 y H1 por lo que ya no se consideró como una variación mayor quedando los virus aislados entre 1933 y 1956 dentro del subtipo H1N1 y las diferencias encontradas se consideraron solo como variaciones menores. En 1957 que apareció una variación antigénica con un gran cambio, la cual se denominó como subtipo H2N2, y fue la que provocó la pandemia de la gripe asiática. En 1968 aparece la tercera variante mayor, en la que se observó un cambio en la hemaglutinina, y dio lugar al subtipo H3N2 que predomina en la actualidad.

Sin embargo, en 1977 se observó una nueva variante mayor, el virus A/URSS/90/77, virus que pertenece al subtipo H1N1, muy similar a los virus que se encontraron entre 1947 y 1957, por lo que se deduce que la mutante apareció después de 25 ó 30 años.

En todos los subtipos han estado presentes las variaciones menores, causando los brotes interpandémicos. Por ejemplo; el virus Hong Kong (H3N2) que provocó una pandemia, sufrió mutantes menores y el resultado de estas va-

riaciones menores fueron los virus que produjeron las epidemias posteriores, como son: Hong Kong (1971), England- (1972), Port-Chalmers (1973), Scotland (1974), Victoria - (1975), Texas (1977), y Bangkok (1979).

Estas variantes del virus de Influenza han ido apareciendo en forma sucesiva, reemplazando a las anteriores, - sin embargo, en la actualidad, se han encontrado en circulación en forma simultánea dos variantes menores, como - son Victoria y Texas o Texas y Bangkok pertenecientes al subtipo H3N2, también en el mismo caso se encuentran dos subtipos pertenecientes a H1N1 (variantes mayores) como - son variantes URSS y a H3N2, variantes Texas.

Clasificación de los virus de la Gripe.

Tipos	Subtipos	Cepas Prototipo.	Periodo de Prevalencia	Variantes Antigenicas.
A	H0N1			A/Hong Kong/107/71 (H3N2)
	H1N1	A/PR8/B/34	1933-1945	A/England/4/72 (H3N2)
	H1N1	A/FM/1/47	1946-1956	A/Port-Chalmers/73 (H3N2)
				A/Scotland/840/74
	H2N2	A/Singapore/1/57	1957-1967	(H3N2) ██████████
	H3N2	A/Hong Kong/1/68	1968	A/Victoria/3/75/(H3N2)
				A/Texas/1/77 (H3N2)
				A/Bangkok/2/79 (H3N2)

- B B/Massachusetts/
3/66
B/Hong Kong/5/72
- C C/Taylor/2233/47

La explicación de estas variaciones antigénicas es - que proceden de la interacción entre los eventos mutacionales antigénicos y las presiones de la selección inmunológica, la cual es permitida en huéspedes que poseen anticuerpos contra virus más viejos. Esto se muestra experimentalmente cuando el virus se desarrolla en huevos embrionados en presencia de anticuerpos o en animales parcialmente inmunes.

La gripe provocada por el virus de Influenza puede agruparse en dos clases: la gripe pandémica y la gripe epidémica, ambas basadas en el grado de inmunidad que presenta la población atechada por el virus, relacionada con el grado de variación antigénica que presenta el virus.

Cuando la variación del virus es mayor y frente a la cual la población se comporta como no inmune se dice que es una gripe pandémica. En este caso el virus no sufre ningún cambio en su composición antigénica y se difunde a nivel mundial. Durante la pandemia se observa una ele

vada morbilidad y mortalidad variable, pero importante.

La gripe epidémica aparece en forma brusca durante el invierno, localizados en una zona, región o país, siendo ocasionada por virus que solo han cursado con variaciones menores, presentándose entre periodos interepidémicos. Estas gripes alcanzan su acmé en 2-3 semanas y desaparecen a las 4-6 semanas de haber comenzado. Se ha dividido a su vez la gripe epidémica en dos tipos según su intensidad y difusión:

1) Epidemias polianuales: Aparecen con una nueva variante menor y en el caso del tipo A es cada 2-3 años y en el tipo B cada 5-6 años. Se distribuye mundialmente y según el grado de variación es la intensidad con la que afectan a la población.

2) Epidemias estacionales: Estas epidemias aparecen cada año con la misma variante, durante el invierno teniendo una capacidad y disfunción mucho menor, agotando así a la población susceptible durante los años epidémicos.

La respuesta inmunológica que produce el paciente al enfrentarse al virus de influenza, es otra de las caracte

rísticas que podemos observar en el virus. Esta va a depender de infinidad de circunstancias, pero la principal será del mecanismo inmunológico del paciente.

Respuesta Inmunológica: Los anticuerpos que se producen como defensa del organismo ante un ataque de Influenza virus; es una resistencia a la adquisición de una infección, o modificación del curso de una enfermedad, cuando la infección se produce; la inmunidad va a depender entonces de los anticuerpos neutralizantes que actúan frente a los antígenos superficiales del virus (Hemaglutininas y Neuraminidasas), siendo esta inmunidad aumentada durante la recuperación de la enfermedad o por medio de la inmunización con virus inactivados.

Al primer contacto con el virus, los anticuerpos aparecen en un lapso de una semana, después de haber estado en contacto con el antígeno viral, alcanzando su titulación máxima o cumbre a las cuatro semanas posteriores, dicho anticuerpo puede detectarse en la mucosa respiratoria, en la saliva, esputo, lavados traqueales. (IgA secretora) protegiendo durante meses o años al paciente contra cepas semejantes al virus en cuestión. Con esto podemos deducir que la inmunidad va aumentando también debido a que empiezan a reducirse la cantidad del virus al esparcirse-

este en las secreciones nasales.

Los anticuerpos que se presentan contra el antígeno "S", anticuerpos que por lo general son IgM predominando sobre los IgG, atacando a la ribonucleoproteína, los cuales son detectados fácilmente mediante las reacciones de Fijación de Complemento.

Contra los antígenos superficiales (HA y NA) se producen los anticuerpos neutralizantes respectivos; anticuerpos antihemaglutininas y anti-neuraminidasas. Esta neutralización viral se presenta en un grado mayor con los anticuerpos antineuraminidasa debido a un bloque espacial, donde las espigas de la neuraminidasa se encuentran en yuxtaposición cercana al antígeno hemaglutinante, del mismo modo, la antineuraminidasa previene e inhibe la liberación del virus de las células infectadas.

La función del anticuerpo es la de evitar o prevenir la fijación viral en las células epiteliales por medio de la hemaglutinina. Esta se realiza en la membrana de la mucosa respiratoria, se considera a la IgA como un factor muy significativo de la inmunidad contra el Influenza virus.

Al estar las células ya infectadas con el virus - -

producen Interferón dando lugar a una protección que dura unas cuantas semanas apareciendo posteriormente la respuesta inmune celular que evitará la penetración del virus a las células de la mucosa respiratoria.

Los anticuerpos locales (IgA secretora) presentes en las secreciones nasales presentan una duración corta, provocando esto la sensibilidad de las células hacia una nueva reinfección con virus que han tenido pequeños cambios-antigénicos. En este caso, la respuesta inmune contra la reinfección produce nuevos anticuerpos contra los antígenos que aparecen por primera vez, así como una hipérrpuesta o reacción anamnésica frente a los antígenos comunes de la cepa que produjo la primera infección en la infancia, encontrándose éstos con títulos mayores (doctrina del pecado antigénico original).

Los anticuerpos neutralizantes llevan a cabo la destrucción de las células infectadas por el virus por medio de dos mecanismos: Por combinación con complemento seguida de lisis y Por ataque por medio de linfocitos T citolíticos; evitando así que la célula infectada siga siendo una fuente de progenie viral. Dichos linfocitos T citolíticos solo pueden lisar a las células infectadas, si éstas, comparten por lo menos parte de la región de histo-

compatibilidad principal (HLA, en humanos) con las células que estimularon originalmente su desarrollo.

Existen dos hipótesis para explicar esta restricción genética:

"Primera Teoría: Los antígenos virales y los antígenos de histocompatibilidad son entidades separadas en la superficie de las células infectadas y que las células T poseen receptores independientes para estos dos tipos de moléculas (reconocimiento dual).

Segunda Teoría: Los antígenos virales y de histocompatibilidad forman un complejo molecular que es reconocido por un único receptor en los linfocitos T (propio alterado)". (7)

El mecanismo que se lleva a cabo por la combinación de anticuerpos y complemento, destruye primero a la célula infectada, antes de que estas se desintegren por sí solas como resultado de la infección, sin embargo, este tipo de defensa puede causar un shock hemorrágico al huésped alterándole sus sistemas vasculares y de coagulación.

Con la respuesta inmune creada por el individuo, puede

mos observar que a pesar de que el virus tiene muchas armas con que atacar al ser humano, también el ser humano - tiene armas con que contrarrestar ese ataque. El virus - gana la batalla debido a que el sistema inmunológico del organismo está deteriorado o suprimido; como resultado de infinidad de causas, o que existe una invasión combinada del virus y bacterias, acabando con el individuo en forma masiva. Pero también existen, además de una inmunidad natural del individuo una inmunidad profiláctica que ayuda en gran escala a disminuir o acabar contra la invasión viral.

2.3. Aspectos Generales de la Enfermedad Causada por el - Virus de Influenza.

La enfermedad causada por el virus de Influenza puede incluirse dentro de las enfermedades respiratorias - agudas. Estas enfermedades tienen un grado importante en cuanto a mortalidad y morbilidad ya que constituyen a los padecimientos que más comunmente acechan al hombre en - - nuestros días, así mismo son también un grave problema de salud pública debido a su frecuencia y a la gravedad que - presentan.

En México, la enfermedad aparece cada año, en forma epidémica, sin embargo, su diagnóstico clínico y epidemiológico es muy difícil por el hecho de que estas enfermedades tienen muchos agentes microbianos que pueden dar una sintomatología muy similar a la causada por el virus de - Influenza. En cuanto a los procesos clínicos por los que cursa la enfermedad tienen un amplio aspecto, ya que puede ir desde un resfriado, sin fiebre, hasta la neumonía - grave, que puede causar la muerte.

Entre los agentes causales que provocan una sintomatología similar a las causadas por el virus de Influenza se encuentran los Rinovirus, que asocian al resfriado co -

mún, el virus Sincitial Respiratorio con neumonía y bronquitis, Parainfluenza con crup y neumonía y Mycoplasma pneumoniae con neumonía atípica, con esto podemos observar que la mayoría de los agentes etiológicos, no son bacterianos, pueden ser virus, hongos y otros.

Al referirnos a los virus podemos encontrar que la infección provocada en las vías respiratorias en lactantes sería causada más comúnmente por el virus Sincitial respiratorio (RS) produciendo bronquiolitis, bronquitis y neumonía si ataca las vías respiratorias bajas. Los causantes del crup, los virus de parainfluenza, pueden afectar tanto a vías respiratorias altas y bajas. Estos virus provocan estos padecimientos en infecciones primarias, pero en infecciones subsecuentes o reinfecciones, tienden a ser más benignas. Respecto a los adenovirus, estos producen padecimientos en las vías respiratorias en el ejército (tipos 4 y 7), en forma más común y en forma menos común en niños y en estudiantes.

Los rinovirus son causantes del resfriado común en adultos, los coxsackie del grupo A causan padecimientos similares, sin embargo, el grupo B ocasiona enfermedades respiratorias febriles agudas con pleurodinia y cuadros gripales.

Se sabe también que virus como los de la varicela zoster y herpes, sarampión; pueden también causar problemas - en las vías respiratorias, no únicamente el virus de Influenza.

Sin embargo la frecuencia con que se presentan las infecciones respiratorias agudas se deben mayormente al virus de Influenza con sus tres variedades. Este virus produce las infecciones respiratorias de gran contagiosidad. La infección se lleva a cabo mediante un mecanismo en el cual se transfieren las secreciones respiratorias contaminadas con el virus de personas sintomáticas o asintomáticas a personas muy susceptibles, realizándose mayormente en condiciones ambientales con temperaturas bajas. El virus de Influenza A infecta principalmente durante los meses de diciembre, enero y febrero, cuya máxima infectividad se presenta en enero. En el caso del virus de Influenza B su infectividad es más frecuente durante el mes de marzo, afectando principalmente a los escolares causando el síndrome gripal y cuya recuperación se lleva a cabo en pocos días, sin embargo, cuando ataca a los lactantes o personas de edad avanzada puede causar la neumonía viral y el fallecimiento en determinados casos. Respecto al virus de Influenza A - debido a su lealtad antigénica que bloquea la producción de anticuerpos por una infección previa, ataca princi

palmente a personas mayores con frecuentes complicaciones respiratorias del tracto respiratorio inferior, llegando inclusive al fallecimiento personas mayores de 60 años.

El contagio del virus, cuya vfa de entrada es la respiratoria favorecidas por la desnutrición y por el hacimiento atacando por igual a ambos sexos y a niños o ancianos - siendo más frecuente el ataque hacia el adulto y anciano; se puede llevar a cabo de varias maneras siendo transmitido el virus principalmente por medio de las secreciones - respiratorias de personas infectadas con el virus, dispersando pequeñas partículas de aerosol en los estornudos, - tos y con menor frecuencia por contacto con manos sucias - u objetos contaminados con el virus o también por la exposición natural y simultáneo ataque a varias personas susceptibles, estando sujetadas a una persona contaminada, - ya que el virus de Influenza A ha mostrado ser estable en pequeñas partículas de aerosol o gotitas con cierto grado de humedad y temperatura, sin embarco, se ha observado - que también puede sobrevivir a menor grado de humedad y - temperatura.

Al penetrar el virus de Influenza al organismo esta - será neutralizada por los anticuerpos locales de infecciones anteriores o por los inhibidores inespecíficos que -

son contenidos en el moco (ácido neuramínico) o eliminan_ do por el sistema mucociliar. Sin embargo, si no puede - ser eliminado el virus por estos mecanismos, este se fija_ rá a los receptores mucoprotéicos, penetrando posterior_- mente, llevando a cabo su replicación en las células epi_ teliales del tracto respiratorio.

El período de incubación del virus al penetrar al or_ ganismo, depende de la dosis y puede variar desde cuatro_ días a cerca de un día. Después de uno o dos días de in_ cubación el virus puede observarse en la nasofaringe, don_ de la neuraminidasa viral va a aminorar la viscosidad del moco que cubre las vías respiratorias quedando de esta - forma al descubierto los receptores celulares, facilitán_ dose así la difusión del virus a las vías respirato_ -- rias bajas, sin embargo, si está presente el anticuerpo - local (IgA secretora) o altos niveles de anticuerpos séri_ cos la viremia puede ser abortada.

El virus se deposita en las células epiteliales del_ huesped fijándose a ellas por medio de la hemaglutinina, - iniciándose así el proceso infeccioso, es decir, empieza - el ataque penetrando en el epitelio cilíaco columnar del_ tracto superior e inferior causando necrosis celular, ya_ que ha sido absorbido el virus se lleva a cabo entonces -

el ciclo de replicación del virion replicándose en un tiempo aproximado de 3-4 horas, y su período de incubación es desde un día hasta 3-4 días después del ataque, pudiendo disminuir la cantidad del virus mediante las secreciones nasales derramadas por una semana o más. La liberación del virus se lleva a cabo por varias horas antes que la célula muera, con dicha liberación viral se empieza la invasión de las células más cercanas y continuas.

Característicamente el ataque del virus de influenza es bastante rudo o brusco presentando los pacientes principalmente; escalofríos, fiebres, cefalea, mialgias, adinamia, tos seca, anorexia, intenso quebrantamiento, faringitis, descargo nasal, leucopenia, laringitis, a veces complicado con bronquitis y bronconeumonía, siendo en los casos severos, la postración como sistema sintomático. De estos síntomas los más molestos son los dolores de cabeza o mialgias relacionados con la fiebre, las mialgias también pueden complicar a las extremidades o los músculos de la espalda. Otros síntomas observados son las artralgias, pero no la franca artritis. Dichos síntomas se presentan más o menos lo que dura la fiebre, es decir, tres días.

Se incluye en la sintomatología como datos de ayuda-

diagnóstica a los síntomas oculares que incluye; fotofobia, lagrimeo, sensación de quemadas y dolor al movimiento del ojo.

De estos síntomas la fiebre es considerada como hallazgo físico más importante, esta se eleva rápidamente llenando a su cumbre a los 100-104° F ó 39.4-40° C y ocasionalmente a los 106° F dentro de 12 horas, puede ser continua o intermitente especialmente si es administrado el antipirético. La fiebre de malasia y un suave dolor de cabeza duran entre 2-4 días en la enfermedad. La fiebre se presenta más comúnmente en niños que en adultos así como las adenopatías.

Los cambios patológicos que produce el virus en el organismo, van a presentar signos de inflamación de vías respiratorias altas y en caso de haber progresado la infección hasta llegar a los pulmones o en el caso de neumonía que puede ocasionar la muerte, implantándose el virus en bronquios, alveolos, llenándose los espacios alveolares con fluido de eritrocitos, leucocitos y membranas hialinas; habiendo también hemorragia.

Existe una descamación del epitelio cilíaco columnar en el lumen de los bronquios, mostrando a las células individuales encogidas, con núcleos pigmentados y pérdida de cilio.

Incluidos en los cuadros clínicos producidos por el virus de Influenza se encuentra el llamado Síndrome Gripal siendo este síndrome producido también por otros virus como: Adenovirus, Rinovirus, Enterovirus, Coxsackie grupo A y B así como los virus de la coriomeningitis linfocítica. Entre los signos físicos de este síndrome se encuentran los de la fiebre, (más alta en niños que en adultos), su pulso proporcional a la hipertermia, cara y conjuntivas congestionadas, garganta enrojecida mostrando nódulos linfoides hipertrofiados, brillantes en la pared posterior de la faringe, los pulmones suelen estar normales. Los datos de laboratorio generalmente son normales, con ligera leucopenia, velocidad de sedimentación aumentada, cultivos negativos, como las radiografías del tórax. En caso de las epidemias la mejoría de la enfermedad es pronta o espontánea, pero en las pandemias suelen haber complicaciones.

En cuanto a su tratamiento es sintomático, generalmente se administra aspirina y codeína, y se recomienda que se ingieran muchos líquidos.

Existen en este síndrome: formas menores y formas graves. En las formas menores se habla de enfermedades benignas y ambulatorias muy semejantes al resfriado común, bronquitis o faringitis, incluso de infecciones inaparentes o asintomáticas que solamente se detecta su presencia.

por pruebas serológicas. En general estas formas menores se presentan en niños mayores o en adultos infectados anteriormente por virus con relaciones antigénicas comunes o - que hayan sido vacunadas, siendo su manifestación casi inaparente.

Dentro de las formas graves, estas son producidas por complicaciones provocadas por el mismo virus, tales complicaciones como bronquiolitis, crup, neumonitis, encefalitis, síndrome de Reye; o por infecciones bacterianas secundarias. Entre las complicaciones bacterianas se encuentran las neumonías, bronconeumonías y procesos pulmonares crónicos tipos obstructivos que son mayormente responsables de casos graves y mortales. Durante las epidemias los enfermos intrahospitalarios pueden contagiarse de la enfermedad viral por diversas circunstancias como enfermedades crónicas, inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, revistiéndolos de una extraordinaria gravedad.

La frecuencia con que se presentan estos síndromes de la gripe es mayor en los niños que en los adultos debido a que los adultos han estado anteriormente en contacto con el virus o sus variantes antigénicas y han producido anticuerpos; lo mismo que en las mujeres, por el hecho de estar más en contacto con los niños que son considerados co-

mo los mejores transmisores de la enfermedad viral.

En cuanto a las complicaciones de la enfermedad del virus de Influenza antes mencionadas las podemos citar dividiéndolas en dos partes:

- 1) Neumonía viral Primaria de Influenza.
- 2) Neumonía Bacteriana Secundaria.

Además con muy poca distinción hay síndromes pulmonares que después de un ataque de Influenza presentan traqueobronquitis, neumonía viral localizada o posibles neumonías mixtas, viral y bacteriana.

1.- Neumonía Viral Primaria de Influenza: Las personas que aquejaron con su enfermedad presentaban trastornos cardiovasculares, reumáticos cardíacos. El gas sanguíneo muestra hipoxia, el Gram del esputo revela una significativa bacteria, el cultivo revela escaso crecimiento de flora normal, pero en cultivos virales, se presenta un alto título del virus de Influenza. Los pacientes que son acechados por esta enfermedad no responden a los antibióticos y la mortalidad viene siendo muy alta.

Cuando se lleva a cabo una autopsia en estos pacien-

tes, suelen presentar traqueítis, bronquítis, difusa neumonía hemorrágica, membranas hialinas en la pared del conducto alveolar y alveolos, y una pausada inflamación de células entre los alveolos.

2.- Neumonía Bacteriana secundaria: Este síndrome - posteriormente produce una enfermedad clínicamente distinguible a la neumonía primaria. Los pacientes que presentan pulmonía crónica, trastornos cardíacos y metabólicos u otras enfermedades, tienen la clásica enfermedad de influenza seguida de un período de imprevista lasticidad de 1-4 días. La fiebre recurrente es asociada principalmente con neumonía bacteriana, lo mismo que una producción de esputos. Estos pacientes con neumonía bacteriana responden a una terapia específica de antibióticos.

Las formas suaves de la neumonía viral no dirigen invariablymente a la muerte a los pacientes ya que puede ser confundida con neumonía bacteriana debida a *M. pneumoniae*.

La neumonía es más frecuente que ocurra en niños que en adultos. Los virus de influenza A o B también pueden producir la bronquiolitis, sin embargo, esta enfermedad es más frecuentemente producida por los virus de Sincitial respiratorio, Parainfluenza tipo tres.

Otras complicaciones es el croup producido más comun_ mente por el Influenza virus A en forma más severa, que el Parainfluenza virus tipo 1 ó 3 o Sicitia] respiratorio.

Otra complicación es la obstrucción crónica de la en_ fermedad pulmonar, se presenta con el ataque del virus de_ Influenza A o B y puede desarrollarse como neumonía viral, neumonía bacteriana, bronquitis crónica. Estos pacientes_ tienen una pérdida permanente de la función pulmonar.

La frecuencia de las complicaciones pulmonares, cuan_ do se presentan en determinados pacientes, no se reportan_ neumonías clínicamente detectables, pero sí, una función - pulmonar anormal, indicando con esto anomalías en el - intercambio gaseoso con una larga convalecencia, debida - quizá a la invasión viral en el tracto respiratorio.

Otros tipos de complicaciones son los llamados: no - pulmonares. Los virus de Influenza con sus variaciones an_ tigénicas de un subtipo y con la población vacunada contra el virus, el ataque del síndrome gripal es más leve y me_ nos frecuente.

En niños se han observado más frecuentemente la mios_ titis, mioglobinuria y una elevación de niveles de fosfo_

quinasa creatinina (CPK) después de una infección de In -
fluenza A o B, siendo más comunmente por Influenza B. Los
síndromes son severos con cambios neurológicos que son evi -
dentes, y les impide caminar.

El SNC (sistema nervioso central) si se ve afectado -
por las infecciones de Influenza A, ya que se han reporta -
do casos con el síndrome de Gullain Barré después de un -
ataque de Influenza. También, aunque en forma rara, se -
presentan mielitis y encefalitis, su asociación etiológica
de estos síndromes con la infección del virus de Influenza
aún no ha sido comprobada, pero se sospecha.

Entre las complicaciones más recientes, es conocida -
como Síndrome de Reye, descrito como una complicación hepá -
tica y del sistema nervioso central de la infección produ -
cida por el virus de Influenza B, y en menor frecuencia -
con el virus de Influenza A. Tiene una mortalidad de 10 a
40% y acecha principalmente a niños entre los 2 a 6 años.

El síndrome de Reye puede presentarse en forma severa
días después de un padecimiento en las vías respiratorias -
superiores y gastrointestinal. Su período de ataque es -
muy similar al de la enfermedad de varicela zoster o gas -
troenteritis, entre los 4 y 6 días con rango, de 1-14 días.

Entre las manifestaciones clínicas del síndrome de Reye se encuentra la pereza, delirio, arrastre respiratorio; las manifestaciones del sistema nervioso central en la mayoría de los casos son: Náuseas y vómitos que duran aproximadamente de 1 a 2 días. Los niños presentan hepatomegalia y cursan una enfermedad afebril.

La mortalidad es alta aproximadamente de un 40% después de permanecer en un estado de coma.

En cuanto a los hallazgos de laboratorio la punción lumbar revela valores normales de proteínas, la presencia de encefalopatías se muestra por medio del conteo celular, tales encefalopatías son encefalitis o meningoencefalitis. El valor de amoníaco en sangre se encuentra elevado, dato muy frecuente en este síndrome, la hipoglucemia se presenta mayormente en pacientes que han padecido varicela o enfermedades gastrointestinales y en menor frecuencia en pacientes con enfermedad respiratoria aguda.

En estado de coma podemos citar que hay una elevada presión intracraneal y de nivel de amoníaco en sangre 300 g/dl, datos comúnmente asociados con la mortalidad. Los pacientes que llegan a poder sobrepasar esta etapa, tienen muchas complicaciones neurológicas.

Los hallazgos patológicos nos muestran la ausencia de cambios inflamatorios. En la biopsia observamos hepatomegalia y los especímenes son comunmente de color amarillo pálido. El examen microscópico nos muestra una infiltración de hepatocitos con pequeñas cantidades de lípidos distribuidos en todas las partes celulares. Hay una alteración de la mitocondria hepatocítica como hinchazón y pleomorfismo entre otros. En el cerebro existe edema cerebral, degeneración neuronal anóxica sin inflamación marcada.

El síndrome de Reye presenta también fisiologías asociadas con infección del virus mediante un mecanismo a base de toxinas: aflatoxinas. Las aflatoxinas se han sospechado desde que apareció la enfermedad en Tailandia, enfermedad que se contrae por ingerir alimentos o víveres contaminados con ellas. Otros mecanismos patofisiológicos serían el daño hepático para la hipoglicemia y acidosis, hiperamonio para encefalopatías y en forma más reciente una disfunción pasajera del ciclo hepático, de la urea de la enzima mitocondrial. Los ensayos de esta enzima del ciclo de la urea de la enzima mitocondrial. Los ensayos de esta enzima del ciclo de la urea en tejidos del hígado presenta una disminución de la actividad de ornitina transcarbamilasa y de carbamil fosfato sintetasa. Por esto la hiperamonemia que se presentó en el síndrome de Reye resulta un -

desgaste excesivo de nitrógeno disminuyéndose así la reduc
ción de ornitina transcarbamilasa y carbamil fostato sinteta
ta, en algunos casos, para desintoxicación de la carga -
amoniacal.

Esto explica porque al disminuirse esta enzima, se au
menta la producción de ornitina de transcarbamilasa y el -
incremento del amonio en sangre; el amonio tomado por el -
cerebro y la cantidad aumentada de la producción de lactata
to cerebral nos indica que hay una correlación paralela, -
dicho cambio se lleva a cabo por la hiperventilación neurológica.

Los animales inferiores también son infectados por el
virus de Influenza, siendo la más conocida; la infección -
natural de animales domésticos con el Influenza virus tipo
A. Tales animales como los pavos, pollos son acechados -
por la llamada peste aviaria, también el virus ataca a los
caballos y cerdos, sin embargo, no constituyen un reservori
o de infección para el hombre; pero sí guarda cierta rel
ación antigénica las cepas humanas y cepas animales como-
existe entre la cepa humana y aviaria que comparten antique
nos de superficie produciéndose una recombinación entre am
bas. Se ha experimentado con voluntarios humanos la infl
uenza con virus de influenza de caballo y en forma vicers
versa, infectando a caballos con el virus A/Hong Kong/78 -

humano. Dentro de la influenza del cerdo, sabemos que su ciclo de transmisión es complejo, fue observado por primera vez en los cerdos de Estados Unidos en 1919 donde se aisló el virus de influenza del cerdo y a *Haemophilus suis* aunque este último solo se consideró como causa estimulante de la enfermedad, lo mismo que las condiciones climatológicas.

Debido al corto período de incubación que tiene el virus de influenza, así como la rápida disfunción, la falta de tratamiento, han hecho que las medidas de aislamiento, de la disminución de las fuentes de infección, sean muy ineficaces, incluso el uso de medicamentos es muy limitado por su poca eficacia a la toxicidad del virus y al elevado costo de su fabricación, medicamentos como amantadina y rimantadina tienen actividad in vivo contra el virus de influenza A, pero no contra el virus tipo B, en estudio se encuentra la rivavirina, pero aún no se ha determinado su eficacia terapéutica.

Existe una inmunidad profiláctica contra las infecciones respiratorias dirigidas específicamente contra cada agente etiológico, como lo son las vacunas. Estas se llevan a cabo con los virus inactivados y parcialmente purificados, desarrollados en la cavidad alantoidea del huevo em

brionado generalmente por adsorción y elución de núcleos rojos de pollo. Posteriormente, al cabo de un tiempo determinado se observa la inmunidad eficaz contra cepas homólogas o relacionadas íntimamente con el virus. Este grado de inmunización adquirida va a depender del tiempo en que se haya inmunizado la persona y la exposición al virus.

Las vacunas son multivalentes, conteniendo cepas tanto del tipo A como del tipo B, sin embargo, las cepas específicas utilizadas en las vacunas, son cambiadas periódicamente, de acuerdo a los cambios observados de los antígenos HA y NA que se producen debido a la deriva antigénica característica del virus. En la actualidad se producen vacunas más purificadas, pues las vacunas antiguas reflejan cierto grado de toxicidad; estas vacunas purificadas se obtienen ya sea por la separación de las glucoproteínas antigénicas del virión (vacunas de subunidad) o por una purificación del virus total por medio de centrifugación zonal - en forma más eficaz. En cuanto a las vacunas con virus atenuados se han obtenido buenos resultados, pues se administran por vía intranasal estimulando así a los anticuerpos locales secretores y los anticuerpos séricos. Los cambios genéticos realizados en el virus para obtener una recombinación viral y así una virulencia disminuida con antígenos de superficie se pretende puedan coincidir con los -

virus prevaletentes.

De acuerdo con el proceso de transformación antigénica o la alteración gradual de una cepa viral en su composición antigénica y la aparición de una nueva mutante, constituye de un virus nuevo, obliga en cierto modo a mantener actualizadas las vacunas antigripales mediante la incorporación del virus activo en cada momento.

Las vacunas pueden ser inactivadas totalmente o fraccionadas. En cuanto a la composición de las vacunas, depende de varios factores como, el año, tipo, antígenos y cantidad de antígenos; por ejemplo:

"Composición de las vacunas de Influenza"

Año	Tipo	Antígeno	Cantidad de Antígeno
1969-70	Bivalente	A/Aichi/2/68 H3N2	400 CCA
		B/Mass/3/66	300 CCA
1970-71	Bivalente	A/Aichi/2/68 H3N2	400 CCA
		B/Mass/3/66	300 CCA
1971-72	Bivalente	A/Aichi/2/68 H3N2	400 CCA
		B/Mass/3/66	300 CCA
1972-73	Bivalente	A/Aichi/2/68 H3N2	700 CCA
		B/Mass/1/71	300 CCA

Año	Tipo	Antígeno	Cantidad de Antígeno
1974-75	Bivalente	A/England/42/72 H3N2	700 CCA
		B/Mass/1/71	300 CCA
1974-75	Bivalente	A/Port Chalmers/1/73 H3N2	700 CCA
		B/Hong Kong/5/72	500 CCA
1975-76	Bivalente	A/Port Chalmers/1/73 H3N2	350 CCA
		A/Scotland/840/74 H3N2	350 CCA
		B/Hong Kong/5/72	500 CCA
1976-77	Bivalente	A/Victoria/3/75 H3N2	200 CCA
		A/New Jersey/75 Hsw1N1	200 CCA
	Monovalente	A/New Jersey/76 Hsw1N1	200 CCA
		B/Hong Kong/72	500 CCA
1977-78	Bivalente	A/Victoria/3/75 H3N2	200 CCA
		B/Hong Kong/5/72	500 CCA
1978-79	Trivalente	A/URSS/77 H1N1	250 Mg ó 7 Mg
		A/Texas/77 H3N2	7 Mg
		B/Hong Kong/72	7 Mg
1979-80		A/Brazil/78 H1N1	7 Mg
		A/Texas/77 H3N2	7 Mg
		B/Hong Kong/72	7 Mg
1980-81		A/Brazil/78 H1N1	7 Mg
		A/Bangkok/79 H3N2	7 Mg
		B/Singapore/79	7 Mg
1981-82		A/Brazil/78 H1N1	15 Mg
		A/Bangkok/79 H3N2	15 Mg

Año	Tipo	Antígeno	Cantidad de Antígeno
1982-83		A/Singapore/79	15 Mg
		A/Brazil/78 H1N1	15 Mg
		A/Bangkok/79 H3N2	15 Mg
1983-84		B/Singapore/79	15 Mg
		A/Brazil/78 H1N1	15 Mg
		A/Philippines/82 H3N2	15 Mg
		B/Singapore/79	15 Mg

La vacuna antigripal, al igual que todas las vacunas tiene su utilidad, efectos colaterales, reacciones sistémicas y su uso durante el embarazo. En cuanto a su utilización se debe de tomar en cuenta que debe administrarse - en niños y adultos que tengan alto riesgo de adquirir una infección respiratoria inferior, en casos de enfermedades cardiovasculares adquiridas o congénitas con alteraciones en el sistema circular, en alteraciones crónicas que interfieren en el funcionamiento pulmonar, (tuberculosis, asma, fibrosis quística), en pacientes que presentan padecimientos renales crónicos con azoemia y síndrome nefrótico, en diabetes mellitus o alteraciones metabólicas, anemias crónicas, en personas inmunosuprimidas y en adultos mayores - de 65 años. Los efectos colaterales que comunmente se presentan en la mayoría de los individuos vacunados es enrojecimiento e induración en el sitio de aplicación de la vacu

na durando dos días. Las reacciones sistemáticas se empiezan a detectar entre las 6 y 12 horas de la vacunación desapareciendo a las 24 ó 48 horas, estas reacciones son fiebre, malestar general y efectos tóxicos que generalmente se presentan en niños o individuos que nunca han tenido contacto con el virus, puede presentar una respuesta alérgica al aplicar la vacuna, pero es solo debida a que algunos componentes de la vacuna son proteínas de huevo, por lo que no debe aplicarse a personas con hipersensibilidad-anafiláctica al huevo. Respecto al uso en el embarazo, se recomienda después del segundo trimestre y solo en mujeres embarazadas con alto riesgo de adquirir el virus. No existe evidencia que la vacuna tenga efectos materno-fetales, hasta el momento.

Con esto podemos observar que la enfermedad causada por el virus de Influenza, puede traer infinidad de complicaciones y desenlaces, aunque, en la actualidad, se hacen esfuerzos para prevenir, controlar y combatir tal padecimiento viral.

2.4. Fundamento de la Prueba Inmuno Enzimática.

La prueba utilizada en este estudio, fue el método de ELISA, (Enzyme-Linked Immuno-sorbent Assay), método que en la actualidad ha tenido mucho realce debido en gran parte a su sensibilidad, mayor que en otras pruebas diagnósticas su costo relativamente bajo, sus cantidades microlítricas que se utilizan y a la cantidad de pruebas que se pueden realizar con este método.

El método de ELISA es de gran utilidad en la detección ya sea del anticuerpo como en este caso, o del antígeno que se requiera. Podemos dividir al inmunoanálisis enzimático en dos principales tipos:

- 1) Método indirecto.
- 2) Método de doble anticuerpo o de Sandwich con sus variantes.

1.- Método indirecto: Para determinar y medir las cantidades de anticuerpos específicos presentes en los líquidos biológicos de ciertos pacientes característicos, contra antígenos, usando la fase sólida con el mismo.

2.- Método de doble anticuerpo o de sandwich: Para detectar antígenos, por medio de anticuerpos específicos que-

se encuentran absorbidos en la fase sólida.

Esta prueba fue propuesta en 1971 por Van Weemen, - - Schuurs, Engvall y Perlman los cuales combinaron antígenos o anticuerpos en una fase sólida, con anticuerpos o antígenos conjugados con una enzima que da un resultado sensible y específico. Su fundamento es que el antígeno o anticuerpo se adhieran a una fase sólida donde se llevan a cabo - reacciones antígeno-anticuerpo y la cual se pone de manifiesto por medio de una reacción enzimática.

Los componentes que constituyen a la prueba de ELISA son:

- 1) Fase sólida.
- 2) Conjugados.
- 3) Sustratos.

1.- Fase sólida. Es una parte muy importante ya que - constituye la base o el inicio de la prueba. Está formada por materiales plásticos como poliestireno, polivinilo o - polipropileno, o por los materiales como celulosa, poliacrilaminas, dextranos, silicón y vidrio microcristalino, - sin embargo, no son muy utilizados debido a que necesitan - centrifugación y se llevan más tiempo en su fabricación.

El anticuerpo o antígeno deben de unirse en una manera homogénea, eficaz, irreversible y reproducible esto debe estar perfectamente compaginado para evitar que se absorban otra clase de componentes, y que la reactividad inmunológica tanto del antígeno o anticuerpo, no sufra ninguna alteración. Sin embargo, como todo tiene sus restricciones, pues la fase sólida tiene propiedades físicas que limitan a veces las reacciones antígeno-anticuerpo.

Está compuesta dicha fase de proteínas unidas a ella por medio de interacciones hidrófobas irreversibles. Para hacer que disminuya esta interacción hidrófoba se usan los detergentes no iónicos en una concentración del 0.05% en la solución de lavado como es el Tween-20; debido a esta propiedad que presentan los detergentes no iónicos se emplean en la prueba también para evitar uniones inespecíficas de los reactantes inmunológicos sin alterar la reacción antígeno-anticuerpo. El uso de soluciones de muy baja ionización se consideran también como inhibidores de la unión de la inmunoglobulina específica.

Como se sabe, no todas las proteínas son hidrófobas, existen también proteínas hidrófilas, las cuales se unen a la fase sólida por medio de un previo tratamiento sufrido en dicha fase, agregando una solución de BSA (albúmina-

sérica bovina) seguida de glutaraldehído convirtiendo a la fase sólida en una fase sólida hidrófila.

Las cantidades de antígenos o anticuerpos agregados, según el caso, deben ser entre 1 y 10 Mg ya que una limitación o un exceso restringe la sensibilidad de la prueba. La limitación, por que no se llevaría a cabo en forma completa o equilibrada las reacciones antígeno-anticuerpo. El exceso por que provoca la desorción de los inmunorreagentes durante el tiempo de incubación.

El tiempo de incubación (dependiendo de lo que se esté determinando) varía de una a dos horas a veinte o veinticinco grados centígrados o de toda la noche a cuatro grados centígrados.

Se utiliza en ciertos casos algunas sustancias bloqueadoras que no están relacionadas con el sistema antígeno-anticuerpo, las cuales se adicionan después de haber adherido a la fase sólida el antígeno o anticuerpo en una cantidad adecuada, tales sustancias son: BSA, glicina, gelatina, FCS (suero fetal de carnero), suero de cabra; esta se agrega para evitar que se unan inmunoglobulinas inespecíficas, y para cubrir los sitios, que en el fondo hayan quedado libres.

Estas uniones inespecíficas van a reducir la sensibilidad de la prueba, principalmente en las indirectas, ya que existen más problemas en las uniones inespecíficas del suero que las del conjugado. Esto se debe a que el conjugado es mucho más definido y el suero tiene una heterogeneidad de anticuerpos inespecíficos. Estas uniones inespecíficas se pueden presentar por: agregados de inmunoglobulinas; complejos inmunes; influencia de la actividad del complemento, y una disminución de inmunoglobulinas en el suero por congelación, sin embargo, esto puede ser evitado ya sea por la ultracentrifugación del suero, por agregar BSA u otra proteína no relacionada para cubrir los sitios libres, o adicionar detergentes no iónicos en una concentración de 0.05% como Tween-20 o Tween-80.

En cuanto al conjugado, este presenta un grado mínimo de inespecificidad por lo que al reaccionar con el antígeno, muestra en casi toda la proporción al incremento de la concentración del conjugado más allá del punto de saturación.

2.- Conjugados: Los conjugados: enzima-antígeno o enzima-anticuerpo son de vital importancia en la sensibilidad de la prueba.

Este conjugado en el método indirecto consiste en una

anti-inmunoglobulina unido a una enzima. Las principales y más utilizadas son: fosfatasa alcalina, peroxidasa, galactosidasa, glucosa oxidasa, cada una con sus cromógenos-respectivos como por ejemplo; en el caso de la enzima fosfatasa alcalina, su cromógeno es para-fenilfosfato y para la peroxidasa es el peróxido de hidrógeno con orto-fenilindiamina.

En la unión de la enzima a la inmunoglobulina, antígeno o proteína, incluye la presencia de agentes liqantes - reaccionando con los grupos activos a otros funcionales - presentes en la enzima y las proteínas. Los agentes liqantes pueden ser mono, bi o multifuncionales como por ejemplo; p,p'difluoro m,m'dinitrofenilsulfona (FNPS), cloruro de cianhidrico, diisocianato de tolueno, carbonidas solubles, peryodato de sodio y glutaraldehído. El sitio activo de las enzimas está constituido por los grupos funcionales como amino, imino, hidroxilo, fenol y grupos tiol, por lo que una modificación en dichos sitios por uniones intra o intermoleculares, causa una pérdida en la actividad, también una sustitución excesiva incrementa la adición inespecífica de las macromoléculas del conjugado o hace inaccesible los sitios activos. Estas reacciones contienen uniones como enzima-enzima y proteína-proteína, no solo enzima-proteína, es decir, conjugados heterodóneos. Esta unión-

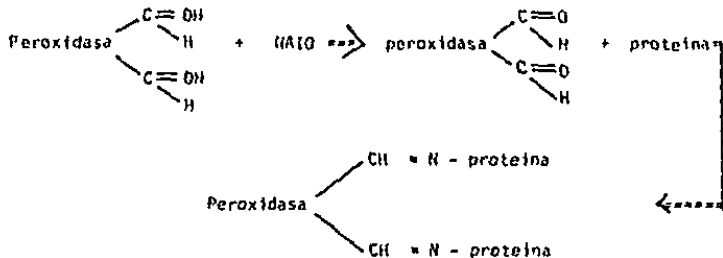
de enzima-proteína que da como resultado un conjugado pro_ duce la retención de la actividad inmunitaria y enzimática, la cual no es inhibida durante la reacción antígeno-anti_ cuerpo.

La peroxidasa es la enzima más utilizada debido a su bajo costo y a la facilidad con que se obtiene, sin embar_ go, da una reacción muy rápida, que para realizar una gran cantidad de pruebas (como en grandes investigaciones), da problemas, pues realizando los últimos ensayos, ya se está presentando la reacción en los primeros.

Existen dos técnicas mediante las cuales se puede - - unir la peroxidasa a la proteína:

2.1. Con peryodato de sodio: los grupos aldehídos de la enzima peroxidasa son formados por el peryodato y reac_ cionan con los grupos aminos de los anticuerpos adiciona_ dos, en forma subsecuente, llegando a formar las bases de Schiff. Este conjugado se estabiliza reduciéndose con bo_ rahidruro de sodio.

Reacción de posible acople entre enzima y proteína, - propuesta por Nakane y Kawoi:

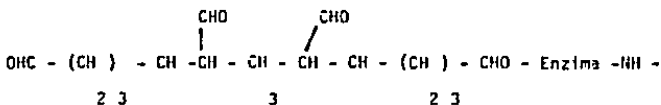
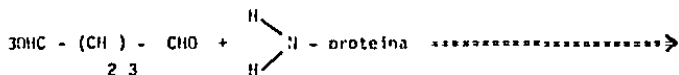
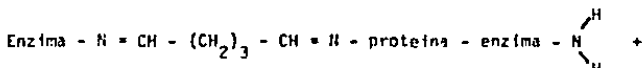
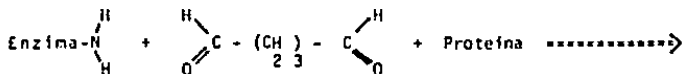


2.2. Con glutaraldeído: Se pueden efectuar dos tipos de reacciones:

2.2.1. Reacción de un solo paso: Se lleva a cabo la unión por medio de la mezcla de la enzima, proteína y glutaraldeído, dando un conjugado heterogéneo y con mayor rapidez. En esta reacción se pueden llevar a cabo la mayoría de las variedades del conjugado enzima-proteína.

2.2.2. Reacción de dos pasos: Primer paso: el glutaraldeído en exceso reacciona con uno o dos grupos amino libres de la peroxidasa por medio de los radicales aldehídicos activos. Ya que se removió el exceso de glutaraldeído la peroxidasa puede reaccionar con la proteína. Este tipo de reacciones pueden ser moduladas regulando las condiciones experimentales.

Reacción de posible acople entre enzima y proteína, -
propuesta por Abrameas y Ternik:



proteína - NH

La eficacia de la relación con peryodato es mayor que la de glu -
taraldheído, sin embargo, la reacción de glutaraldheído pro -
duce conjugados más homogéneos.

Para almacenar el conjugado, se debe hacer en solucio -
nes de fosfatos y se diluye de acuerdo a los tiempos de in -
cubación de los conjugados y al tiempo de reacción del sus -
trato. Con diluciones altas, los tiempos de incubación son
más largos, para resultados más rápidos el conjugado debe -

ser más concentrado y los tiempos de incubación más cortos.

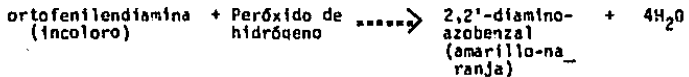
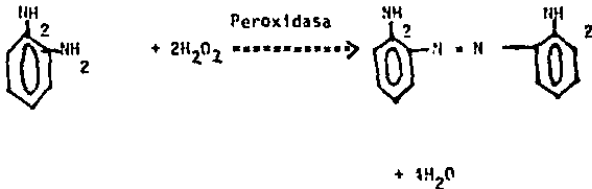
3.- Sustratos: Los utilizados en el método de ELISA son en su mayoría cromógenos, los cuales al inicio son incoloros y a medida que se degradan o reaccionan desarrollan un color característico según el cromógeno en tonos fuertes. Estos son productos solubles y con alto coeficiente de extinción, es decir, densidad de color por unidad degradada. Pueden también usarse sustratos fluorógenos.

Para detectar la peroxidasa se usó gran variedad de cromógenos utilizando como sustrato al peróxido de hidrógeno; los cromógenos fueron: diaminobenzidina (insoluble), ácido 5 aminosalicílico (5AS), orto diaminobenzidina (parcialmente solubles), 2,2' azino-di-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfona) o sal de diamonio (ABTS) (da curvas de dosis-respuesta deficientes), ortofenilendiamina (OFD) (es soluble al 100% y tiene un alto coeficiente de extinción).

Este cromógeno, (OFD), después de reaccionar da un color anaranjado; y la reacción puede detenerse con H_2SO_4 8N. Dicho cromógeno es sensible a la luz y es carcinógeno.

La reacción se lleva a cabo con el sustrato de peróxido

do de hidrógeno y el cromógeno OFD es la siguiente:



Los tiempos y temperaturas de incubación para los inmunorreagentes son; Para suero 1 hora a 37 grados centígrados, para conjugado 1 hora a 37 grados centígrados y 30 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad para el sustrato.

Para obtener los resultados, se pueden leer en un espectrofotómetro o a simple vista, sin embargo, para la valoración del inmunoanálisis cualitativos se deben establecer el umbral positivo y negativo. La más frecuente forma de reconocer los resultados positivos, es aquella que duplica o triplica el valor de la respuesta negativa.

Con experimentos realizados posteriormente se observó que la prueba de ELISA sirve para determinar enfermedades infecciosas y parasitarias y las soluciones reguladoras - que se pueden utilizar son: de boratos con pH de 8.4, de citratos con pH de 5.4, fosfatos (PBS) con pH de 9.4.

Los resultados por lo general se ven alterados en el método indirecto de la prueba de ELISA por la absorción - inespecífica de inmunoglobulinas del suero en la fase sólida, dando un incremento falso en las lecturas de D.O. (densidad óptica), problema muy grave en la interpretación de resultados y que disminuye la confiabilidad de la prueba.

Estos problemas generalmente se producen por ciertos detalles insospechados, por lo que se deben de tomar en cuenta los siguientes factores: el empleo de agua de buena calidad para la preparación de los reactivos como el agua bidestilada o desionizada, las soluciones deben de ser preparadas recientemente, pero pueden ser almacenadas por cierto tiempo bajo condiciones estériles; se deben usar soluciones bloqueadoras para evitar las uniones de inmunoglobulinas inespecíficas; el empleo rutinario de los controles adecuados para la interpretación de resultados.

Las soluciones reguladoras, la concentración del anti

geno y del suero para fijarse a la fase sólida dependen de cada sistema o ensayo de ELISA.

En la actualidad, la prueba de ELISA tiene muchas ventajas para las determinaciones de cierto tipo de enfermedades, sobre todo la sensibilidad que presenta en forma mayor que otras pruebas.

Por esto ha tenido un gran avance en el mundo científico actual, sustituyendo y proponiendo a pruebas antiguas y pruebas nuevas respectivamente. En virología este ensayo tiene gran auge, pues se determinan varios tipos virales mediante la sencilla técnica, como en este caso, determinando anticuerpos contra el virus de Influenza B/Singapore/222/79.

CAPITULO 3.

Materia) y Método.

MATERIAL Y METODO.

3.1. Material.

Reactivos utilizados:

→ Antígeno puro de B/Singapore/222/79, donado por la Universidad de Baylor, Texas; el cual fue obtenido por medio del desarrollo en embriones de pollo.

Las rutas de inoculación, pueden ser dos:

- A) En el fluido amniótico.
- B) En el fluido alantóico.

El embrión de pollo tiene una edad de 7-11 días, dependiendo del agente que se desee inocular, en este caso fue Influenza, cuyo embrión debe de tener de 9-11 días de edad.

La inoculación del virus se hace con un equipo especial, el cual consta de una aguja de 1 1/2" para el fluido amniótico. Una caja negra con un foco, en donde se pone el huevo y se observa donde está el embrión y si está vivo. El volumen que se inocula es de 0.1 ó 0.2 ml. Se pone a incubar el embrión inoculado en una temperatura de 33-35 -

grados centígrados, con 2-3 días de duración en una incubadora especial. En la incubadora los embriones se encuentran rotando durante el período de incubación, usualmente los embriones no mueren.

El trato antes de la cosecha, es enfriéndolos. Para la cosecha, dependiendo del fluido donde se inoculó, se obtendrán diferentes cantidades y de diferente forma.

La inoculación si fue en el líquido alantóico, se obtiene removiendo la cáscara y punzando el contenido para un lado con pinzas. Retirar el fluido con una pipeta o jeringa apta con una aguja.

Se obtienen de 5-15 ml.

Si la inoculación fue en el líquido amniótico, se obtiene removiendo la membrana de la cáscara de huevo y CAM. Se inclina el huevo hasta que se mueva el embrión en el saco amniótico y sea accesible. Se hace una perforación en el saco con una punción de la aguja y retirar el fluido.

Se obtiene menos de 3 ml.

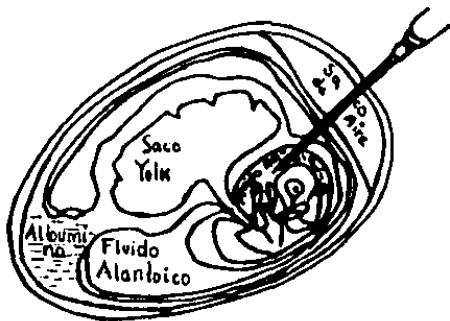
Para evaluar el virus desarrollado se hace por medio de HA, HAI, o CF, (hemaglutinación, inhibición de la hema_

glutinación o fijación de complemento, respectivamente).

Después de hacer la evaluación se resuspende el antígeno obtenido en una solución de albúmina para su conservación.

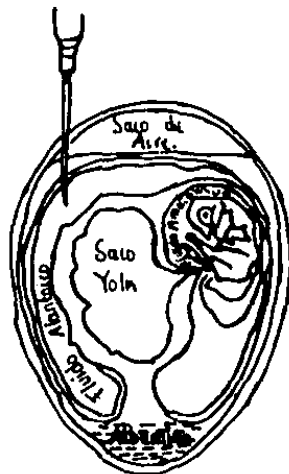
Se refrigera.

A) Inoculación en el fluido amniótico:



Nueve días de edad, embrión de pollo.

B) Inoculación en el fluido alantóico:



Nueve días de edad, embrión de pollo.

→ Solución reguladora o buffer de carbonatos (Carbonato-Bicarbonato):

Carbonato de sodio	Na_2CO_3	1.59 gm.
Bicarbonato de sodio	NaHCO_3	2.93 gm.
Azida de sodio	NaN_3	0.20 gm.

Se añoran estas cantidades a un litro de agua bi-desti

lada, ajustando el pH a 9,6 con HCl 1N (aproximadamente 2-ml).

Almacenarlo a 4 grados centígrados por no más de 2 semanas.

→ Solución reguladora o buffer de fosfatos (PBS):

Cloruro de sodio	NaCl	8.6 gm.
Fosfato de potasio	KH_2PO_4	0.2 gm.
Cloruro de potasio	KCl	0.2 gm.
Fosfato de sodio con 12 H ₂ O	Na_2HPO_4	2.9 gm.
Fosfato de sodio anhídrido	Na_2HPO_4	1.15 gm.

Aforarlo a un litro de agua bi-distilada, ajustando el pH a 7.4. Almacenarlo a 4 grados centígrados.

→ Solución de lavado (PBS-Tween-20):

Cloruro de sodio	NaCl	8.0 gm.
Fosfato de potasio	KH_2PO_4	0.2 gm.
Cloruro de potasio	KCl	0.2 gm.
Fosfato de sodio con 12 H ₂ O	Na_2HPO_4	2.9 gm. o
Fosfato de sodio anhídrido	Na_2HPO_4	1.15 gm.
Tween-20		0.5 ml.
Azida de Sodio	NaN_3	0.2 ml.

Aforar a un litro con agua bi-destilada, ajustar el pH a 7.4. Almacenarlo a 4 grados centígrados.

→ Tween-20 o Polioxietilensorbitan.

P 1379 Polioxietilensorbitan
 RT Monolaurate (Tween-20) (pfs)
 FOB Syrup
 Sigma Composición ácida:
 Acido láurico aproximadamente 55%,
 balanceado primariamente con ácido mirístico,
 palmítico y esteárico.

→ PBS-1% FCS (suero fetal de carnero):

Solución reguladora de fosfatos (PBS) agregándole 1% de FCS.

→ PBS-Tween-20-1% FCS (suero fetal de carnero):

Solución de lavado (PBS-Tween-20) agregándole 1% de FCS.

→ Goat anti human inmunoglobulin (IgG).

Lot 042181 Goat anti-human IgG 5.0 ml.

0.1% azida de sodio
AMF/ Immuno-Reagents, Inc.

→ Rabbit anti goat phosphatase alkaline.

Cappel Cuchranville, PA
19330 División de diagnósticos Cooper.

→ Fosfatasa alcalina.

21097 Conjugated affinity purified
Sigma Rabbit anti goat IgG
 No congelarse. Temperatura de 2-8 grados
 centígrados.

→ Dietanolamina

D 8885 Diethanolamine (pfs)
 RT (bis 2-hidroxietil) amina
 FOB Aproximadamente 98%.
Sigma

Buffer de Dietanolamina al 10%:

Dietanolamina		97.0 ml.
Azida de sodio	NaN_3	0.2 gm.
Cloruro de magnesio con 6 H_2O	Mg_2Cl	0.1 gm.

Agua bi-destilada		800.0 ml.
Acido clorhídrico 1M	HCl	100.0 ml.

Agregar HCl si es necesario para ajustar el ph a 9.8.
Aforar con agua bi-destilada a un litro.

Almacenar a 4 grados centígrados en la obscuridad.

→ p-nitrofenil fosfatasa.

Sigma I04 Fosfato sustrato de tabletas de 5 mm.
Lote: 64F-6105

Almacenarse a -20 grados centígrados.

→ Hidróxido de sodio:

Hidróxido de sodio 3N	NaOH	120 gm.
-----------------------	------	---------

Aforarlo a un litro con agua bi-destilada.

→ Microtituladores (Microtiter Immunolon I).

→ Muestra biológica.

* Sueros de Tuberculosis.

Constaron en su mayoría con las siguientes caracterís

tics:

- A) Se diagnosticó la tuberculosis por medio de radio_ graffas, tomograffas, encefaloqramas.
 - B) Prueba de PPD.
 - C) Tinción de BAAR.
 - D) Sintomatología.
 - E) Presentaron tuberculosis pulmonar, meningea, mi_ liar, ganglionar y diseminada.
 - F) Se obtuvieron datos como edad, sexo, diagnóstico_ inicial, diagnóstico de egreso, fecha de toma de - la muestra biológica, si tienen o no la vacuna BCG.
- * Sueros controles sanos.

Los sueros de controles sanos, se diagnosticaron en - base a los siguientes criterios:

- A) Si tienen o no tuberculosis pulmonar o extrapulmo_ nar.
- B) No deben de tener ninguna enfermedad de base como- hepatitis, neumonia, etc.
- C) No deben de tener enfermedades activas.
- D) La normalidad se afirma por chequeo médico.

E) No debe tener ninguna enfermedad aguda o crónica.

F) Sus edades fluctúan de 23 a 49 años.

* Sueros con diversas enfermedades.

Estos sueros fueron tomados al azar de pacientes que presentaban algún trastorno, pasajero o crónico. La edad de los pacientes fluctuaba de los 17 a 90 años. Los trastornos que presentaron los pacientes fueron; trastornos - cardiovasculares, circulatorios, hepáticos, respiratorios, renales.

3.2. Método.

El método utilizado fue el del ensayo inmuno-enzimático indirecto, denominado Micro elisa, usando a Influenza - Hemaglutinación (HA) como antígeno puro.

Procedimiento:

A.- Llenado de platos con HA.

- 1.- Haga una dilución 1:1000 de HA en solución reguladora de carbonatos (pH 9.8-9.6). Use una dilución que tenga 100 ng/ml.
- 2.- Rotular los platos con la designación del HA, la fecha y concentración del HA.
- 3.- Poner 100 microlitos de la dilución HA en cada pocito que se haya marcado.
- 4.- Poner 100 microlitros de la solución reguladora de carbonatos en los controles.
- 5.- Poner los platos en cámara húmeda a 4 grados centígrados por lo menos de 18-24 horas y no más de 3 días.
- 5.a.- Lavar los platos con la solución de lavado (PBS-

Tween-20), por tres veces.

- 5.b.- Poner 75 microlitros de la solución de PBS con 1% de FCS (suero fetal de carnero), en todos los pocitos. Dejarlo mínimo 1 hora y máximo 3 horas.

B.- Adición de los sueros en los platos.

- 1.- Lavar los platos tres veces con PBS-Tween-20.
- 2.- Poner 75 microlitros de la solución de PBS-Tween-20 con 1% de FCS en todos los pocitos.
- 3.- Hacer una dilución de la muestra problema de 1:16- en PBS y agregar 75 microlitros en los pocitos- - apropiados, haciendo diluciones seriadas, desechando la última.
- 4.- Almacenar los platos por 24 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente.

C.- Adición de goat-anti-humana inmunoglobulin.

- 1.- Lavar los platos tres veces con la solución de lavado PBS-Tween-20.
- 2.- Hacer una dilución de 1:5000 de goat anti-human inmunoglobulin en PBS-Tween-20 con 1% de FCS.

- 3.- Poner 75 microlitros de la dilución anterior en to dos los pocitos.
 - 4.- Poner 75 microlitros del diluyente (PBS-Tween-20 - con 1% de FCS) en los pocitos controles.
 - 5.- Incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente por 5 horas.
- D.- Adición del conjugado.
- 1.- Lavar los platos tres veces con PBS-Tween-20.
 - 2.- Hacer una dilución de rabbit anti goat alkaline - phosphatase, en PBS-Tween-20 con 1% de FCS de 1:1200.
 - 3.- Poner 75 microlitros de la dilución del conjugado - en todos los pocitos.
 - 4.- Incubar en cámara húmeda y a temperatura ambiente - por toda la noche.
- E.- Adición de sustrato.
- 1.- Poner a temperatura ambiente el buffer de dietanola mina.
 - 2.- Lavar los platos tres veces con la solución de lava

do (PBS-Tween-20).

- 3.- Disolver 1 tableta de sustrato por cada 5 ml de bu
ffer de dietanolamina hasta alcanzar el volumen re
querido.
- 4.- Poner 75 microlitros de la solución de sustrato en
todos los pocitos para que desarrolle un color ama
rillo.
- 5.- Incubar a 37 grados centígrados por 30 minutos (o-
arriba de dos horas si el control no tiene color).
- 6.- Agregar 50 microlitros de hidróxido de sodio 3M pa
ra detener la reacción y obtener una lectura co_
rrecta.
- 7.- Leer los platos en el lector de ELISA, (electrofo_
tómetro).

RESULTADOS.

Los puntos a tratar y analizar en los resultados obtenidos son los siguientes:

- 1) Edad promedio: Sexo femenino.
- 2) Edad promedio: Sexo masculino.
- 3) Lecturas promedio: sexo femenino en diluciones 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048.
- 4) Lecturas promedio: sexo masculino en diluciones - - 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048.
- 5) Sexos femenino y masculino: cada uno de las diluciones constará de los siguientes datos:

- a) Media.
- b) mediana.
- c) moda
- d) desviación media.
- e) desviación típica o estándar.
- f) varianza.
- g) coeficiente de variación.
- h) histograma.
- i) ojiva.

a.- Media: Suma de un conjunto de puntajes dividido entre el número total de puntajes del conjunto.

- 1.- Nivel de medición; por intervalos.
- 2.- Forma de la distribución, más apropiada para las simétricas unimodales.
- 3.- Objetivo; medición precisa de la tendencia central, puede utilizarse a menudo para operaciones estadísticas más avanzadas, incluyendo pruebas para tomar decisiones.

Por fórmula:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{N}$$

donde;

- \bar{x} = la media (léase x barra).
- \sum = la suma de todos los valores de la variable desde el primero hasta el último.
- x = un puntaje no procesado en un conjunto de datos.
- N = el número total de puntajes en un conjunto.

b.- Mediana: Punto más cercano al medio en una distribución.

1. Nivel de medición; ordinal o por medio de intervalos.
2. Forma de la distribución; más apropiada para las altamente sesgadas.

3. Objetivo; medición precisa de la tendencia central, puede utilizarse a veces para operaciones estadísticas más avanzadas o para dividir las distribuciones en dos categorías.

Por fórmula:

$$\bar{x} = Li + \left[\frac{N/2 (\sum f) i}{f \text{ mediana}} \right] c$$

donde;

\bar{x} = mediana.

Li = límite inferior de la mediana del intervalo.

N = número total de puntajes.

$\sum fi$ = suma de frecuencias bajo el límite inferior de la mediana del intervalo.

fmed = frecuencia en la mediana del intervalo.

c = tamaño del intervalo.

c.- Moda: Categoría o puntaje que ocurre más a menudo.

- 1.- Nivel de medición; nominal, ordinal o por intervalos.
- 2.- Forma de la distribución; más apropiada para la bimodal.
- 3.- Objetivo; medida de tendencia central rápida y sencilla, pero aproximativa.

Por fórmula:

$$Mo = Li + \left[\frac{A_1}{A_1 + A_2} \right] C$$

donde:

Mo = moda.

Li = límite inferior de la moda del intervalo.

A₁ = incremento superior.

A₂ = incremento inferior.

C = tamaño del intervalo.

d.- Desviación media: Distancia entre cualquier porcentaje, no procesado y su media. Suma de las desviaciones absolutas dividida entre n.

Por fórmula:

$$D.M. = \frac{\sum f|x-\bar{x}|}{N}$$

donde:

D.M. = desviación media.

$\sum f|x-\bar{x}|$ = suma de las desviaciones absolutas, sin tomar en cuenta los signos positivos o negativos.

N = número total de puntajes

e.- Desviación estandar: Raíz cuadrada de la media de las desviaciones de la media de una distribución elevadas al cuadrado, o raíz cuadrada del promedio de las desviaciones de la media elevadas al cuadrado.

Por fórmula:

$$S = \sqrt{\frac{\sum f(x-\bar{x})^2}{N}}$$

donde;

S = desviación estandar.

$\sum f(x-\bar{x})^2$ = suma de las desviaciones de la media elevadas al cuadrado, y media elevada al cuadrado.

N = número total de puntajes.

f.- Varianza: Cuando los valores de un conjunto de observaciones están muy próximos a su media, la dispersión es menor que cuando están distribuidos sobre un amplio recorrido, la medición de la dispersión con respecto a la diseminación de los valores alrededor de su media es la varianza.

Por fórmula:

$$s^2 = S^2$$

donde;

S = desviación estandar.

g.- Coeficiente de variación: Medida de variación relativa no absoluta que expresa a la desviación estandar como un porcentaje de la media.

Por fórmula:

$$C.V. = \frac{S}{\bar{x}} (100)$$

donde;

C.V. = coeficiente de variación.

S = desviación estandar.

\bar{x} = media.

h.- Histograma: Representación gráfica de la distribución de frecuencias o distribución de frecuencias relativas.

i.- Ojiva: Representación gráfica de la distribución de frecuencias acumuladas.

1) Edad promedio: sexo femenino ----- 43 años

2) Edad promedio: sexo masculino ----- 35 años

3) Lecturas promedio: sexo femenino.

Dilución.

1:16

1:32

Lectura promedio.

0.0693

0.0638

1:64	0.055
1:128	0.049
1:256	0.0428
1:512	0.038
1:1024	0.0323
1:2048	0.030

4) Lectura promedio: sexo masculino.

Dilución.	Lectura promedio.
1:16	0.0751
1:32	0.0634
1:64	0.0535
1:128	0.0485
1:256	0.0441
1:512	0.0382
1:1024	0.0336
1:2048	0.0297

5) Sexo femenino.

Dilución	\bar{x}	\bar{x}	Mo	M.D.	S	S ²	C.V. (%)
1:16	0.067	0.071	0.075	0.02	0.026	0.00068	38.81
1:32	0.064	0.07	0.073	0.022	0.03	0.0009	46.875
1:64	0.055	0.06	0.05	0.02	0.02	0.0004	36.36
1:128	0.05	0.066	0.04	0.02	0.02	0.0004	40
1:256	0.04	0.05	0.03	0.02	0.07	0.0049	176
1:512	0.04	0.04	0.03	0.012	0.02	0.0004	50
1:1024	0.03	0.03	0.03	0.01	0.01	0.0001	33.33
1:2048	0.03	0.03	0.03	0.01	0.01	0.0001	33.33

Sexo masculino.

Dilución	\bar{x}	$\bar{\bar{x}}$	Mo	M.D.	S	S ²	C.V. (%)
1:16	0.098	0.17	0.11	0.07	0.08	0.0064	1900.0
1:32	0.006	0.1	0.08	0.06	0.07	0.0049	1166.66
1:64	0.05	0.05	0.06	0.02	0.02	0.0004	40
1:128	0.05	0.05	0.05	0.013	0.02	0.0004	40
1:256	0.04	0.04	0.04	0.013	0.015	0.0002	37.5
1:512	0.04	0.04	0.04	0.01	0.013	0.0002	32.5
1:1024	0.03	0.03	0.03	0.01	0.014	0.0002	46.56
1:2048	0.03	0.03	0.03	0.01	0.01	0.0001	33.33

"Dilución 1:16 sexo femenino"

*Histograma.

Frecuencias	Intervalo medio
2	0.017
3	0.037
5	0.057
11	0.077
2	0.097
0	0.117
1	0.137

* Ojiva.

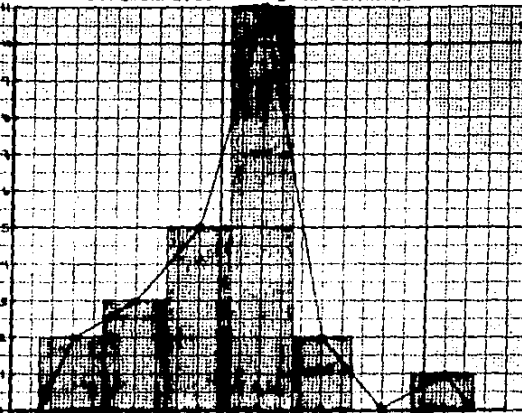
Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.007	0
0.027	2
0.047	5
0.067	10
0.087	21
0.107	23
0.127	23
0.147	24

Dilución 1:16

Sexo Femenino

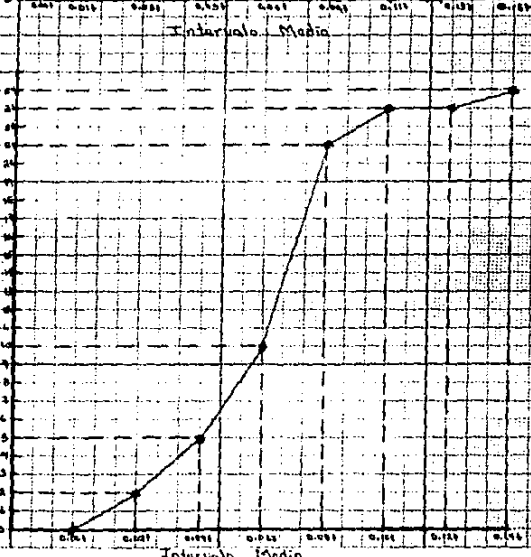
HISTOGRAMA

FRECUENCIAS



OTIVA

FRECUENCIAS ACUMULADAS



"Dilución 1:32 sexo femenino"

• Histograma.

Frecuencias	Intervalo medio
2	0.0125
4	0.0325
3	0.0525
10	0.0725
4	0.0925
0	0.1125
1	0.1325

* Ojiva.

Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.0025	0
0.0225	2
0.0425	6
0.0625	9
0.0825	19
0.1025	23
0.1225	23
0.1425	24

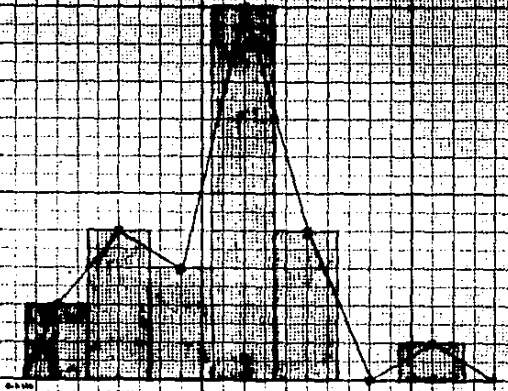
Dilución 1:32

Sexo Femenino

HISTOGRAMA

F R E C U E N C I A S

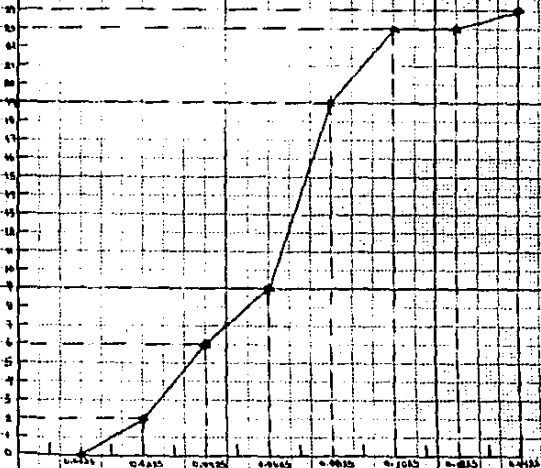
93



OBTIVA

Intervalo Medio

F R E C U E N C I A S



Intervalo Medio

"Dilución 1:64 sexo femenino"

* Histograma.

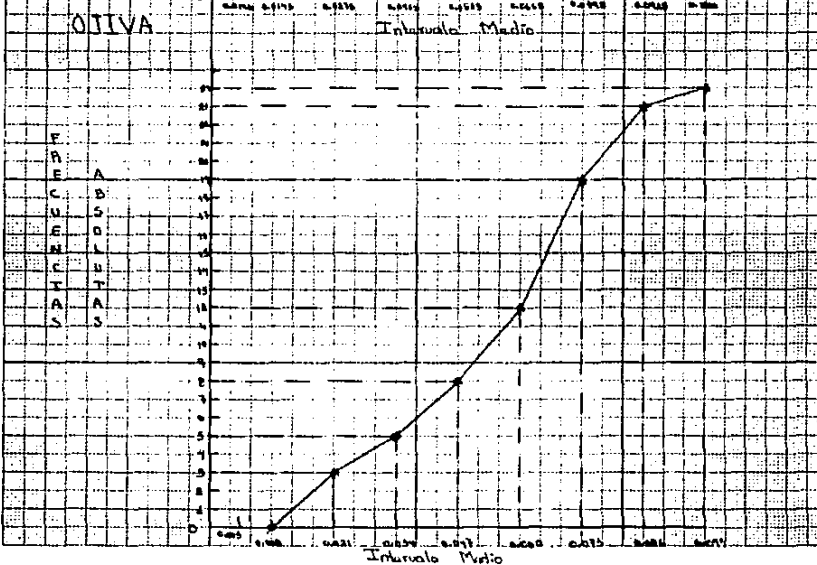
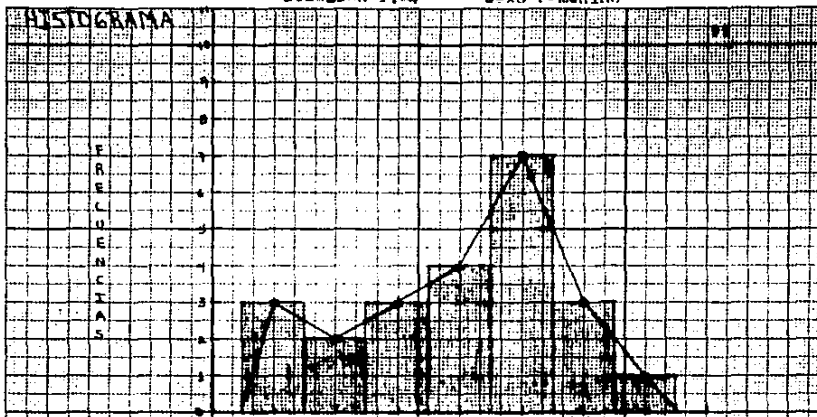
Frecuencias	Intervalo medio
3	0.0145
2	0.0275
3	0.0405
4	0.0535
7	0.0565
4	0.0795
1	0.0925

* Ojiva.

Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.008	0
0.021	3
0.034	5
0.047	8
0.060	12
0.073	19
0.086	23
0.099	24

Diligencia 1964

Sexo Femenino



"Dilución 1:128 sexo femenino"

*Histograma.

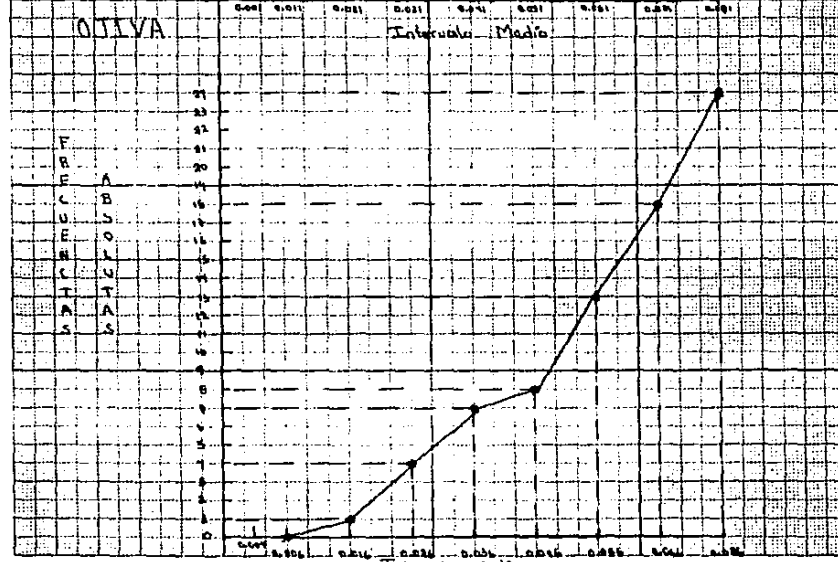
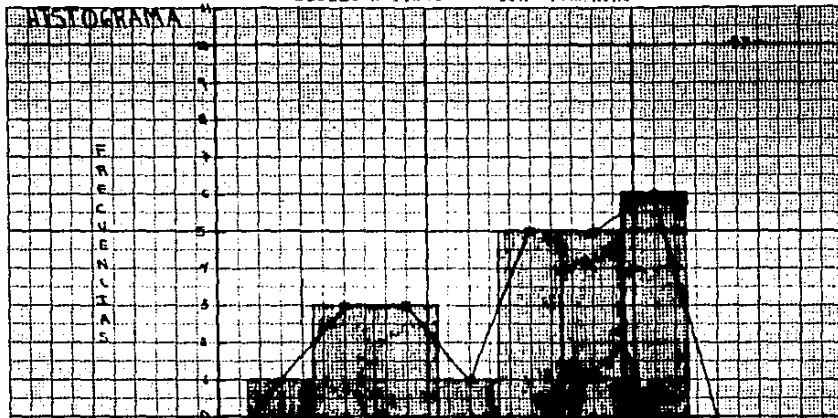
Frecuencias.	Intervalo medio
1	0.011
3	0.021
3	0.031
1	0.041
5	0.051
5	0.061
5	0.071

* Ojiva.

Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.005	0
0.016	1
0.026	4
0.036	7
0.046	8
0.056	13
0.066	18
0.076	24

Dilución 1:12^o

Sexo Femenino



"Dilución 1:256 sexo femenino"

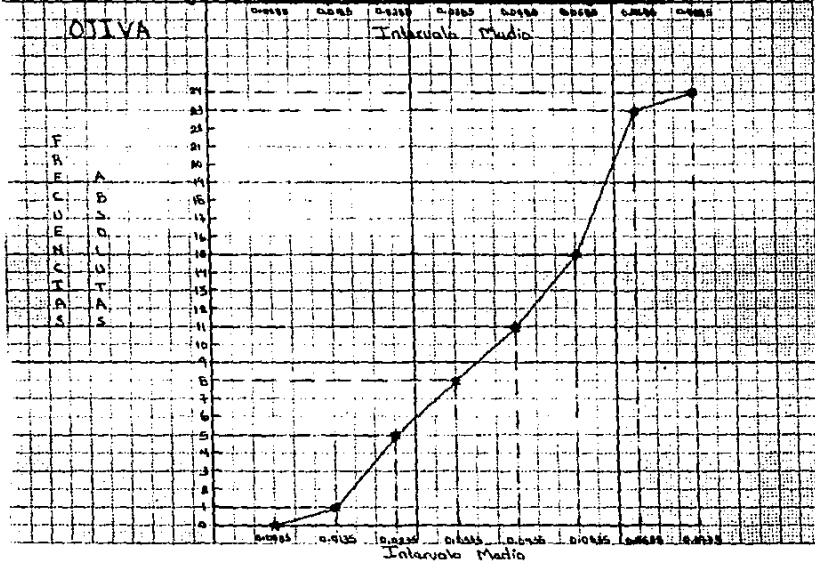
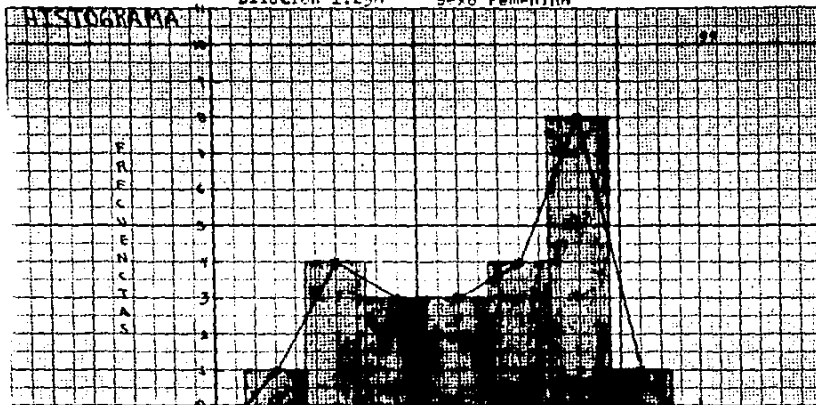
* Histograma.

Frecuencias	Intervalo medio
1	0.0085
4	0.0185
3	0.0285
3	0.0385
4	0.0485
8	0.0585
1	0.0685

* Ojiva.

Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.0035	0
0.0135	1
0.0235	5
0.0335	8
0.0435	11
0.0535	15
0.0635	23
0.0735	24

Dilución 1:256 Sexo Femenino



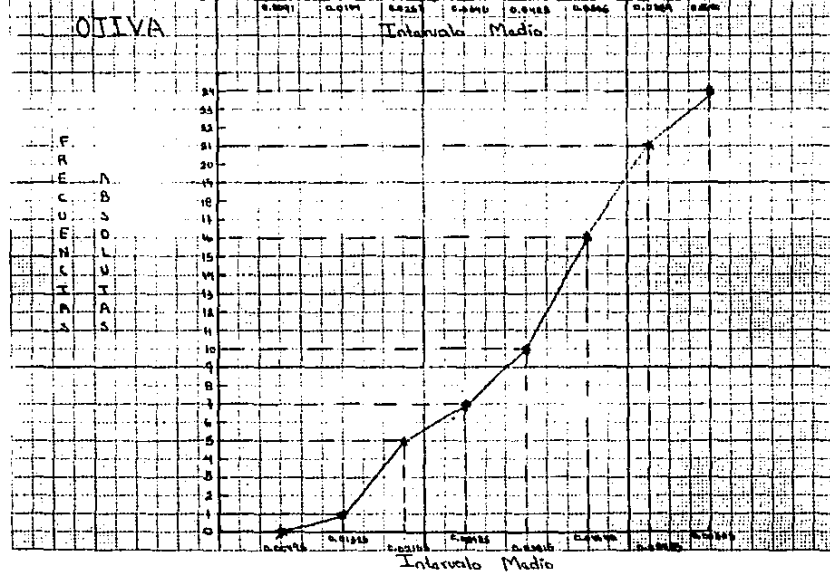
"Dilución 1:512 sexo femenino"

* Histograma.

Frecuencias	Intervalo medio
1	0.0091
4	0.0174
2	0.0257
3	0.0340
6	0.0423
5	0.0506
3	0.0589

* Ojiva.

Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.00495	0
0.01325	1
0.02155	5
0.02985	7
0.03815	10
0.04645	16
0.05475	21
0.06305	24



"Dilución 1:1024 sexo femenino"

* Histograma.

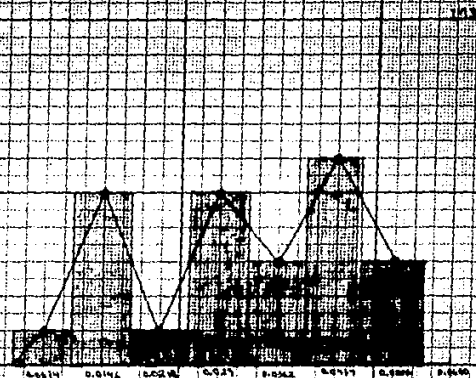
Frecuencias	Intervalo medio
1	0.074
5	0.0146
1	0.0218
5	0.0290
3	0.0362
6	0.0434
3	0.0506

* Ojiva.

Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.0038	0
0.0110	1
0.0182	6
0.0254	7
0.0326	12
0.0398	15
0.0470	21
0.0542	24

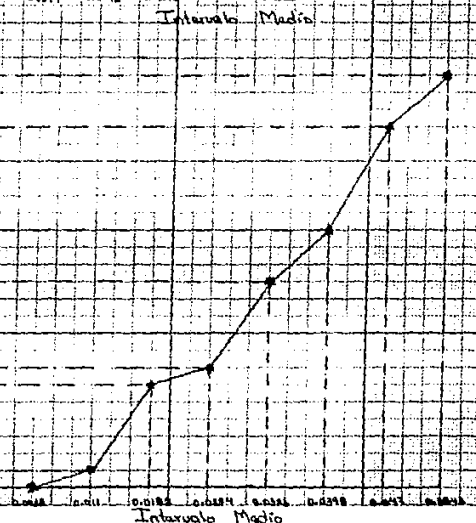
HISTOGRAMA

FRECUENCIAS



OJIVA

FRECUENCIAS ACUMULADAS



"Dilución 1:2048 sexo femenino"

* Histograma.

Frecuencias	Intervalo medio
1	0.007
5	0.014
1	0.021
6	0.028
3	0.035
6	0.042
2	0.049

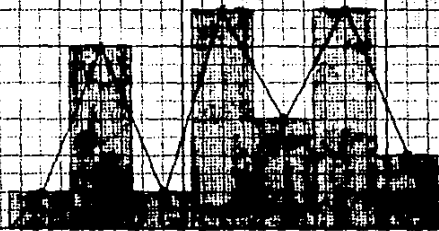
* Ojiva.

Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.0035	0
0.0105	1
0.0175	6
0.0245	7
0.0315	13
0.0385	16
0.0455	22
0.0525	24

HISTOGRAMA

101

FRECUENCIA

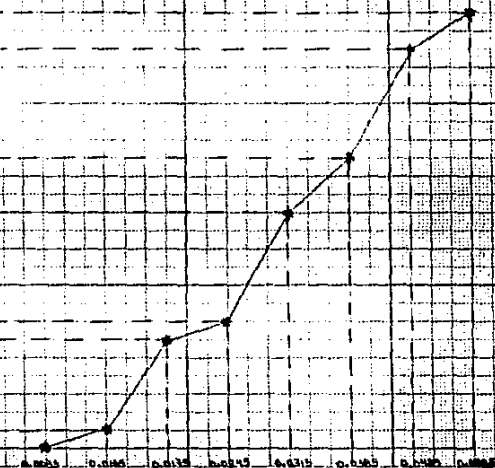


OTIVA

FRECUENCIA

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S

Intervalo Medio



Intervalo Medio

"Dilución 1:16 sexo masculino"

* Histograma.

Frecuencias	Intervalo medio
10	0.042
14	0.062
7	0.082
3	0.102
1	0.122
1	0.142
3	0.162

* Ojiva.

Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.032	0
0.052	10
0.072	24
0.092	31
0.112	34
0.132	35
0.152	36
0.172	39

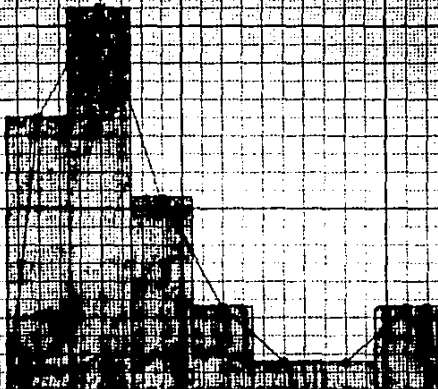
Dilución 1:16

Sexo Masculino

107

HISTOGRAMA

FRECUENCIAS

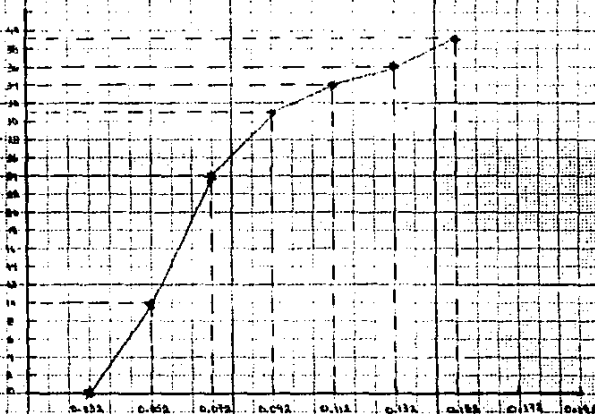


OJIVA

FRECUENCIAS
ABSOLUTAS

Intervalo Medio

Intervalo Medio



"Dilución 1:32 sexo masculino"

* Histograma.

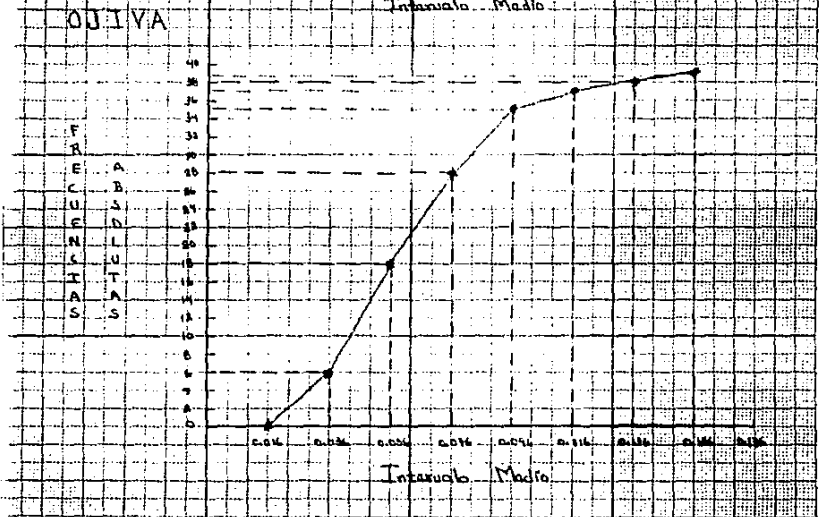
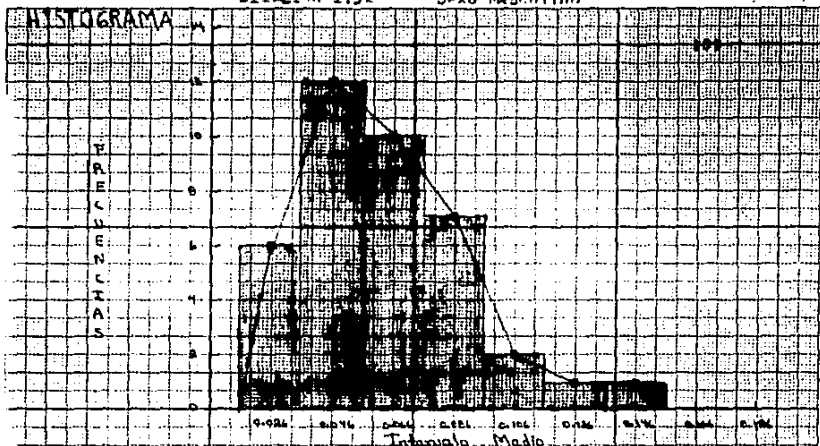
Frecuencias	Intervalo medio
6	0.026
12	0.046
10	0.066
7	0.086
2	0.106
1	0.126
1	0.146

* Ojiva.

Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.016	0
0.036	6
0.056	18
0.076	28
0.096	35
0.116	37
0.136	38
0.156	39

Dilución 1:32

Sexo Masculino



"Dilución 1:64 sexo masculino"

* Histograma.

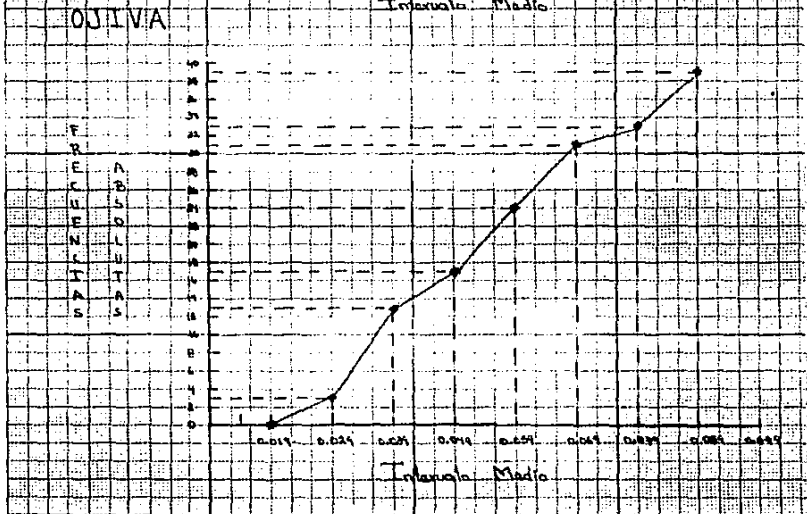
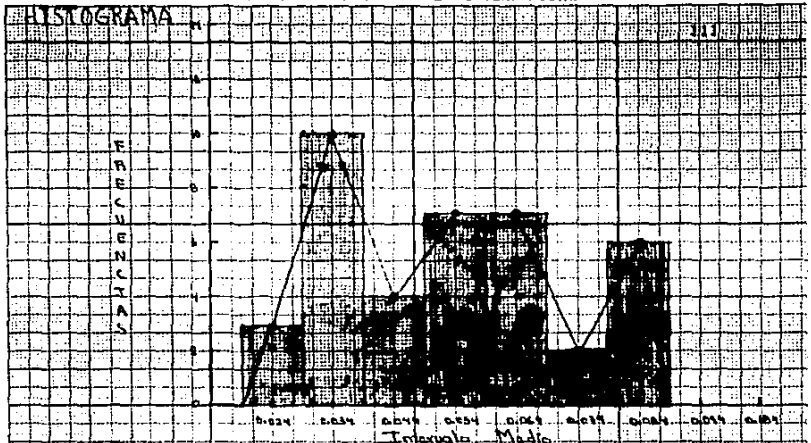
Frecuencias	Intervalo medio
3	0.024
10	0.034
4	0.044
7	0.054
7	0.054
2	0.074
6	0.084

* Ojiva

Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.019	0
0.029	3
0.039	13
0.049	17
0.059	24
0.069	31
0.079	33
0.089	39

Dilución 1:64

Sexo Masculino



"Dilución 1:128 sexo masculino"

* Histograma.

Frecuencias	Intervalo medio
2	0.0195
6	0.0295
8	0.0395
8	0.0495
9	0.0595
4	0.0695
2	0.0795

* Ojiva

Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.0145	0
0.0245	2
0.0345	8
0.0445	16
0.0545	24
0.0645	33
0.0745	37
0.0845	39

HISTOGRAMA

17

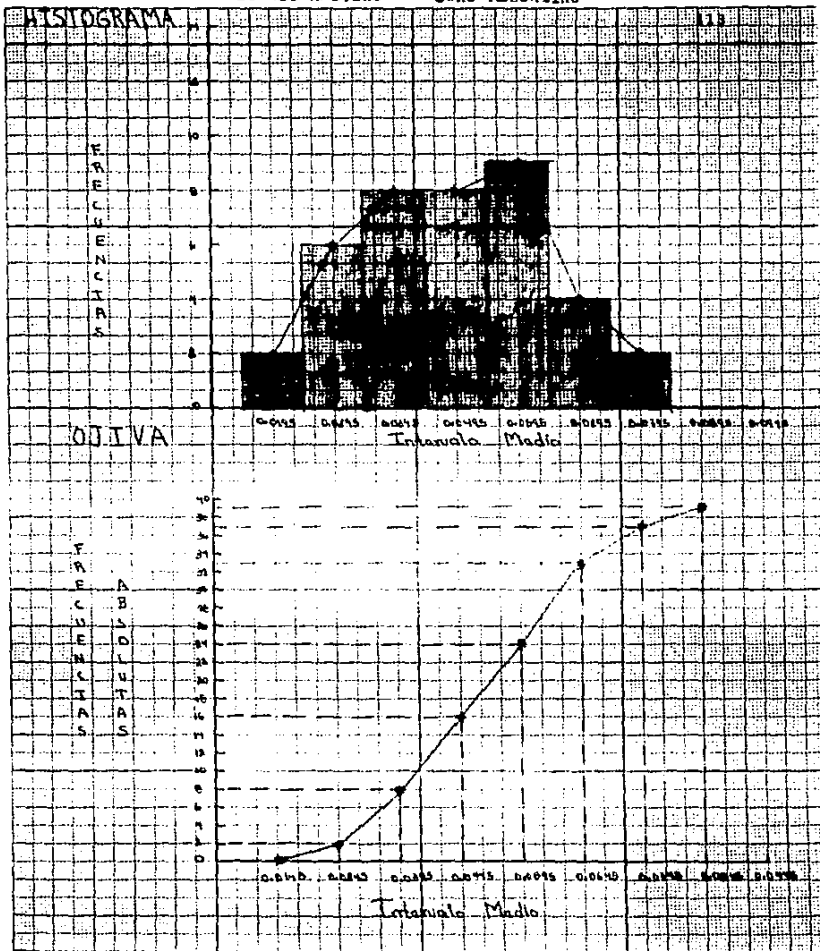
F
R
E
C
U
E
N
C
I
A
S

Intervalo Medio

OBJIVA

F
R
E
C
U
E
N
C
I
A
S
A
B
S
O
L
U
T
A
S

Intervalo Medio



"Dilución 1:256 sexo masculino"

* Histograma.

Frecuencias	Intervalo medio
2	0.015
6	0.025
9	0.035
7	0.045
10	0.055
4	0.065
1	0.075

* Ofiva.

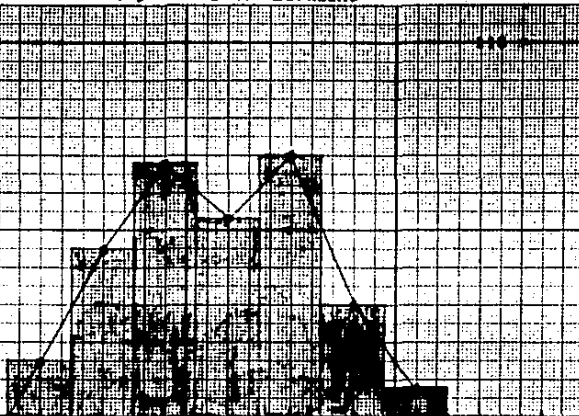
Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.010	0
0.020	2
0.030	8
0.040	17
0.050	24
0.060	34
0.070	38
0.080	39

Dilución 1:256

Sexo Masculino

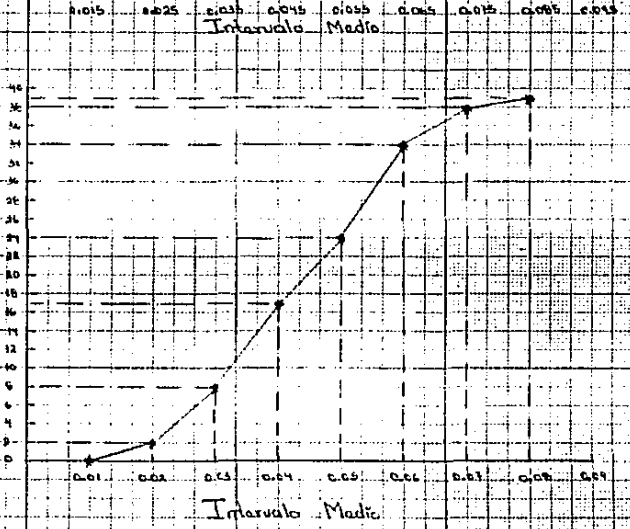
HISTOGRAMA

FRECUENCIA



OJIVA

FRECUENCIA ACUMULADA



"Dilución 1:512 sexo masculino"

* Histograma.

Frecuencias	Intervalo medio
1	0.008
3	0.018
13	0.028
8	0.038
9	0.048
4	0.058
1	0.068

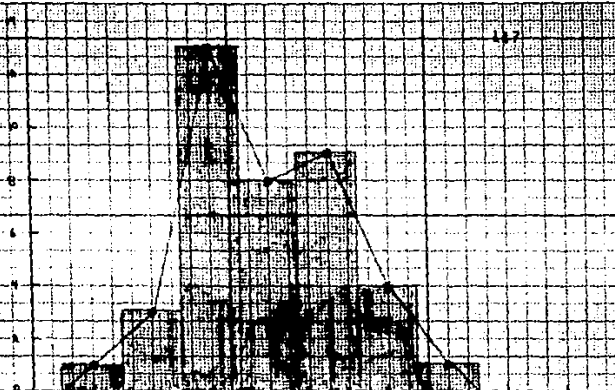
* Ojiva.

Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.003	3
0.013	1
0.023	4
0.033	17
0.043	25
0.053	34
0.063	38
0.073	39

Dilución 1:512 Sexo Masculino

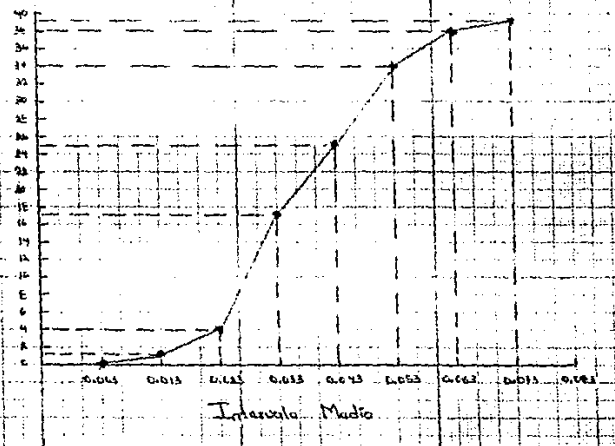
HISTOGRAMA

FRECUENCIAS



OJIVA

FRECUENCIAS ABSOLUTAS



"Dilución 1:1024 sexo masculino"

* Histograma.

Frecuencias	Intervalo medio
1	0.0055
5	0.0155
11	0.0255
10	0.0355
8	0.0455
3	0.0555
1	0.0655

* Ojiva.

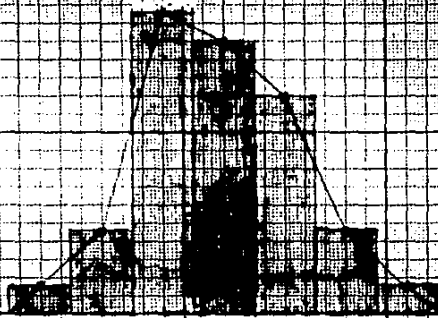
Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.0005	0
0.0105	1
0.0205	6
0.0305	17
0.0405	27
0.0505	35
0.0605	38
0.0705	39

Dilución 1:1024, Sexo Masculino

119

HISTOGRAMA

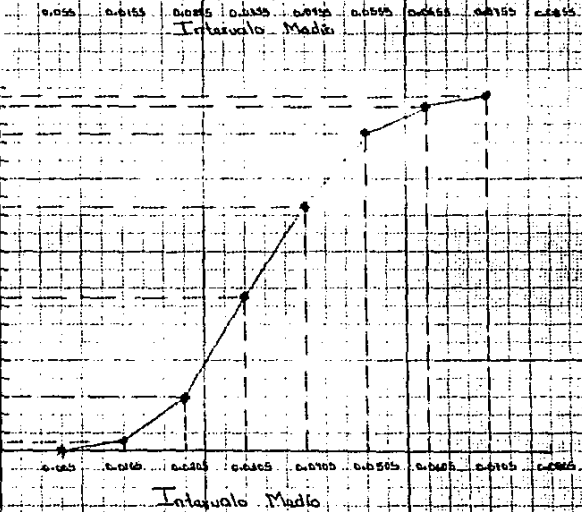
FRECUENCIAS



OJIVA

FRECUENCIAS ACUMULADAS

0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40



"Dilución 1:2048 sexo masculino"

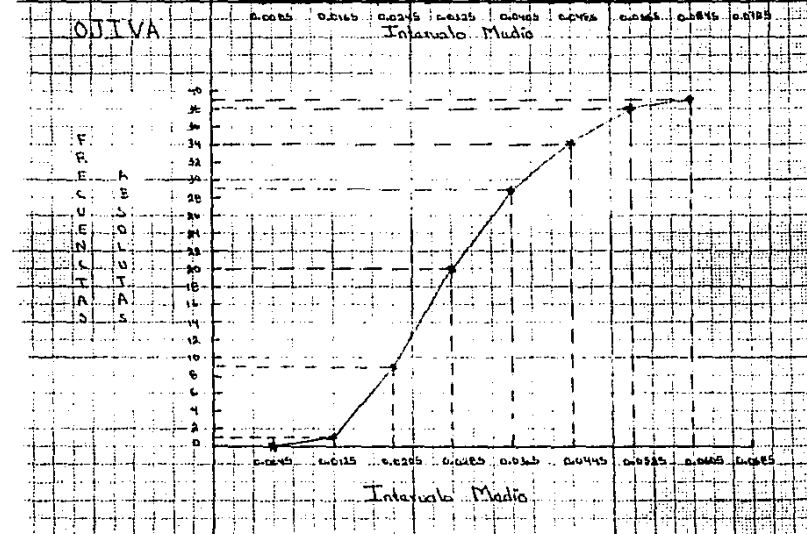
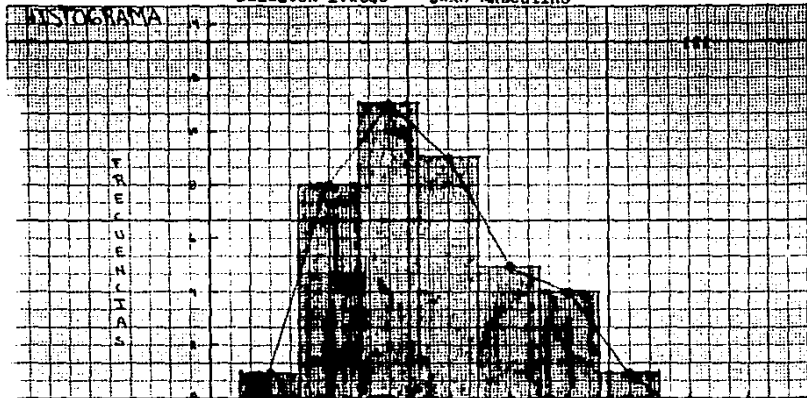
* Histograma.

Frecuencias	Intervalo medio
1	0.0085
8	0.0165
11	0.0245
9	0.0325
5	0.0405
4	0.0485
1	0.0565

* Ojiva.

Intervalo inferior	Frecuencia acumulada
0.0045	0
0.0125	1
0.0205	9
0.0285	20
0.0365	29
0.0445	34
0.0525	38
0.0605	39

Dilución 1:2048 Sexo Masculino



CAPITULO 5.

Conclusiones.

CONCLUSIONES.

- I.- Determinar cuantas personas estuvieron en contacto con el virus de Influenza B/Singapore/222/79, por medio de la detección de anticuerpos en sus sueros, estos sueros no deben de ser ictericos, pues el cromógeno que se está utilizando, da coloración amarilla y si el suero es icterico darán resultados falsos positivos.

- II.- ¿Por qué en México nunca se ha registrado una epidemia provocada por el virus de Influenza B/Singapore/222/79, si en Estados Unidos se han registrado grandes epidemias?. ¿Existe algo en el medio ambiente de México que nos haga resistentes al virus o inmunes, si somos inferiores en posición económica, desarrollo, etc.?.

- III.- ¿Existe relación entre el padecimiento provocado por el virus de Influenza y la tuberculosis pulmonar?. En determinado momento los síntomas provocados por el virus se pueden confundir con los síntomas de tuberculosis pulmonar.

- IV.- Si la prueba de Microelisa, puede acoplarse para la determinación de anticuerpos contra Influenza en sueros mexicanos.

CONCLUSIONES

La influenza o enfermedad de la gripe puede ser leve en ciertos casos o fatal en otros. Cuando llega a los extremos más graves puede causar una gran cantidad de muertes por la producción de pandemias o epidemias, por esto es muy necesario poderla detectar a tiempo y así evitar un contagio y extensión de la enfermedad.

Tiene mucha similitud con otras producidas por otros agentes, por eso es necesario detectar con certeza la etiología para poder diagnosticar y empezar el tratamiento.

La detección de anticuerpos en los sueros contra antígenos virales, son en la actualidad la prueba diagnóstica para muchas enfermedades. Los métodos serológicos del laboratorio han evolucionado, y uno de los resultados de dicha evolución es la prueba de ELISA; prueba inmuno-enzimática utilizada en esta investigación.

La eficacia de este método fué demostrada con los diferentes tipos de sueros, afirmándonos la sensibilidad que tiene, ya que un error en alguna de las preparaciones de los reactivos es detectada por el ensayo de ELISA, el tiempo es otro de los factores muy importantes dentro del diag

nóstico viral, esta prueba se lleva en su realización un - tiempo corto para ayudar en el diagnóstico viral realizado por el médico.

El inmunoanálisis trajo grandes ventajas para poder - detectar la enfermedad o el simple contacto con el virus.

La población escogida fué de diferentes edades, desde los 17 años hasta los 90 años y no presentaron anticuerpos. Resultados muy confiables por tener en el ensayo al control positivo y negativo, ventaja que presenta también la prueba de ELISA. Su costo relativamente bajo y el ahorro de reactivos, así como su estabilidad son factores que ponen en manifiesto la eficacia de la prueba; ya que no permite las reacciones cruzadas que otras pruebas producen, dando exactitud y sensibilidad.

El estudio realizado, nos demuestra que la población-escogida para detectar anticuerpos contra el virus de influenza B/SINGAPORE/222/79, no los presentó. Esto puede deberse a diferentes circunstancias como lo son: el estado - socio-económico, la nutrición, el sistema inmunológico, medio ambiente, que rodea al paciente.

Estudios realizados en México con otros tipos de antii

genos virales de Influenza en años anteriores, nos demostraron la presencia del virus de Influenza tipo A en mayor escala, ya que el virus tipo B se encuentra en una escala mucho más disminuida. Esto puede deberse a la producción de las vacunas virales, y en cierta parte a la ausencia del tipo de Influenza llamado B/SINGAPORE/222/79 y al sistema inmunológico de la población.

Los sueros de los pacientes tuberculosos fueron escogidos, debido a que estos alguna vez pueden presentar una sintomatología parecida cuando se trata de tuberculosis pulmonar, en algunos casos. También porque la tuberculosis ha resurgido nuevamente y puede en ciertas circunstancias deberse a una supresión del sistema inmunológico producida por un ataque viral, favoreciendo esto a que el bacilo de la tuberculosis, pueda extenderse y desencadenarse la enfermedad. En cuanto a los otros sueros de diversas enfermedades como son: padecimientos crónicos, diabetes, trastornos hepáticos, cardiacos, respiratorios, etc., fueron tratados para ver si estas personas habían estado en contacto con el virus o habían padecido la enfermedad viral, ya que muchas veces estos padecimientos pudieron ser alterados por la presencia del virión, es decir, aumentaron su gravedad por la intervención del virus de Influenza.

Los sueros controles sanos, no presentaron anticuerpos contra el virus, por lo que nos demuestra que en la población escogida de la ciudad de Guadalajara, no hubo incidencia del virus.

El método de ELISA, es una prueba confiable, sensible, exacta y eficaz para la enfermedad de la gripe en su estado activo, en su convalescencia o en su simple contacto con el virus, para prevenir o combatirla si se presenta, aunque los pacientes a los que se les practicó no presentaron anticuerpos contra el virus de Influenza B/SINGAPORE/222/79, lo cual indica, que dicho virus, no ha estado presente en la ciudad. También las vacunas han hecho un gran trabajo en la prevención de la enfermedad, por lo que en la actualidad ya hay muchas ventajas para poder ganar la batalla viral, en cuanto ésta vuelva a presentarse. Tal ventaja es la prueba de ELISA, muy importante para determinar los anticuerpos contra el virus y prevenir las pandemias y epidemias que causarían un gran número de muertes.

En México no se presentó el virus B/SINGAPORE/222/79, dato muy significativo pues puede deberse a muchas circunstancias que posteriormente pueden ser investigadas.

CAPITULO 6.

Bibliografía.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Arden N. H., Patriarca P.A., Kung-Jong L., Harmon M.-W., Bradon F., Kendal A.P., Safety and immunogenicity of a 45 g supplemental dose of Inactivated split-virus influenza B vaccine in the elderly. The Journal of Infectious Diseases. 153: 4: 1986, 645-813.
- (2) Pacheco C.R., Influenza. Perspectivas en Medicina. 118: 2: 1982, 78-82.
- (3) Wong-Chia C., Higuera F., De la Rosa D., Ortega J.A., - Investigación de los virus de la Influenza predominantes en el Valle de México durante el invierno 1980-81. Revisión Médica del Hospital General. 44:4:1981, 128-130.
- (4) Wong-Chia C., Aplicación clínica del Laboratorio de Virología. Revisión Médica del Hospital General. XLI:11-12: 1978, 440-444.
- (5) Hernández J., Santos L. Aspectos relevantes del inmunoanálisis enzimático (ELISA). Infectología. V: 2: 1985, 52-56.

- (6) Ruiz J., Cedillo R.N., Cielo M., Silva C., Bustamante M., Espinoza E.L., Mendivil J.R., Martínez M.A. Infección respiratoria. Estudio de 133 familias. Gaceta Médica de México. 115: 8: 1979, 347-357.
- (7) Santos L., Hernández J., Quezada F., Estrada S. Estandarización del inmunoanálisis enzimático. Infectología. VI: 1: 1986, 18-23.
- (8) Wong-Chía C., Higuera F. Característica de la epidemia de Influenza de 1976 en México. Revisión Médica del Hospital General. 40:1: 1977, 59-63.
- (9) Alvarez R. Investigación epidemiológica sobre el brote de Influenza 1969-1970 y el poder antigénico de la vacuna anti-influenza. Gaceta Médica de México. 101: 1: 1971, 21-26.
- (10) Ordóñez B.R. Epidemiología del brote epidémico de Influenza del invierno de 1969-1970. Gaceta Médica de México. 101: 1: 1971, 27-36.
- (11) Ruiz J. Investigación sobre la vacuna contra la Influenza. Gaceta Médica de México. 101: 1: 1971, 37-42.

- (12) Murphy B.R., Clements M.L., Tierney E.L., Black R.E., Stienberg J., Chanock R.M. Dose response of influenza A/Washintong/897/80 (H3N2) avian-human reassortnat virus in adult volunteers. The Journal of Infectious - Diseases. 152: 1: 1985, 225-229.
- (13) Stein-Streilen J., Guffe J. In vivo treatment of mice and hamsters with antibodies to asialo GM1 increases morbidity and mortality to pulmonary influenza infection. The Journal of Immunology. 136: 4: 1986, 1435--1441.
- (14) Gradien M., Pettersson C.A., Gardner P.S., Linde A., Staton A. Rapid viral diagnosis of acute respiratory-infections; Comparison of enzyme-Linked immonosorbent assay and the immuno-fluorecense technique for detection of viral antigens in nasopharyngeal secretions.- The Journal of Clinical Microbiology. 22: 5: 1985,757 760.
- (15) McQuillin J., Madeley C.R. Monoclonal antibodies for the rapid diagnosis of influenza A and B virus infections by immunofluorescence. The Lancet. Octubre 26:- 1985, 911-914.

- (16) Monforte G.E. Vacuna de la Influenza 1982-1983. Infectologia. 11: 6: 1982, 751-752.
- (17) Lennette E. H., Schmidt H.J. Diagnostic Procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. Edition-5 Th. 585-607.