

Avances recientes en el diagnóstico, epidemiología y prevención de la influenza. Revisión crítica

Palabras clave: Virología de la influenza, cuadro clínico, patogenia y patología, epidemiología, prevención.

Key words: Influenza virology, clinical illness, pathogenesis and pathology, epidemiology, prevention.

Recibido: 03/02/2010
Aceptado: 09/02/2010

Teodoro Carrada Bravo*

* Epidemiólogo Especialista en Enfermedades Transmisibles y Virología Médica.

Correspondencia:

Dr. Teodoro Carrada Bravo
Calzada de los Rincones 694, Col. Las Plazas
36620 Irapuato, Guanajuato, México.

4

Resumen

Cada año, 20% de los niños y 5% de los adultos desarrollan influenza A o B sintomática. El curso clínico es modificable por la edad del enfermo, el nivel de inmunidad preexistente, las propiedades del virus, las comorbilidades, la inmunosupresión, el tabaquismo y el embarazo. La infección se contagia principalmente por las gotitas expulsadas al toser o estornudar, pero los fómites son otro modo de transmitir la infección. La hemaglutinina viral facilita el enlace del virus con el receptor de ácido siálico y la replicación viral comienza sobre el epitelio ciliado, los macrófagos y los neumocitos tipo 2, la carga viral sube hasta 10^3 – 10^7 TCID₅₀/mL en el exudado nasofaríngeo, permanece así de 24 a 72 horas y cae al quinto día. La virulencia microbiana reside en el tipo de hemaglutinina, aunque otros factores como la proteína no estructural-1, PB-2 y neuraminidasa también participan en la patogenia. La neumonitis hemorrágica se ha relacionado con la producción excesiva de citocinas causantes de daño tisular y la muerte. La mortalidad atribuible a la influenza se ha rastreado contando las defunciones codificadas como neumonía o influenza; sin embargo, ese indicador es menos sensible que las muertes por todas las causas. La morbilidad específica puede cuantificarse usando el diagnóstico clínico más la confirmación por el laboratorio. Las aves acuáticas silvestres son el reservorio

Abstract

About 20% of children and 5% of adults develop symptomatic A or B influenza each year. The clinical course is affected by patient's age, the degree of preexisting immunity, properties of the virus, comorbidities, immunosuppression, pregnancy and smoking. Most infections are spread by virus-laden droplets expelled during coughing and sneezing, but fomites is another mode of transmission. Hemagglutinin facilitates attachment, of the virus to sialic acid receptors, viral replication is initiated at the ciliated epithelium, macrophages and pneumocytes type 2, the viral load rises to 10^3 – 10^7 TCID₅₀/mL in the nasopharyngeal wash, remains high for 24–72 h and falls by the fifth day. Viral virulence resides in type of hemagglutinin, but other factors such as non-structural protein-1, PB-2 and neuraminidase are also involved in pathogenicity, suggesting that severe haemorrhagic pneumonia is due to induction of and excess of cytokines leading to tissue damage and death. The extent of influenza mortality has been tracked by counting deaths caused by pneumonia-influenza, however, they offer less sensitive data than those of all-cause mortality. Influenza morbidity can be quantified by combining clinical illness diagnosis with laboratory confirmation. Aquatic birds are main reservoir of influenza A viruses transmission to humans, pigs, domestic birds and

principal del virus A, habiéndose demostrado la transmisión a los humanos, cerdos, aves de corral y otros animales, por medio del análisis filogenético de las nucleoproteínas virales. Las vacunas inactivadas son el medio principal de prevenir la influenza, pero las vacunas virales adaptadas en frío ofrecen una protección más amplia para los niños. El oseltamivir por vía oral y zanamivir inhalado han demostrado su eficacia clínica para prevenir y tratar la influenza.

Introducción

La influenza es una infección respiratoria aguda y muy contagiosa, causada por un virus envuelto y provisto con ocho segmentos de ARN. Los reservorios naturales de la infección son las aves marinas y costeras; ocasionalmente, se transmite a los patos domésticos, pollos, pavos, cerdos, caballos, gatos, focas, ballenas, aves silvestres, varios primates y humanos. En ese devenir constante, el virus muta y se recombina sin cesar; de este modo, resiste la presión selectiva generada por el sistema inmune del hospedador y los cambios drásticos del ambiente.^{1,2}

Los virus de la influenza son un modelo único de la evolución darwiniana, tanto por la velocidad acelerada de los cambios antigénicos como por la capacidad enorme del intercambio genómico; por ello, la nanoestructura que llamamos «virus de la influenza» ha sido y es objeto de interés para muchos cazadores de microbios, médicos, veterinarios, zootecnistas, ecólogos, genetistas, epidemiólogos, bioquímicos, economistas, políticos, periodistas y público en general.³

Ciertamente, el virus viene y aparentemente se retira, pero nunca sale derrotado. En este trabajo preliminar se hace una revisión crítica de la virología, ecología y epidemiología, señalándose los avances trascendentes que merecerían ser clarificados o profundizados por los investigadores.

Los cazadores de microbios

En el año 1900 Centanni y Savonucci aislaron un agente ultramicroscópico, capaz de atravesar los

other animals has been demonstrated by phylogenetic analysis of viral nucleoproteins. Inactivated vaccines are the prime means to prevent influenza, but cold adapted virus-vaccines appears to offer broader protection in children. Oral oseltamivir and inhaled zanamivir have shown clinical efficacy in preventing and treating influenza-illness.

filtros bacteriológicos, a partir de un pollo con peste aviar (geglugelpeste). Este acontecimiento marcó el inicio de la ortomyxovirología, pero no fue sino hasta 1955 cuando se reconoció al virus de la influenza A (H1N1) como responsable de tal enfermedad zoonótica y mortífera (nota del Dr. ER Kilbourne).

En 1930, el médico veterinario RE Shope aisló un virus de la influenza, habiendo obtenido las muestras de un cerdo con síntomas respiratorios.⁴ Tres años más tarde, Wilson Smith (WS), Andrews y Laidlaw, infectaron experimentalmente al hurón (en inglés = *ferret*) con el exudado faríngeo de un humano febril y gripiento, a partir de la muestra obtenida por lavado de garganta inflamada. La cepa original WS de influenza A (H1N1) ha sido preservada en los laboratorios de investigación y se utiliza todavía como prototipo en los estudios de genética viral.⁵

En 1940, T Francis Jr y TP Magill, en trabajos independientes, lograron aislar e identificar el virus de la influenza B, habiéndose inoculado las muestras tanto en los ratones como en los hurones.^{6,7}

En 1941, el Dr. FM Burnet logró el crecimiento masivo del virus de la influenza inoculando la cavidad alantoidea del embrión de pollo; de este modo se abrió la puerta para preparar antígenos purificados, y más tarde se inició la producción de vacunas para uso humano.⁸ En ese mismo año, George Hirst hizo dos avances importantes: en el líquido alantoideo cosechado y teñido por la sangre, los eritrocitos del pollo se aglutinaban y poco después se desaglutinaban espontáneamente. De un modo inteligente y sagaz, postuló la existencia de receptores virales sobre la superfi-

cie del eritrocito; posteriormente demostró la presencia de una enzima propia del virus (neuraminidasa), la cual destruía estos receptores. Ese trabajo confirmó el dicho pasteuriano: la oportunidad favorece sólo a las mentes preparadas; por otro lado, permitió que los virólogos se desentendieran transitoriamente de los animales de experimentación y se concentraran en la extracción química y purificación de las enzimas. Poco después pudo medirse el fenómeno de Hirst, condicionado por la presencia de la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), ambas macromoléculas están dispuestas regularmente sobre la superficie del virión; estas propiedades pudieron separarse también al calentar los virus a 55 °C.⁹

En 1964, WG Laver logró la separación de HA y NA rompiendo la membrana viral con detergentes y efectuó la electroforesis sobre las tiras del acetato de celulosa.¹⁰

En 1972, WG Laver y RG Webster hicieron otra contribución importante: en el laboratorio partieron enzimáticamente la HA en dos péptidos: HA₁ y HA₂, este último más pequeño; más tarde fragmentaron la macromolécula en varios micropéptidos que fueron separados sobre una tira de acetato por absorción electroforética y, al teñirlos, se obtuvo el llamado «mapeo molecular» (*fingerprint*) de cada virus aislado.¹¹ Con esta técnica fue posible hacer un seguimiento longitudinal-temporal de los cambios sufridos por los antígenos superficiales.

A veces, el virus sufre un cambio antigénico mayor (Shift), por ejemplo, la HA-I fue sustituida bruscamente por la HA-3, esa transformación puede o no acompañarse de cambios simultáneos en la neuraminidasa.¹¹ La neoadquisición de macromoléculas superficiales distintas está condicionada por la importación de genes nuevos procedentes de aves, humanos o porcinos, lo que explicaría la incapacidad del sistema inmune para contener o abatir la replicación de virus reconvertidos estructuralmente. En el periodo inter-pandémico, el virus de la influenza sufre una acu-

mulación progresiva de mutaciones puntuales, dando por resultado un manojo de aminoácidos diferentes a los del tipo original, ya sea por pérdida, por ganancia o por sustitución genética, fenómeno conocido como deriva antigenética (drift).¹² Sin duda, el devenir siempre cambiante de la influenza pasando por hospedadores animales y humanos diversos es un proceso interminable de mutación-recombinación genética conocida sólo parcialmente, que bien pudiera servir como modelo para investigar a fondo el fenómeno de la evolución darwiniana.¹³ El virus de la influenza A (H1N1), tiene un genoma de ARN segmentado con ocho hebras de polaridad negativa, seis de estos genes son monocistrónicos, pero los dos restantes (M y NS) son desdoblados en la transcripción, es decir, el virus tiene la capacidad de sintetizar diez péptidos distintos. Los virus de la influenza aislados por el laboratorio son tipificados con base en las hemaglutininas (HA) y neuraminidasas (NA) que existen sobre la superficie viral; en los humanos, sólo los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 han estado circulantes en varios países del mundo, en Asia ha circulado también el subtipo H5N1 y en Europa el H7N7; estos dos últimos han causado enfermedad sistémica y defunciones aparatosas entre las poblaciones de pollos y pavos domésticos. Los expertos saben que tales virus tienen su nicho natural entre las aves acuáticas y costeras, causándoles muy poco daño, pero ocasionalmente adquieren la propiedad de transmitirse a los patos y gatos domésticos, y luego pueden infectar a los cerdos domésticos y a los humanos, que poseen en sus tejidos un receptor viral de alfa 2,6-galactosidasa (sialidasa).¹⁴

Virología

Los virus de la influenza son partículas envueltas de la familia *Orthomyxoviridae*, miden de 80 a 120 nm de diámetro y tienen la superficie recubierta por glicoproteínas (peplómeros) con 16 nm de longitud, que se proyectan como espículas. Se han

reconocido 15 subtipos de hemagglutinas (H1-H15) y nueve de neuraminidasas (N1-N9). Los genes ARN con polaridad negativa, es decir, no funcionan como ARN mensajero, pero sí requieren de la ARN-polimerasa-2 celular (del hospedador) para replicarse con polaridad positiva y ser ya una cadena codificante. Los viriones se enlazan selectivamente sobre los receptores celulares de superficie, conteniendo el ácido siálico presente sobre la membrana celular. Las HA y NA están ancladas dentro de una bicapa de lípidos superficiales y también la envoltura matriz (peplos), en el interior llevan los genes helicoidales ARN (figuras 1 a 4). Se ha registrado la presencia de viriones tubulares, particularmente en las cepas recién aisladas, y otras formas esféricas teñidas por el método del contraste negativo (figuras 5 a 7). La hemagglutinina codificada por el gen 4 tiene forma de barra y estructura trimérica, sostenida por enlaces covalentes (figura 8). Cada virión lleva cerca de 500 mol, es decir, 170 trímeros funcionales. Estructuralmente tiene en el centro un tallo fibrilar que sirve como puente de unión para dos globos polares: A) La región macroglobular externa lleva el grupo aminoterminal y es la porción más superficial, donde se asienta el «péptido señal», sitio acarreador de los epítomos inmunogénicos capaces de generar la enorme diversidad antigénica tan característica del virus de la influenza y que, al ponerse en contacto con el sistema inmune, induce la producción de anticuerpos neutralizantes. Otra función importante es servir como punto de enlace con los sialorreceptores de la membrana celular y de los eritrocitos. B) El dominio microglobular interno posee el grupo carboxiloterminal y sirve principalmente como sitio de anclaje dentro del peplos. La macromolécula de la HA es sintetizada con un peso original de 75 kD y, por acción de una exopeptidasa, es partida en dos polipéptidos glucosilados: el HA₁ con 329 aminoácidos (aa) y el HA₂ con 221aa, ambos están unidos por un puente disulfuro en-ganchado entre la cisteína 14 de HA₁ y la cis-137

de HA₂ (figura 3). La partición proteolítica de HA₂ facilita la exposición del péptido de fusión hidrofóbico y propicia la inserción en la capa lipídica del retículo endoplásmico.¹⁵

El gen 5 codifica la neuraminidasa (figura 9), glicoproteína con forma semejante a un champiñón, apoyado sobre un tallo que remata sosteniendo la cabeza globular y tetramérica con función de esterasa, cuya misión principal es remover los residuos pegajosos del ácido siálico acumulados sobre la membrana celular infectada; de ese modo se facilita la gemación de los viriones neoformados, evitándose la autoagregación. La molécula con 469 aminoácidos (aa), tiene también una porción hidrofóbica de anclaje a nivel de los aminoácidos 7 al 35 y la bisagra del tallo-cabeza se localiza entre los aminoácidos 36 a 73. Los fármacos antivirales oseltamivir y zanamivir son inhibidores de la neuraminidasa; impiden así la liberación final de los viriones, aunque en la práctica clínica se ha demostrado la aparición creciente de mutantes farmacorresistentes. El cuadro 1 enlista ordenadamente los ocho genes-proteínas estructurales del virión, de acuerdo al peso molecular (de arriba-abajo). Los genes 7 y 8 generan dos péptidos pequeños.¹

El gen 7 codifica las proteínas de la cápside M₁ y M₂; la primera envuelve al núcleo viral y tiene función de sostén, la segunda es un canal iónico y permite el paso de protones al endosoma.

El gen 8 codifica dos péptidos no estructurales NS-1 y NS-2; el primero actúa como un antagonista del interferón (IF), por tanto, es un factor de virulencia en los virus A y B. En el laboratorio se ha generado la mutante delta del virus A PR/8, incapaz de bloquear la producción del interferón. Cuando los ratones fueron inoculados con PR/8 nativa murieron con una dosis letal media (DL₅₀) de 10³ unidades formadoras de placas (UFP); en cambio, la mutante delta fue incapaz de matar al ratón normal. El péptido NS-2 trabaja como agente de exportación de las proteínas nucleares. Cuando los ratones fueron inoculados con una sola

Cuadro I. Estructura y composición del virus de la influenza A (H1N1).

Segmentos del ARN (genes)	No. de nucleótidos	Proteínas identificadas	Nomenclatura abreviada	No. de aminoácidos	Peso molecular K Dal
1	2,341	Polimerasa-2	PB-2	759	96
2	2,341	Polimerasa-1	PB-1	757	87
3	2,233	Polimerasa	PA	716	85
4	1,778	Hemaglutinina	HA	566	75
5	1,565	Nucleoproteína	NP	498	50-60
6	1,413	Neuraminidasa	NA	469	48-63
7	1,027*	Proteínas de membrana	M1	252	60
			M2	97	15
8	890*	No-estructurales	NS 1	230	25
			NS 2	121	12

* Estas proteínas son desdobladas durante la transcripción: PB = proteína básica; PA = proteína ácida.

dosis de la mutante delta con 10^6 UFP, se observó una protección total contra la influenza. Esta información podría aprovecharse para la fabricación de vacunas antivirales.¹⁵

La replicación viral

La HA viral se une al receptor celular del ácido siálico, y penetra al citoplasma por endocitosis, liberándose la nucleocápside (figuras 10 y 11); en ese evento, la HA es cortada por una proteasa, separándose HA₁ y HA₂, exponiéndose el dominio hidrofóbico de HA₂. Dado que el ARN viral tiene polaridad negativa, requiere de la polimerasa 2 del hospedador para forjar el ARN mensajero (ARNm), capaz de traducir las proteínas virales. Por otro lado, el virus necesita una replicasa y la cooperación de NP con PB-2 para sintetizar las hebras de ARN con polaridad negativa. Se llevan a cabo dos tipos de transcripción: A) la poliadenilada del ARNm y B) la no poliadenilada del ARN genómico. Durante las primeras horas de la infección, en el citoplasma cargado con el ARNm se sintetizan los péptidos P, NS-1, NS-2 y M-1, los que migran al núcleo y contribuyen a propiciar la síntesis del ARN genómico, junto con la replicasa. Posteriormente, el ARN genómico y la NP se desplazan hacia el citoplasma, mientras HA, NA y M-2 permanecen todo el tiempo

en el citoplasma. El péptido M-2 funciona como señal del ensamblaje junto a la membrana celular, que ocurre cuatro a cinco horas después de la infección. La NA es la encargada de eliminar los residuos del ácido siálico, facilitando la liberación de los viriones, sin agregación. A veces, el cambio de un solo aminoácido o la presencia de inhibidores (oseltamivir), pueden reducir el funcionamiento de la enzima o abolirlo.

El virus no inicia la síntesis del ARNm porque no puede modificar el extremo 5' de esa molécula por Cap-metilación, necesita de ARN-polimerasa-2, forjando una secuencia líder del ADN celular, con metilación de la guanina en posición 7 (G7-met). El ARNm sintetizado es cortado por la endonucleasa viral entre los nucleótidos 10 al 13 del Cap y funciona así como «molde» para iniciar el proceso. El sitio del corte es la adenina posición 3', luego se añade una guanina y la penúltima base es un residuo de citosina. El complejo PA, PB-1 y PB-2 se desplaza a lo largo de la cadena en crecimiento y PB-1 lleva el sitio activo del alargamiento, por ello, esta polimerasa condiciona la velocidad y calidad de la replicación viral y funciona así como factor principal de la virulencia.¹⁶

En el laboratorio es factible infectar células VERO mantenidas en suspensión nutricional, esta técnica se aprovecha para preparar vacunas de

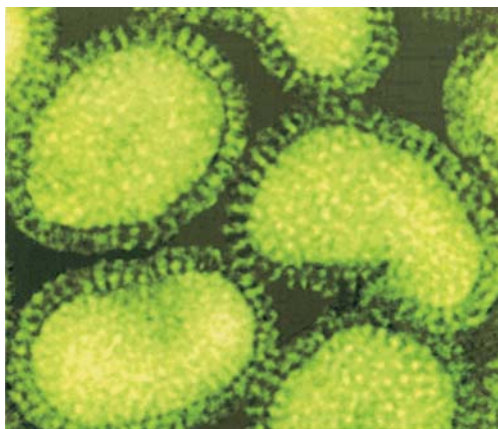


Figura 1. Virión completo del A (H1N1). Obsérvese la morfología esférica. La superficie está recubierta por glicoproteínas espiculares. ME; 200,000X.

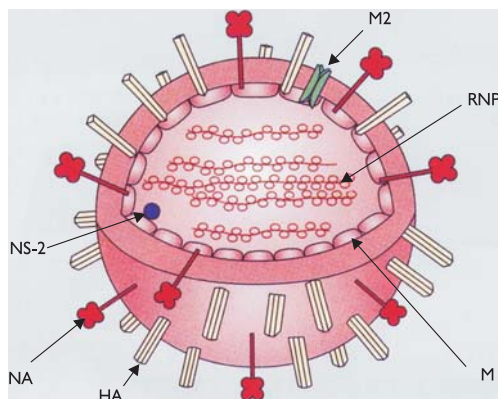


Figura 2. Esquemas del virus de la influenza A. Obsérvese la neuraminidasa (NA) tetramérica en forma de champiñón y la proteína M2 incrustada dentro de la cápside (sirve como canal iónico).

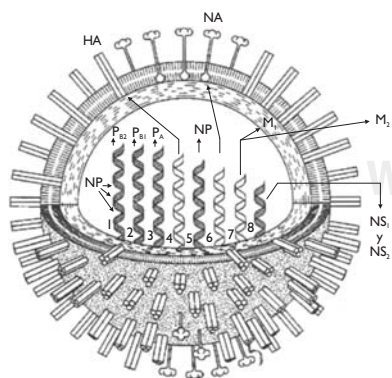


Figura 3. Virus A (H1N1) esquemático. La hemaglutinina superficial es una barra trimérica. Lleva ocho genes: PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M₂-M₁ y NS₁-NS₂ (izquierda a derecha).

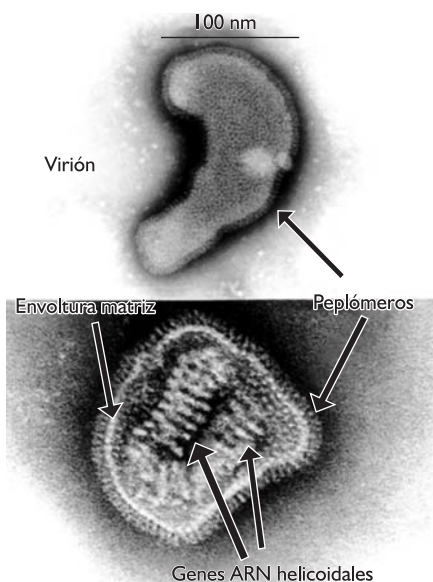


Figura 4. Arriba: Virión completo A (H1N1). Abajo: la imagen muestra dos genes helicoidales de ARN-nucleoproteína, la envoltura matriz bien delineada y los peplómeros superficiales de glicoproteínas. (ME tinción contraste negativo con ácido fosfotúngstico; 150,000X).

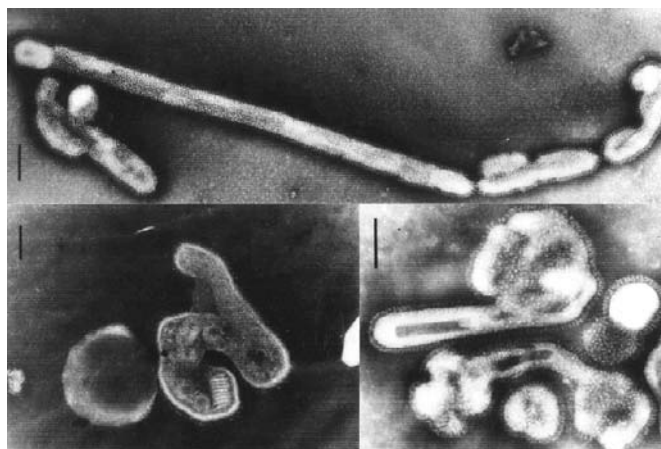


Figura 5. Tres viriones pleomórficos del A (H1N1), aislamiento reciente. Izquierda, forma tubular; abajo derecha se ve un gen helicoidal dentro del núcleo central. (Tinción negativa; 120,000X).

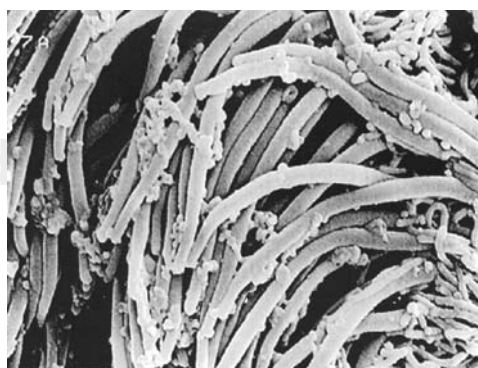


Figura 6. Los viriones de morfología tubular se encuentran principalmente en las cepas recién aisladas. Virus A (H1N1) aislado en México, 2009. (ME de sombreado con platino; 150,000X).

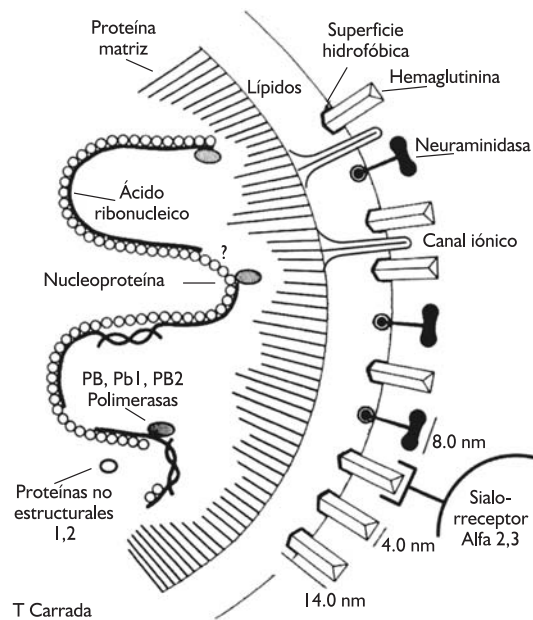


Figura 7. Virus de la influenza A diagrama de un corte. La proteína matriz (M1), junto con la bicapa de lípidos, forman la envoltura externa (peplos) donde se insertan las glicoproteínas superficiales.

10

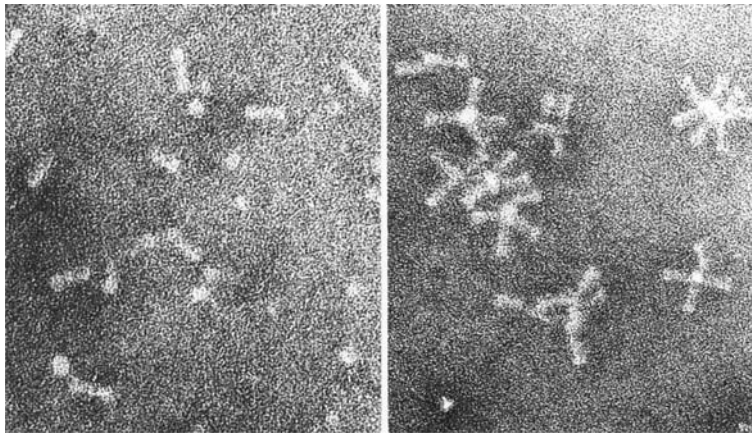


Figura 8. Izquierda: El virión fue roto con un detergente duodecilsulfato-sodio (SDS). Derecha: Al remover el SDS se forman floretes por las barras purificadas de la hemaglutinina. Cortesía del Dr. Robin Valentín.

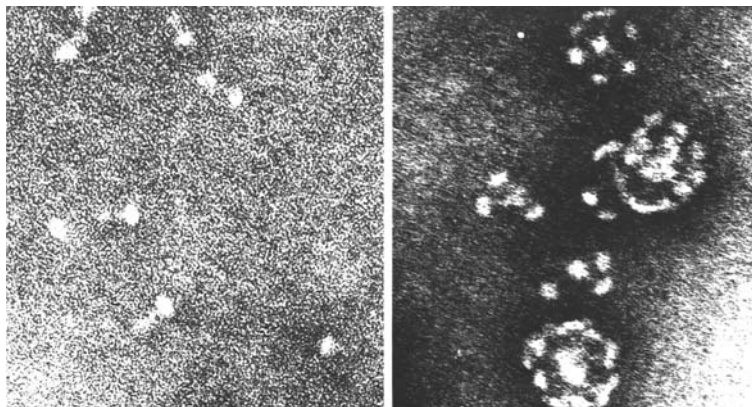


Figura 9. Neuraminidasa purificada en forma de champiñón, la cabeza es grande y tetramérica (izquierda). Al remover el detergente se ven agrupamientos «en flor» (derecha), compárese con la figura 8. Cortesía Dr. Robin Valentín.

mejor calidad y se acorta el tiempo de generación (figura 12).

Ecología, reservorios y vigilancia

Hoy 16 tipos de hemaglutininas y nueve neuraminidasas, circulando de modo natural en las aves acuáticas y costeras, sin causarles enfermedad aparente.¹⁴ En los patos salvajes, los virus de la influenza se multiplican en el epitelio intestinal y son excretados en las heces a títulos altos, habiéndose aislado los virus en las heces frescas y en las aguas contaminadas, en donde sobreviven por varias semanas. Los patos salvajes, la golondrina del mar (*Sterna hiru-do*), el pufino (*Puffinus pacificus*) y otras aves migrantes, son un reservorio viral enorme y muy dinámico¹ (figura 13).

De las aves silvestres, el virus A se transmite a los pollos, patos y gatos domésticos, causando infecciones leves hasta epizootias masivas con mortalidad de 70%. El pato doméstico actúa, en cierto modo, como el caballo de Troya, porque cuando está infectado no muestra signos de la enfermedad, pero sí elimina por las heces cantidades enormes del virus hasta por 17 días; de esta manera, suele pasar el contagio a las aves de corral y a los cerdos, principalmente en las atestadas granjas de China continental, donde se acostumbra mantener criaderos de patos, pollos y cerdos en hacinada convivencia. Históricamente, el virus H1N1 brotó en 1918-1919 causando la mortífera «influenza española» con más de 50 millones de defunciones registradas. La pandemia se abatió a partir de 1920, pero el virus A que procedía del linaje aviar milenario continuó circulando hasta 1957, cuando ya resultó el H2N2 influenza asiática y mató un millón de personas; luego, en 1968, el H3N2 de Hong Kong con 0.5 millones de muertos. En 1977, cuando todavía circulaba el H3N2,

reapareció el H1N1 y ambos han circulado conjuntamente hasta el 2009.

En 1968, cuando ocurrió la última gran pandemia, China tenía una población humana de 790 millones de habitantes, la población porcina era de 5.2 millones y de pollos 12.3 millones; para 2009 esas poblaciones en crecimiento eran de 1,300 millones, 508 millones y 13,000 millones, respectivamente; cambios semejantes ocurrieron en la India y el Sureste Asiático; en ese lapso creció el comercio internacional, lo mismo que el mercado de pollos y cerdos vivos, transportados y vendidos dentro de jaulas sucias, en los mercados húmedos, desaseados y mugrientos. Añádase también el incremento exponencial del transporte aéreo, terrestre, fluvial y marítimo; se ha generado así un gran hacinamiento de animales y humanos en condiciones de pobreza extrema, circunstancias que seguramente facilitarán la propagación de los virus de la influenza, provista de grandes habilidades para la supervivencia. El virus A puede infectar también otras especies aberrantes como perros y gatos domésticos, caballos, monos, ballenas, y focas.

En los laboratorios de investigación se acostumbra infectar experimentalmente a hurones, cobayos y ratoncillos normales y transgénicos; el virus B sólo se ha recuperado de los humanos y en una foca (*Phoca vitulina*) con síntomas respiratorios; con serología se confirmó la infección en otras 600 focas de Holanda. En Rusia se aisló el virus A de las ballenas *Balaenoptera acrostrata* y en las focas *Callosrhinus ursinus*. En el invierno de 1979-1980, en la Península Cape Code, Estados Unidos, hubo mortandad inesperada de la *Phoca vitulina*; en los pulmones y cerebros de los animales muertos se aisló el virus A (H7N7), capaz de multiplicarse también en pollos y pavipollos, sin causarles signos de enfermedad. En el laboratorio, los hurones, los gatos y los lechones se infectaron silenciosamente, aunque el personal en contacto con las focas sí se enfermó de conjuntivitis viral.¹⁶

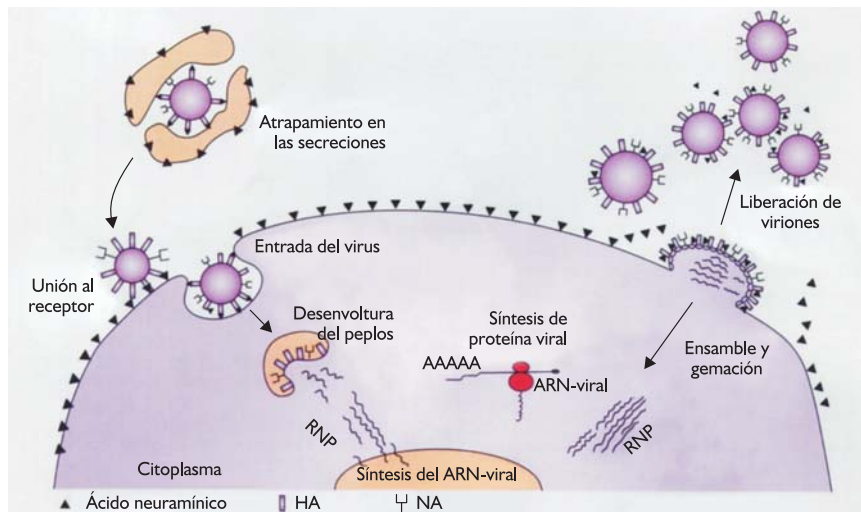


Figura 10. El proceso de replicación viral implica: reconocimiento del sialorreceptor; partición proteolítica de hemaglutinina (HA), síntesis del ARN y de las proteínas virales. La liberación de los viriones no agregados es la función principal de la neuraminidasa.

12

Figura 11. Corte ultramicroscópico de células VERO infectadas experimentalmente con virus A (H1N1). Obsérvese las dos vesículas submembranosas con tres viriones (V) gemantes. La porción MV lleva los gránulos de la replicación activa. (ME; 200,000X).

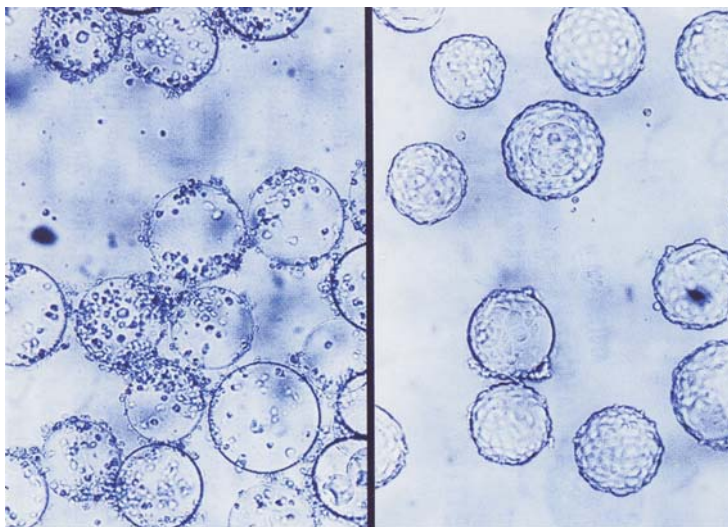
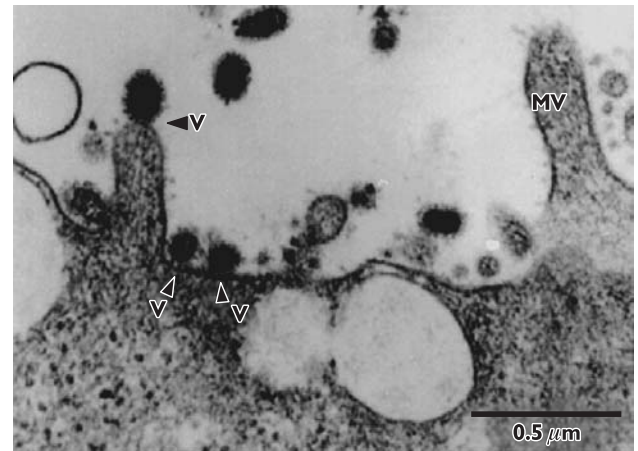


Figura 12. Derecha: células VERO no infectadas de forma esférica. Izquierda: células infectadas con virus A (H1N1); se ven hinchadas y con superficie más lisa, recubiertas por granulaciones gemantes y virogénicas. (Tinción azul de metileno, 300X).

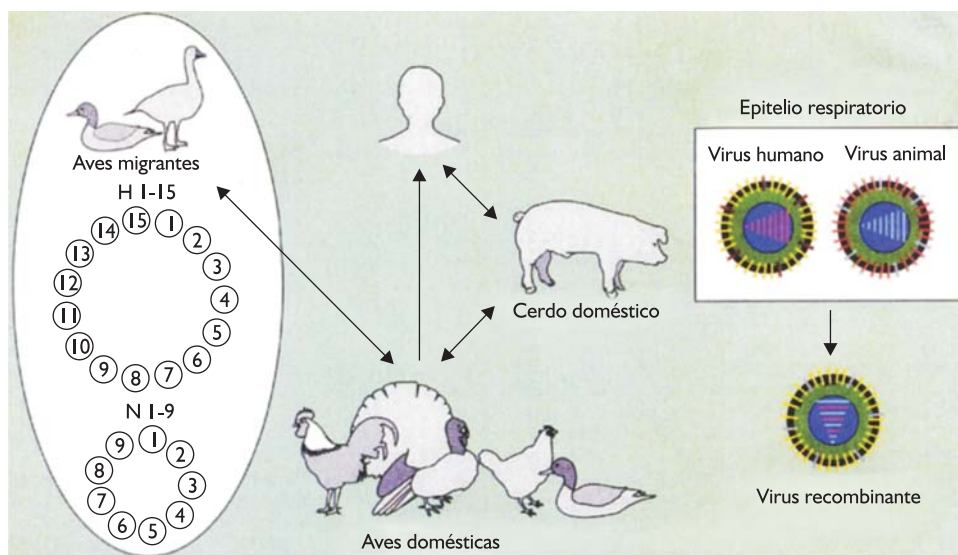


Figura 13. Las aves acuáticas son el reservorio natural de los virus influenza A, transmitiéndose a las aves domésticas y a los mamíferos. La coinfección de una cepa humana con otro animal dentro del cuerpo de un cerdo generará un virus genéticamente «nuevo» o *recombinante* (recambio de genes).

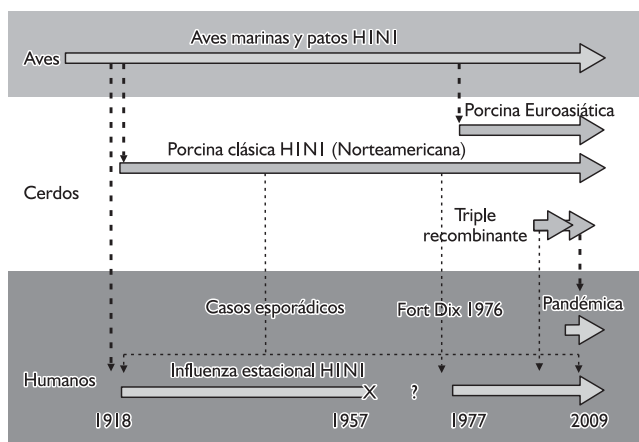


Figura 14. Génesis y evolución del virus A (H1N1) en las aves y en los cerdos. El virus ancestral A (H1N1) de origen aviar primario se adaptó en los cerdos de Norteamérica y Euroasia. La variedad estacional humana desapareció en 1957 y volvió a rebotar en 1977 hasta 2009.

¿Cómo sobrevive y se adapta el virus de la influenza?

Los ARN virus como los de la influenza, que tienen el genoma flexible y fragmentado en ocho segmentos, son semejantes a un equipo de fútbol: los buenos jugadores trabajan en grupo, pero, de vez en cuando, se van con otro equipo, y dejan libre su lugar que es rápidamente ocupado

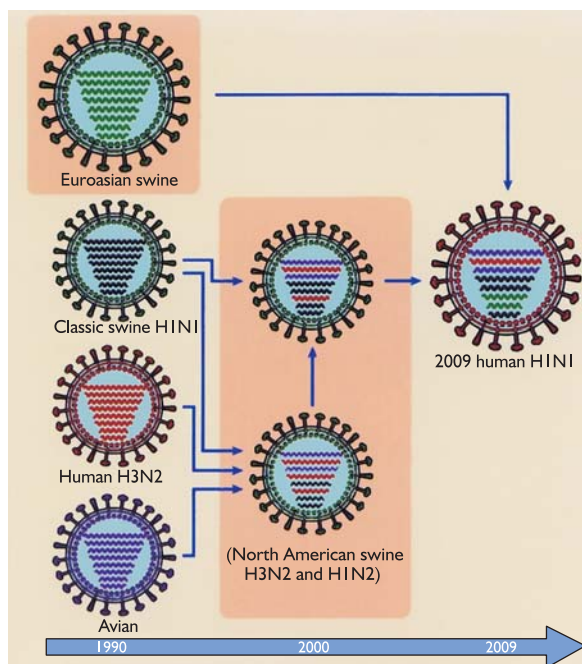


Figura 15. Recombinación genética y evolución del virus de la influenza A (H1N1) registrada en Norteamérica. El neotipo influenza-porcina A (H1N1) 2009 brotó en México y Estados Unidos, es triple recombinante aviar-porcino clásico-porcino Euroasiático. Segmentos de arriba abajo: PB₂, PB₁, PA, HA, PN, NA, PM y N₅. La cepa tiene potencial pandémico.

por otros jugadores (genes) nuevos más o menos eficientes, de este modo, se genera la diversidad genética. El proceso se facilita cuando dos genotipos virales distintos coinfectan al mismo hospedador (cerdo); y en el animal infectado los ocho genes de cada virus se mezclan dentro de una célula, intercambiando sus lugares; el neotipo resultante del ensamblaje tiene propiedades y habilidades diferentes a las de las dos cepas madres (figura 13). Las cepas híbridas pueden acarrear los genes procedentes de aves, cerdos y humanos. El cerdo coinfectado actúa como un gran «vaso mezclador de los genes»;¹⁷ pero además, en los últimos 80 años, los cerdos han actuado como reservorios naturales de los virus H1N1 y H3N2, las cepas porcinas mantenidas en Norteamérica sufrieron mutaciones y fueron cambiando a través del tiempo, de tal modo, se diferenciaron totalmente del linaje H1N1 porcino Euroasiático.¹⁸ El virus H1N1 procedente del linaje aviar que causó la pandemia de 1918-1919, es como el equipo de Barcelona, cambia los jugadores siempre, pero el equipo queda. Este cambio mayor o «shift» (reordenamiento o desplazamiento genético) lo llamaron *recombinación* de genes, debe diferenciarse de los cambios genéticos más pequeños, «drift» o *deriva* antigénica, que ocurren principalmente durante el periodo interpandémico y resultan del acúmulo progresivo de mutaciones puntuales, dando por resultado pérdida, ganancia o modificaciones en la composición de los aminoácidos (aa) integrantes de alguna macromolécula; la mutación suele ser puntual o en conglomerado, afectando principalmente las glicoproteínas superficiales. El proceso *recombinación-deriva* natural es imparable; por eso, el virus A (H1N1) es tan duro de vencer: continuamente cambia de hospedador, se adapta y muta, evade así la respuesta inmune y, a veces, aumenta su capacidad de replicación o la virulencia, y la epidemia o epizootia resurgen periódicamente, sobre todo durante la estación más fría del año (virus estacional).^{19,20}

La transmisión interespecies es relativamente infrecuente, dándose entre animales relacionados cercanamente como pollos y pavos, aunque ocurre también del pato silvestre (orden *Anseriformes*) al pavo doméstico (orden *Galliformes*), o los cerdos estabulados en condiciones de hacinamiento. En Hong Kong se demostró el contagio de los pollos enfermos a los humanos, aunque la cadena de retransmisión humano-humano se ha limitado por ahora.

Los virus porcinos epizooticos pueden infectar a los cuidadores de cerdos, situación demostrable por encuestas seroepidemiológicas. En 1931, Robert Shope logró transmitir el agente filtrable obtenido de puercos gripiertos a los cerdos y lechones sanos; más tarde, demostró que los sueros de las personas mayores de 12 años protegían al ratón contra la infección experimental por el virus aislado H1 cerdo N1 y elaboró la brillante hipótesis de que el virus porcino tenía similitud importante con el causante de la feroz pandemia humana de 1918-1919. Los estudios moleculares recientes han respaldado el trabajo fructífero del Dr. Shope.²¹⁻²⁴

La adaptación viral es un proceso complejo: A) Reconocer al receptor nuevo en el hospedador, B) Modificaciones del tropismo celular y quizá del mecanismo de transmisión, C) Capacidad de replicarse con rapidez suficiente, sin esperar la respuesta inmune adquirida. El virus A (H1N1) del linaje aviar rompió las barreras y se adaptó atacando a cerdos y humanos, pero además logró persistir por un proceso de renovación genética.²⁵

El papel de los cerdos domésticos

La influenza porcina clásica brotó en la región Centro-Occidental de los Estados Unidos en 1918. En el cuatrimestre último de ese año se enfermaron y murieron miles de cerdos; a partir de entonces, hubo brotes anuales causados por el sub-

tipo H1N1 (HcerdoN1). En estudios recientes se demostró la persistencia de la enfermedad enzootica en Hong Kong, Singapur y China continental, aunque la cepa original sufrió una reacomodación antigénica (1930-1977). A partir de 1968-1969, floreció el virus A (H3N2) aislado en Taiwan en 139 cerdos examinados, pero con virulencia baja. Otro hecho interesante es que el virus H3N2 fue aislado en los cerdos de Hong Kong en 1976, después de varios años que había desaparecido de la especie humana. En conclusión: se estableció un reservorio H1N1 Euroasiático porcino; con el examen genoviroológico se demostró que las cepas de los cerdos sufrieron cambios antigénicos distintos y menores a los circulantes en los humanos. Se concluyó también que la cepa A/cerdo/Hong Kong/3/76 era semejante a la que circuló entre los humanos en 1968. En 1979, en cerdos de Bélgica se aisló el tipo H1N1, relacionado antigénicamente con el virus aviar HcerdoN1 encontrado en los patos silvestres. Esta información indica que los cerdos pueden ser infectados tanto por los humanos como por los patos silvestres; en Euroasia las cepas porcinas forjaron un linaje aviar distinto del existente en Norteamérica (evolución divergente).¹⁷⁻²¹

Se había dicho que la enfermedad porcina era poco contagiosa para los humanos; sin embargo, en enero de 1976 se registró un brote respiratorio en los soldados que regresaban a la base militar Fort-Dix en New Jersey. La causa de la epidemia fue un virus porcino nuevo H1N1 A/New Jersey/76, con evidencia serológica de 230 casos y una defunción; la epidemia se mantuvo activa por cinco semanas. Dada la caracterización precisa de los militares y el agente causal, se inició una investigación detallada: el número reproductivo (R_0) se mide por las infecciones causadas por una persona atacada que se introduce en una población totalmente susceptible. El R_0 estimado para Fort-Dix fue 1.2, sustancialmente menor que lo calculado para las pandemias y brotes estacionales que ha fluctuado entre 1.8 y 2.0. Una vez que el virus

saturó el contagio entre los contactos sociales estrechos de los militares afectados, el potencial de transmisión fue insuficiente para encender una epidemia mayor en la población civil. El brote se extinguió, pero al haber cundido la alarma se implementó un programa de vacunación masiva con 40 millones de civiles vacunados y 532 casos del síndrome de Guillain-Barré (complicación rara y excepcional de la vacuna contra la influenza) y 32 defunciones postvacunales.²¹ El virus A (H1N1) humano dejó de circular en 1957 y la influenza porcina reconocida en Fort-Dix como H1N1 nunca se extendió fuera del contexto militar; sin embargo, en noviembre de 1977 reapareció el H1N1 misteriosamente en la antigua Unión Soviética, Hong Kong y en Tianjin al norte de China, afectando gente joven, con síntomas y evolución leves. La investigación genética cuidadosa de las cepas aisladas permitió reafirmar su afinidad molecular con las estudiadas en 1950, pero francamente distinta a las cepas A (H1N1) de 1947 y 1957. Esto sugiere que la cepa del brote de 1977 estaba guardada en algún laboratorio desde 1950, pero logró escaparse afectando a la población que tenía poca inmunidad contra los antígenos H1 y N1 (figura 14); por ello, en el mundo actual hubo y hay una cocirculación duradera del H3N2 (subtipo dominante) con el H1N1 (subtipo del regreso).^{22,23} La lección aprendida es clara: A) Los brotes nuevos no siempre son pandémicos, pero deben seguirse con atención, B) El laboratorio de genética molecular viral es indispensable, y muy útil, para diagnosticar con precisión y seguir de cerca la evolución natural de los virus circulantes, C) Aunque la vacunación es protectora y muy recomendable, deberán aplicarse las vacunas más seguras, midiendo siempre los efectos postvacunales indeseables observados. México no tiene ningún laboratorio de genética viral molecular, tampoco cuenta con laboratorio propio capaz de producir buenas vacunas y el Departamento de Vigilancia Epidemiológica Nacional tiene un presupuesto raquítico e insuficiente para cubrir las

necesidades que la población requiere y demanda. Haga usted sus propias conclusiones.

En Norteamérica, en el decenio 1999-2009 circularon simultáneamente los subtipos siguientes: porcino clásico H1N1 y humano estacional H1N1, junto con el dominante H3N2 de humanos y de cerdos, además de los varios subtipos aviáres norteamericanos, aunque en el Lejano Oriente y Europa continuaba su evolución independiente la cepa porcina H1N1 del linaje aviar Euroasiático.²⁴⁻²⁶

En 1998, en los Estados Unidos ocurrió una epizootia porcina muy contagiosa, febril y con aborto fetal espontáneo. En las muestras procesadas por el laboratorio se aislaron dos genotipos distintos: la recombinación doble del virus porcino H1N1 con el humano estacional H3N2. El segundo subtipo H1N2 resultó ser triple recombinante (TR), que contenía tres proteínas derivadas del humano H3N2 (PB1, HA y NA), tres péptidos «importados» del porcino clásico H1N1 (NP, M, NS) y dos más donadas por el aviar americano (PB-2 y PA). El TR se diseminó por las regiones porcícolas de los Estados Unidos, con potencialidad baja para transmitirse en los humanos.^{26,27}

En abril de 2009, en México se identificó un genotipo nuevo del A (H1N1); para el 25 de mayo había causado un brote explosivo, habiéndose diseminado por 43 países con 12,515 casos notificados y 91 defunciones (potencial pandémico).²⁸⁻

³⁰ Los genes del complejo polimerasa, la hemaglutinina, la nucleoproteína y las proteínas no estructurales mostraron alta similitud con el virus porcino H1N2 aislado previamente en Norteamérica en la década de los 90, y son descendientes del TR-H3N2 también norteamericano (*figura 14*). Se han propagado por el mundo infectando también a los humanos; sin embargo, los genes codificados de la neuraminidasa (NA) la proteína matriz (M) están lejanamente relacionados con el virus porcino del linaje aviar Euroasiático²¹⁻³⁰ (*figura 15*). La NA en particular guarda gran seme-

janza (94.4% en la composición de los nucleótidos) con el de la influenza porcina europea de 1992. En los años pasados, gracias a un gran esfuerzo internacional, se logró recolectar 46,000 secuencias de nucleótidos encontradas en los virus A depositados en el *Influenza-Virus-Resource* del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU). Hasta mayo 25 de 2009 se disponía ya de 220 neoaislamientos del virus «porcino» A (H1N1) encontrado en México, Estados Unidos, Canadá y otros países; por eso ha sido factible estimar la frecuencia y proporción de los nucleótidos alineados como un modo práctico de medir la similitud molecular. Con este rico banco de información genética se ha podido identificar con prontitud y precisión 98% de los virus humanos depositados, pero sólo 71% de los aislamientos porcinos. Desafortunadamente, no existe ningún depósito de Oceanía, África o Sudamérica; por esta razón, se ha dificultado rastrear la procedencia de algunos neotipos epidémicos. La vigilancia con apoyo del laboratorio modernizado y el envío de las cepas aisladas son el modo único para prevenir y diagnosticar la impredecible influenza.²⁷ El tipo viral causante de la pandemia de 2009 ha sido llamado *swine-origin influenza virus* (S-OIV) y se acostumbra siglarlo así: A (H1N1) S-OIV. El término «porcino» causó mucha polémica en México y daños económicos a la industria porcícola, en realidad es una mezcla de genes, producto de la cuarta generación del virus H1N1 de 1918.²¹

En 1981, Ramírez Soto M logró aislar el virus de la influenza porcina H1N1 en una granja de cerdos en el estado de Puebla, México;³¹ y en 1985, AE Cortez examinó 100 pulmones con neumonía de cerdos del Rastro, habiendo demostrado títulos de hemaglutinación contra la influenza H1N1 en 20% de las muestras examinadas.³² En el Rastro de Ferrería de la ciudad de México, se realizó un muestreo en los sueros obtenidos de 948 cerdos procedentes de Jalisco, Michoacán, Sonora y Guanajuato, contra el antígeno

HcerdoINI Iowa; hubo 601 cerdos con títulos de 1:10 (63.40%), pero sólo 192 (20.25%) presentaron títulos 1:80 o mayores.³³ En 2004, el Dr. Álvarez-Fleitez M y colaboradores investigaron la seroprevalencia de los anticuerpos contra el virus de la influenza porcina H1N1 y H3N2 en 25 granjas porcícolas del estado de Yucatán (cerdos de engorda); contra el virus A/cerdo/England/163266/87 (H3N2) resultaron positivos 65.1% y contra A/cerdo/Ia/73 (H1N1) 8.3%, ambos grupos con título de 1:80 o más, con un total global de 56% cerdos seropositivos; es decir, en México circulaban cuando menos dos tipos de virus porcinos que potencialmente podrían recombinarse,³⁴ aunque la información deberá completarse en el futuro con un seguimiento longitudinal de los cerdos, de sus cuidadores y de la población rural que tiene convivencia cercana con esos animales.

Influenza aviar H5N1 con infecciones en humanos

En 1996 en la provincia china de Guandong se aisló el virus aviar A (H5N1), que había matado algunos gansos domésticos. Este brote recibió poca atención. En mayo de 1997, provocó otra epizootia mortífera acaecida en los pollos de los mercados en Hong Kong; atacó luego a 18 personas, con seis defunciones ocurridas en la ciudad y fue necesario sacrificar a todos los pollos y hacer limpieza exhaustiva de mercados y sitios de embarque para detener el brote; el virus continuó circulando silenciosamente en la población de patos de las provincias costeras de China.^{35,36}

Después de un breve respiro, atacó a los cisnes y gansos silvestres del lago Qin Hai, propagándose hacia Rusia, Turquía, Egipto, Djibouti y la India. Otra epizootia iniciada en la provincia china de Hunan alcanzó Indonesia. Hubo brotes también en Tailandia, Cambodia, Vietnam, Corea del Sur y Japón, extendiéndose por 60 países; se ha estimado que murieron o fueron sacrificados 230

millones de pollos. En los humanos se registraron cerca de 394 casos con 248 defunciones; 90% de los afectados tenían menos de 40 años de edad, con ataque máximo del grupo entre 10 y 19 años. De seis embarazadas afectadas, cuatro murieron y dos tuvieron abortos espontáneos.^{1,37-41}

Los factores de riesgo más importantes fueron: haber manejado pollos enfermos o muertos durante la semana previa al inicio de la enfermedad y, la convivencia con patos y gansos dentro del hogar. Otros riesgos potenciales son: matar, desplumar o preparar pollos para cocinarlos, manejar gallos de pelea o patos de aspecto sano, consumir carne de pollo mal cocida. Un pequeño brote comenzó después de haber desplumado un cisne silvestre muerto. Se comprobó también la capacidad del virus H5N1 para infectar gatos y perros domésticos.

Las epidemias investigadas ocurrieron en grupos familiares con ataque de dos a tres personas, la infección fue adquirida casi siempre de una fuente aviar, aunque también se pudo documentar el contagio de un paciente con enfermedad grave a otro humano sano. Varios de los enfermos atacados tuvieron diarrea, que precedió a los síntomas respiratorios, y el virus se aisló en las heces; por ello, las secreciones respiratorias y los líquidos corporales, incluso las heces, deben considerarse potencialmente infecciosas. La causa de la muerte fue la neumonía fulminante, el virus se demostró en gran cantidad dentro de los neumocitos alveolares tipo 2, los macrófagos y el epitelio traqueal; en las muestras de exudado faríngeo y aspirados traqueales de los humanos infectados, había títulos virales muy altos.

Los virus aislados y tipificados se dividieron en dos clases: 1 y 2, con varias subclases. Al inmunizar los hurones con la clase 1, no se obtuvo la protección contra la clase 2, por eso las vacunas propuestas deberán ser preparadas con una mezcla de las dos clases circulantes. Japón y Corea del Sur erradicaron el virus, poniendo en vigor la cuarentena, matando las parvadas de pollos y con

medidas de bioseguridad en las granjas. En Vietnam, la estrategia fue inmunizar todos los pollos con la vacuna inactivada en emulsión oleosa: no hubo casos humanos adicionales ni brotes en los pollos; pero, en septiembre de 2006, el virus H5N1 reapareció en los patos y gansos del país. También en Hong Kong la vacuna aviar se usó desde 2004, aplicándola a todos los pollos del mercado, sin haberse registrado casos nuevos. Por tanto, la vacuna de buena calidad sí protege los pollos y, de modo indirecto a los humanos, aunque probablemente no sea útil para las aves acuáticas. En Turquía, Iraq y Egipto los brotes se dieron en los meses más fríos, pero en el sureste asiático tropical hubo picos de actividad viral múltiples durante los meses calientes y lluviosos. Dado que el virus es endémico en las aves migratorias a las que no mata con rapidez, será inevitable el contagio de los pollos y pavos domésticos, con casos humanos intermitentes; pero al continuar su evolución natural podrían generarse cepas antropófilas virulentas y se desataría otra pandemia catastrófica. Es necesario y ventajoso mantenerse alerta y vigilante con apoyo de laboratorios de diagnóstico bien equipados, con medidas de bioseguridad tipo 3 y con un equipo interdisciplinario de salud motivado y siempre al día. La alarma movilizó a Hong Kong nuevamente en febrero 2003, hubo dos casos humanos y una defunción; la familia atacada había viajado recientemente al sur de China (brote importado).

En febrero de 2003, se aisló el virus aviar H7N7 en Holanda; causó la muerte de un veterinario y 83 casos de conjuntivitis autolimitada. En 1999, en Hong Kong se identificó el virus H9N2 en dos casos humanos, y otro más registrado en diciembre de 2003. Sin duda, los virus aviares guardan muchos secretos y sorpresas. El *cuadro II* enlista diez brotes de virus aviares en humanos registrados entre 1995 y 2004.

El conocimiento disponible referente a la influenza en los animales es poco y está fragmentado. Además, no existe un sistema establecido para

Cuadro II. Brotes de influenza aviar registrados en humanos.

Año y país	Virus causal	Designación oficial
1995, Reino Unido	H7-N7	A/ENG/268/95
1997, Hong Kong	H5-N1	A/HK/156/97 A/HK/148/97
1999, Hong Kong	H9-N2	A/HK/1073/99
2003, Hong Kong	H5-N1	A/HK/213/03
2003, Países bajos	H7-N7	A/NETH/33/0 A/NETH/219/03
2003, Hong Kong	H9-N2	A/HK/2018/03
2004, Vietnam	H5-N1	A/VN/1203/04
2004, Tailandia	H5-N1	A/THA/16/04
2004, Canadá	H7-N3	No disponible
2004, Egipto	H10-N7	No disponible

H5 y H7 se asociaron con infecciones respiratorias, H7 provocó sólo conjuntivitis.

la vigilancia permanente de las enzootias y epizootias registradas en aves, cerdos y otras especies silvestres, comparable con la bien organizada Red de Vigilancia Global de la Influenza (GISN) humana, aunque en los últimos años se ha insistido en la necesidad de forjar una «librería genómica» generada con el análisis genético - molecular y epidemiológico combinados, a fin de poder adelantar la predicción de las pandemias. El ejemplo del Dr. R Shope debería ser capitalizado por los veterinarios y zootecnistas interesados.

Cuadro clínico y complicaciones

En adultos, la influenza se manifiesta con fiebre de inicio brusco, escalofríos, acompañados de cefalea y dolor de garganta, mialgias, malestar, anorexia y tos seca. La temperatura 38-40°C aumenta en las primeras 24 horas y dura de uno a cinco días. Los signos más frecuentes son: enfermo con aspecto decaído y anérgico, piel caliente y húmeda, cara congestionada, ojos inyectados, mucosas hiperémicas y exudado nasal claro. Sin embargo, las manifestaciones clínicas registradas

variaron en función de la edad; además, algunas molestias se presentaron selectivamente en cierto grupo etario, por ejemplo, los niños pequeños tienen un cuadro febril y catarral inespecífico, difícil de diferenciar del croup laríngeo, o de las enfermedades causadas por los virus respiratorio sincicial y los parainfluenza. En la infancia ha sido más frecuente: diarrea, náusea, vómitos, dolor abdominal y convulsiones febriles, mimetizando así la sepsis bacteriana.⁴²⁻⁴⁷ En las personas inmunocomprometidas, la duración del cuadro clínico se prolonga y el virus continúa replicándose por semanas o meses. En las pandemias de 1918 y 1957 se demostró un riesgo alto para mujeres en el segundo y tercer trimestre del embarazo por las complicaciones cardiorrespiratorias; los fetos sufrieron también por aborto, prematurez y daño residual.^{48,49}

La complicación más temida es la neumonía viral primaria fulminante, con letalidad alta. La fiebre de 38°C o más genera tos seca, seguida por esputo espumoso y hemoptoico, taquipnea, estertores finos bilaterales, cianosis e insuficiencia respiratoria. La placa posteroanterior de tórax muestra opacidades neumónicas e infiltrados perihiliares y basales, con avance lesional rapidísimo (cinco a seis horas) (figura 16). La invasión bacteriana secundaria se sospecha por reinicio del cuadro febril y la tos productiva con esputo purulento; las bacterias aisladas del esputo o lavado bronquial con más frecuencia son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y los estreptococos del grupo A beta hemolíticos. La influenza suele exacerbar la bronquitis crónica de los fumadores o de la fibrosis quística y poner en crisis a los enfermos asmáticos.^{50,51}

Las complicaciones neurológicas descritas son: síndrome de Reye y edema cerebral, con aumento de la presión en el líquido cefalorraquídeo (LCR), pero la cuenta celular y la bioquímica son normales, más degeneración grasosa del hígado, principalmente en aquellos enfermos tratados con

aspirina. Se ha descrito también desorientación temporoespacial, encefalopatía, mielitis transversa y síndrome de Guillain-Barré; cuando menos en dos reportes publicados se comprobó presencia de ARN viral en el líquido cefalorraquídeo de los enfermos encefalíticos.^{52,53}

El *S. aureus* de la neumonía suele provocar choque tóxico.⁵⁴ Se dice que la miositis ha sido más prevalente con la influenza B infantil; a veces, el ataque rabiomiolítico del gastronemio y del músculo soleo llegan a impedir la marcha del niño atacado, con elevación simultánea de la creatín fosfoquinasa; rara vez se ha descrito miocarditis e insuficiencia renal, acompañadas por elevación sérica de la troponina T, aspartato-aminotransferasa, alanina-aminotransferasa.⁵⁵⁻⁵⁷

El diagnóstico de laboratorio

Los métodos disponibles se agrupan en cuatro categorías: aislamiento del virus (AV), detección rápida de proteínas (DP), detección de ácidos nucleicos (DAN) y serodiagnóstico (SD). Las muestras clínicas se toman por hisopado nasofaríngeo y de la garganta, enfatizándose la necesidad de la recolección y manejo apropiado del material muestreado.⁵⁸⁻⁶⁰

El estándar de oro es el aislamiento viral. El virus cultivado sirve para el análisis genético antigénico, aunque el resultado es tardado y no ayuda para instalar el tratamiento antiviral. Algunos laboratorios prefieren el cultivo rápido: la muestra clínica es centrifugada sobre la monocapa celular, se fija a las 24-48 horas y se tiñe por inmunofluorescencia.

Las pruebas para detección rápida de proteínas (DP) son rápidas y fáciles de realizar (cuadro III); son menos sensibles que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el cultivo, pero el resultado estará disponible en una hora. Este método puede aplicarse en los laboratorios pequeños, en el Servicio de Urgencias o junto a la cama del enfermo; sin embargo, la confiabilidad

es variable según la estación y la cepa de virus circulante (*cuadro III*).

La detección de ácidos nucleicos (DAN) hace referencia al ARN viral detectado por transcripción reversa, seguida por PCR, usando los oligonucleótidos iniciadores (primers), seleccionándolos de acuerdo al tipo o subtipo viral circulante; puede incluirse también el iniciador del virus respiratorio sincicial. Este método es muy sensible, permite diagnosticar el virus no viable, aunque deberá trabajarse con cuidado para evitar la contaminación de la muestra y se requiere personal bien capacitado y certificado (calidad técnica).⁶⁰

Para el serodiagnóstico se necesitan dos muestras de suero pareadas, colectando la primera durante la fase aguda y la segunda 10 a 14 días después. Los títulos de anticuerpos pueden ser medidos mediante inhibición de la hemaglutinación, ensayo inmunoenzimático (ELISA), fijación del complemento o neutralización. Los títulos medidos de las dos muestras se consideran significativos cuando la diferencia sea de cuatro veces. Es método tardado y se aplica principalmente en las encuestas seroepidemiológicas.

La elección del método se complica por las consideraciones del coste, sensibilidad y especificidad. El aislamiento no puede dejarse de lado, porque las cepas o clades identificadas,

podrían servir para incluirse en la preparación de las vacunas.⁶¹

En una investigación de niños con fiebre, tos, escurrimiento nasal, mialgias, cefalea y malestar hospitalizados en Urgencias, se les tomó un hisopado nasofaríngeo (sensibilidad 83-96%) y especificidad (64-76%), y se aplicó el método rápido Flu OIA con lectura visual. Hubo 202 enfermos positivos, que al azar se dividieron en dos grupos: a) el médico sí conoció de inmediato el resultado positivo y b) el pediatra tratante no conoció el resultado positivo. Los médicos del primer grupo redujeron significativamente el número de otras pruebas de laboratorio y radiografías ordenadas, prescribieron menos antibióticos innecesarios, indicaron rápidamente un tratamiento antiviral y la estancia hospitalaria del enfermo se acortó. Hubo ahorro de recursos y mayor efectividad terapéutica. Debe considerarse que los niños con influenza desarrollarán otitis media en 20 a 42% de los casos; el pediatra frente a un niño febril en mal estado debe descartar las bacteriemias, otras neumonías, meningitis e infección urinaria, y se requiere de otras pruebas más costosas y tardadas. La prueba para detección rápida de proteínas (DP) no es una panacea, pero sí una opción más para los médicos que trabajan en lugares pequeños o en hospitales muy atareados y recargados por enfermos febriles.

Cuadro III. Pruebas de diagnóstico rápido disponibles para la influenza viral.

Prueba tipo nombre viral	Fundamento técnico	Método	Tiempo/núm. de datos	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
*Directigen A flu A	El antígeno se une al anticuerpo pegado sobre un filtro	ELISA	15 min/8	67-96	88-97
*Zstaflu A y B	Neuraminidasa que rompe el substrato cronogénico	Ensayo colorimétrico	30 min/4	62	99
*Blostar A y B	Ag se une cubierto por anticuerpos, alterándose la densidad óptica del medio	ELISA óptico	17 min/7	62-88	52-90

*Es dependiente del tipo de muestra procesada y del virus circulante.

El sistema broncopulmonar defensivo

Los capilares del alvéolo pulmonar son separados del aire intraalveolar por una interfase delgadísima menor a 1 μm . En la inflamación aguda, el volumen de la sangre atrapada puede aumentar hasta 50 veces y se acumula una reserva enorme de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PNN) marginados, listos para migrar hacia el saco aéreo por diapédesis (*figura 17*). Elie Metchnikoff los llamó micrófagos «células defensivas *par excellence* contra los microorganismos». Después de fagocitar bacterias las matan por medio del oxígeno reactivo, por ejemplo hipoclorito, además de ciertas proteínas microbicidas que inducen la permeabilidad bacteriana, lactoferrina, elastasa y la llamada «malla extracelular de cromatina» (MEC) empapada por productos antibacterianos, cuya función es entrapar las bacterias extracelulares, matándolas. El plasma es un líquido rico en anticuerpos naturales, complemento, proteína C reactiva y pentraxina 3; estas sustancias tienen poder opsonizante, bacteriostático y microbicida.⁶² El volumen del plasma intersticial es regulado por acción combinada del flujo transcelular y pericelular, con la participación armónica del endotelio y el epitelio de revestimiento intraalveolar, íntegros. Cuando los neutrófilos bajan (neutropenia) o hay defectos en la calidad de la fagocitosis (como es el caso de la enfermedad granulomatosa crónica) el enfermo sufre infecciones oportunistas, más frecuentes cuando se dan también las deficiencias del complemento o las inmunoglobulinas y en la linfopenia crónica (síndrome de inmunodeficiencia adquirida).⁶²

Las células centinela del pulmón

Dos poblaciones de células mieloides se han especializado como centinelas: los macrófagos alveolares y las células dendríticas, ambas están

provistas de «receptores de reconocimiento» existentes sobre las membranas celulares. Los macrófagos regularmente patrullan y limpian los alvéolos, y dan señales de alarma cuando el pulmón es invadido. Esas señales pueden bloquearse por medio de las cabezas globulares del surfactante A y D unidas sobre los receptores del macrófago. En la influenza, el virus se liga con las cabezas del surfactante y la mezcla es presentada como las colillas de la colágena oligomerizada, poniéndose en marcha el proceso inflamatorio. Los macrófagos se aquietan también en presencia del factor transformante del crecimiento beta, acarreado y presentando por las integrinas del epitelio. El virus de la influenza A se multiplica dentro de los epitelios, provocando apoptosis rápida, activándose la respuesta proinflamatoria en cadena.

Las células dendríticas están distribuidas por el árbol respiratorio bronquiolar, acantonadas entre los epitelios de los bronquiolos extendiendo las prolongaciones sensoras dentro del moco bronquial, así captan y procesan las micromuestras movidas por el aparato ciliar. En la neumonitis por influenza, las células dendríticas migran hacia los alvéolos, los ganglios linfáticos regionales y otros tejidos. Básicamente su función es ser presentadoras de los antígenos, capaces de generar una respuesta inmune; poseen también «sensores virales de reconocimiento», y al activarse se aumenta la producción del interferón I; por tanto, la pérdida de dendrocitos o la interrupción en la producción del interferón debilitan el sistema defensivo y facilitan el avance de la neumonitis. Los macrófagos alveolares y las células dendríticas tienen capacidad limitada para destruir los microbios patógenos, pero son muy útiles como «sensores de alarma» capaces de transmitir la información a los linfocitos T, las células asesinas naturales (NKT) y los epitelios, activándolos; también pueden movilizar y reclutar neutrófilos, sacándolos de las capilares hacia el interior de los alvéolos.

Los virus y las bacterias neumopatógenas producen diversas moléculas activadoras de los «re-

ceptores de reconocimiento», generándose señales intracelulares múltiples; todas ellas convergen en una molécula central, como lo es el factor nuclear KB, presente en los epitelios y, a su vez, actúa como mediador en la transcripción de las moléculas de adhesión, las quimiocinas y el factor estimulador de la colágena, necesarios todos para iniciar el reclutamiento de los leucocitos polimorfonucleares y la respuesta proinflamatoria. Lo importante es que ciertos productos como la HA viral o la neumolisina del neumococo activan los receptores epiteliales convergentes hacia el FN-KB, y terminan agitando la respuesta inflamatoria, y cuando la cepa del virus de la influenza invasora es virulenta, la respuesta es más rápida y explosiva (figura 18).

La inmunidad innata del pulmón

22

Para iniciar el reclutamiento de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PNN) se requieren las adhesinas que les proporcionan señalización y «atracción»; las quimiocinas estimulan la quimiotaxis e influyen en la motilidad dirigida, mientras que los factores estimulantes de las colonias actúan sobre la médula ósea y facilitan la liberación y circulación inmediata de PNN.

El epitelio alveolar juega un papel defensivo estratégico. En los ratones transgénicos que no expresan el FN-KB, se ha observado poca síntesis de citocinas y quimiocinas; esta deficiencia genética compromete el reclutamiento de los PNN y la destrucción de los neumococos y estafilococos virulentos. El epitelio puede ser activado por la sola presencia del *S. aureus*; pero en la neumonitis neumocócica se requiere además la presencia de dos citoactivadores con efecto convergente: la interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α), ambos son producidos por el macrófago alveolar y también por los PNN. Por otro lado, los linfocitos T y las células NKT producen la interleucina 17 (IL-17) citoactivado-

ra; el proceso se aumenta cuando el macrófago induce la síntesis de la IL-23 (macrófago-linfocito T), aunque una subpoblación de NKT genera IL-15 sin ayuda de IL-23, al ponerse en contacto con los receptores específicos se activa FN-KB.

Los PNN no son el fin de la cadena; por el contrario, dentro de los alvéolos se activan, generando FNT- α e IL-1, quimiocinas y la quimerina activadora de las células dendríticas. En el caso particular de la neumonitis por influenza, los PNN son fuente de IL-2 citocina estimuladora de linfocito T, que a su vez amplifica la producción del interferón gamma antiviral. Sintetizan también la pentraxina 3 inmunoestimuladora. En síntesis: los PNN modelan y refuerzan la inmunidad innata y la adquirida; sin embargo, la estimulación violenta y excesiva del sistema FN-KB del epitelio ultrajado, es suficiente para inducir edema intraalveolar extenso, hipoxemia arterial y muerte; por tanto, la infección viral primaria grave seguida o no por una invasión secundaria por *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pneumoniae* suele conducir rápidamente al llamado síndrome del distrés respiratorio agudo, que paradójicamente ha sido más prevalente en los enfermos asmáticos, las embarazadas más jóvenes y sanas. Ciertos tipos de virus de la influenza A, como el responsable de la mortífera pandemia de 1918 y la cepa aviar A H5N1, que cursó con una letalidad mayor de 50%, parecerían ser virulentas para los humanos. De manera simplista, se ha dicho que tales virus generan una «tormenta de citocinas»; sin embargo, en los ratones del laboratorio infectados con H5N1 se demostró que la pérdida de los PNN aumentaba la mortalidad de los ratoncillos, demostrándose así que los neutrófilos hacían más beneficios que daños.^{62,63}

Estudios *post mortem* e histopatología

En las necropsias de los enfermos con neumonitis grave por influenza A se demostró que los

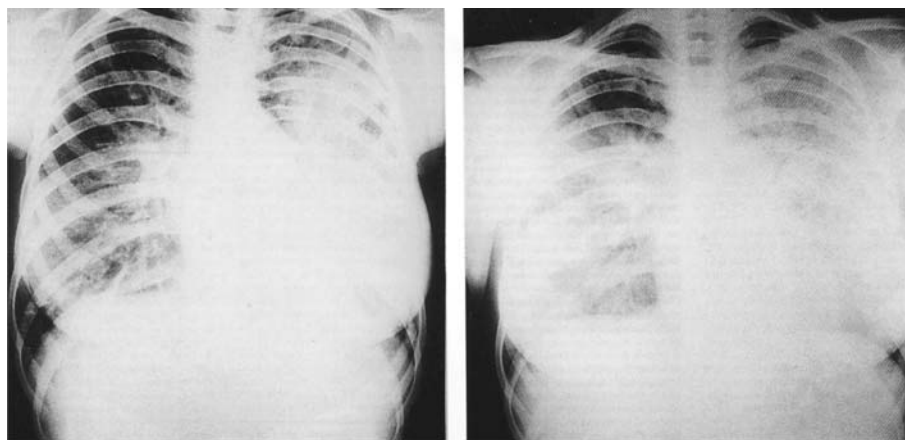


Figura 16. Neumonía primaria por influenza. Placa posteroanterior izquierda. Se observa infiltrado perihiliar bilateral y opacidad del lóbulo superior y basal izquierdo. Doce horas más tarde (placa derecha), aumentó la opacidad basal y del lóbulo medio derecho. Se aisló el virus A (H1N1).

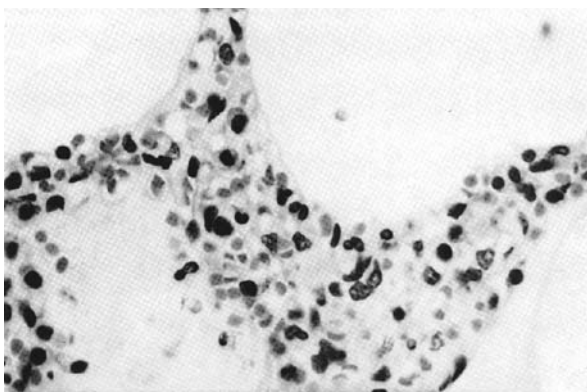


Figura 17. Influenza humana. La pared alveolar está engrosada con hiperemia, acúmulo de monocitos, linfocitos activados y polimorfonucleares comienzan a migrar hacia la luz del alvéolo. Estudio *post mortem* virus A (H1N1). (HE; 960X). Cortesía del Prof. J. Mulder, Universidad de Leiden, Países Bajos.

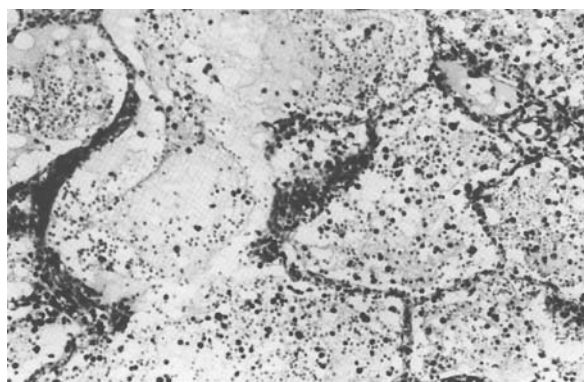


Figura 18. Influenza humana. Descamación y citólisis extensa del epitelio alveolar, alveolitis con macrófagos y linfocitos abundantes, edema con hemorragias, necrosis del tabique interalveolar con bandillas de fibrina (centro e izquierda). Neumonitis primaria fulminante por influenza A (H1N1)-1918. (HE; 240X). Cortesía del Prof. Maxwell Finland.



Figura 19. Neumonitis primaria por influenza. Corte del lóbulo inferior derecho. Pulmón hiperémico con petequias subpleurales. La porción más periférica y consolidada dejó escapar un líquido espumoso y hemorrágico. Enfermo de 24 años previamente sano, falleció a las 72 horas con cianosis y disnea intensas, pandemia A (H1N1)-1918. En el cultivo no se aisló ninguna bacteria patógena. Cortesía del Prof. Maxwell Finland.

pulmones eran más pesados de lo normal y estaban consolidados e hiperémicos; al corte, presentaron neumonitis bilateral y difusa, hemorrágicoedematosa, con zonas de color azul púrpura y focos de enfisema lobular; la tráquea y los bronquios estaban congestivos e hiperémicos sin exudado purulento. En los cultivos no se demostró coexistencia de bacterias patógenas. De modo general, parecerían haber sido afectados los lóbulos inferiores^{64,65} (figura 19).

En el estudio histológico se observó congestión intensa y necrosis del tabique interalveolar (daño alveolar difuso), con infiltrado intraalveolar e intersticial mixto compuesto por macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B activados; bronquiolitis con metaplasia escamosa y congestión pulmonar con grado variable de líquido edematoso y hemorragias focales. Los datos más llamativos fueron la apoptosis de las células epitelioalveolares y el infiltrado leucocitario; en un menor número de los fallecidos se registró presencia de membranas hialinas fibrinoides y acidófila, así como microtrombos intracapilares^{64,65} (figuras 20 y 21). En estudios recientes se demostró también disminución de linfocitos, y amígdalas con hemofagocitosis reactiva. Los enfermos neumónicos con viremia suelen sufrir miocarditis degenerativa, necrosis tubular aguda, rabdomiólisis y encefalitis.⁶⁶⁻⁶⁸

Los niveles excesivamente altos de macrófagos y neutrófilos activados, inducen la síntesis anormal de IL-6, IL-10 e interferón gamma, particularmente en aquellos enfermos de curso clínico fulminante y resultado fatal, en comparación con quienes sufren la influenza leve a moderada. De modo interesante, los niveles plasmáticos de las citocinas y quimiocinas liberadas se correlacionaron positivamente con la carga viral faríngea, lo que indica que la descarga hipercitosinémica posiblemente sea resultado de la replicación viral excesiva. *In vitro*, los macrófagos de los humanos y los pneumocitos epiteliales puestos en presencia del virus A H5N1 aviar mostraron mayor respuesta de citocinas secretadas, en comparación con el virus humano es-

tacional A H3N1, apuntalando el concepto de que la hiperinducción generada por los tipos más virulentos probablemente es la responsable de la hipercitocinemia⁶³ (figura 22).

En los ratones de laboratorio infectados por A H5N1 se observó que los animales con inducción genética deficiente de IL-6, de proteína inflamatoria del macrófago I-alfa o de factor de necrosis tumoral-alfa o sus receptores respectivos, tuvieron mortalidad semejante a la de los ratones silvestres intactos; pero los ratones incapaces de generar receptores de IL-1 presentaron mayor mortalidad global. El daño pulmonar mayor y más extenso probablemente resulta de los efectos de la multiplicación viral irrestricta, más la respuesta inflamatoria explosiva, inducida por los tipos más virulentos. Debe apuntarse también que la influenza debilita grandemente el sistema broncopulmonar defensivo, propiciando así la infección secundaria y tardía por los cocos Gram positivos más prevalentes y virulentos, como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, además de *Haemophilus influenzae* (bacilo Gram negativo). En todas las series estudiadas y publicadas, el número de muertes secundarias causadas por las infecciones bacterianas fue mayor que las atribuidas a las neumonitis por influenza primaria pura. La figura 23 corresponde a un caso *post mortem* de influenza A grave; en el cultivo de la secreción bronquial y del exudado purulento se aisló el *S. aureus* coagulasa positivo y resistente a la metilicina.⁶⁸ La mucosa traqueobronquial hemorrágica y necrótica estaba recubierta por coágulos amarillentos fibrinopurulentos y adherentes, dándole un aspecto granulado (figuras 23 y 24), estas lesiones eran más visibles en el tercio inferior de la tráquea y los grandes bronquios, y mucho más sobre las porciones cartilaginosas que en el espacio intercartílago, con edema pronunciado de la mucosa, hiperemia y hemorragias pulmonares focales. El estafilococo virulento penetra en los epitelios y forma abscesos, pero además, posee varias exotoxinas capaces de causar daños a distancia. Las cepas virulentas crecen y

forman masas grandes de cocos Gram positivos, distribuidas dentro del tejido pulmonar necrótico.

El neumococo posee una cápsula mucoide que lo protege parcialmente contra la fagocitosis. Además, la malla de cromatina antibacteriana producto del PNN es digerida por una ADNasa que rompe la red y libera la bacteria; por tanto, es otro factor de virulencia bacteriana, que le permite al neumococo diseminarse y causar la muerte de los ratones infectados. Muchos humanos no inmunizados acarrean los neumococos virulentos en la garganta, con cepas multirresistentes a los antibióticos y neumotropas, capaces de producir bacteriemias y meningitis de pronóstico grave. *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* son dos de los invasores secundarios prevalentes en los enfermos afectados por la influenza broncopulmonar^{67,68-71} (figura 25).

El papel de los sialorreceptores en la patogenia

Más de 300 personas han sido infectadas por el virus aviar H5N1, pero la retransmisión de humano-humano ha sido excepcional.⁷² En estudios recientes y con técnicas de histoquímica molecular, se demostró que los virus aviares se ligan preferencialmente sobre un receptor de ácido-sialico-galactosa-alfa-2,3, presente sólo en la parte más profunda del árbol respiratorio, es decir, el epitelio bronquiolar cúbico (no ciliado) y las células alveolares tipo 2 (figura 26). En cambio el otro receptor, propio de los virus humanos (sialico-galactosa-alfa-2,6), está presente en la mucosa nasal, el epitelio de los senos paranasales, la faringe, la tráquea y los grandes bronquios; por ello, la nasofaringe infectada genera tos, fiebre y secreción nasal, circunstancias que facilitan la propagación amplia y rápida de los virus humanófilos circulantes H3N2, H1N1 y la cepa «porcina» causantes de la pandemia de 2009.

Las cepas humanas como A/Kawasaki/173/01 (H1N1) o A/Jokohama/2057/03 (H3N3) sí fue-

ron capaces de infectar con rapidez tanto el epitelio bronquial como las células alveolares (figura 27). Por el contrario, la cepa aviar A/pato/Checoslovaquia/56 (H4N6) no pudo infectar los bronquios, pero sí se replicó dentro del epitelio alveolar. Este trabajo demuestra las ventajas de emplear las técnicas de inmunoperoxidasa alcalina además de las tinciones histológicas tradicionales.⁷²

Éticamente no es factible inocular a los humanos con fines de experimentación. En los hurones del laboratorio infectados por inhalación del virus de la influenza A (H1N1), el agente se multiplicó primeramente dentro del epitelio nasociliar, generando la distensión de las mitocondrias, balanceo y degeneración del retículo endoplásmico con desintegración nuclear (figura 28 y 29). Una hora después se adhirió sobre los sialorreceptores sial-galactosa-alfa-2,6 presente en la superficie del epitelio bronquial ciliado (figura 30) y a las 18 horas post infección se demostró abundantemente dentro de los núcleos de las celdillas atacadas (figura 31). A las 24 horas estaba presente tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células alveolares tipo II (figura 32); es decir, las cepas antropófilas y porcinas adaptadas se propagan de la nariz a los alvéolos en sólo 24 horas. La técnica de inmunofluorescencia demuestra el avance veloz de las lesiones respiratorias.

En México no se hace virología experimental de la influenza y muy pocos hospitales realizan estudios *post mortem* de los enfermos fallecidos, a pesar del esfuerzo heroico de algunos patólogos que trabajan prácticamente sin recursos. La necropsia es un instrumento precioso de la investigación médica y una herramienta de calidad insuperable para educar a los médicos en formación.

Factores de la virulencia

La velocidad de la replicación viral se correlaciona directamente con la virulencia. El gen de la

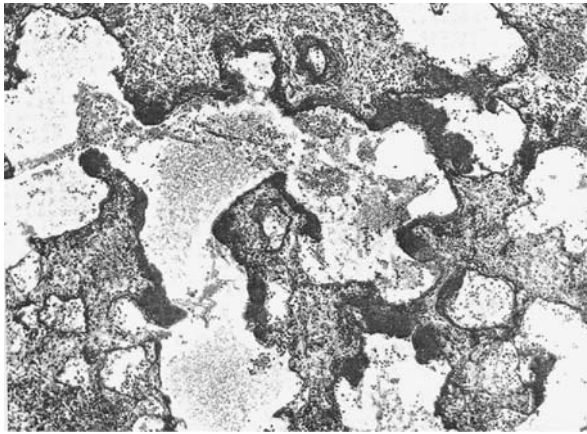


Figura 20. Neumonitis por influenza. Necrosis hemorrágica del tabique interalveolar, alveolitis edematosa con bandas de fibrina y exudado mononuclear. Los alvéolos están recubiertos por membranas acidófilas PAS-positivas. Material *post mortem* pandemia A (H1N1)-1918. Cortesía Prof. Maxwell Finland. Tinción PAS X 260.

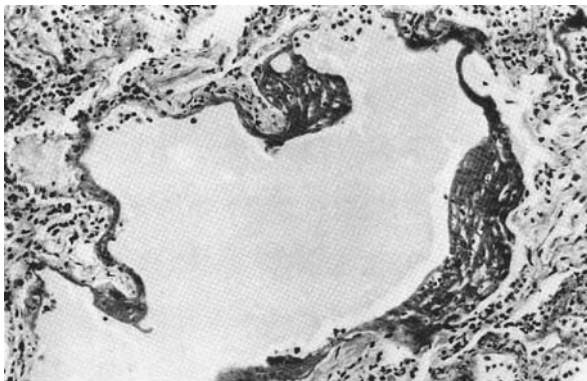


Figura 21. Influenza humana. El conducto alveolar con líquido edematoso está recubierto por membranas laminadas PAS positiva. Apoptosis del epitelio alveolar con descamación, infiltrado con predominio mononuclear. Material *post mortem* pandemia A (H1N1)-1918. (PAS-tionina; 600X). Cortesía del Prof. Maxwell Finland.

Figura 23. Influenza humana con estafilococia secundaria. La superficie pleural hemorrágica y congestiva, al corte se ve el pulmón consolidado, enrojecido y la salida de material purulento por los bronquios, virus A (H2N2). En el cultivo se aisló *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, resistente a las penicilinas. Tiempo de evolución 10 días. Cortesía del Prof. F. Mulder.

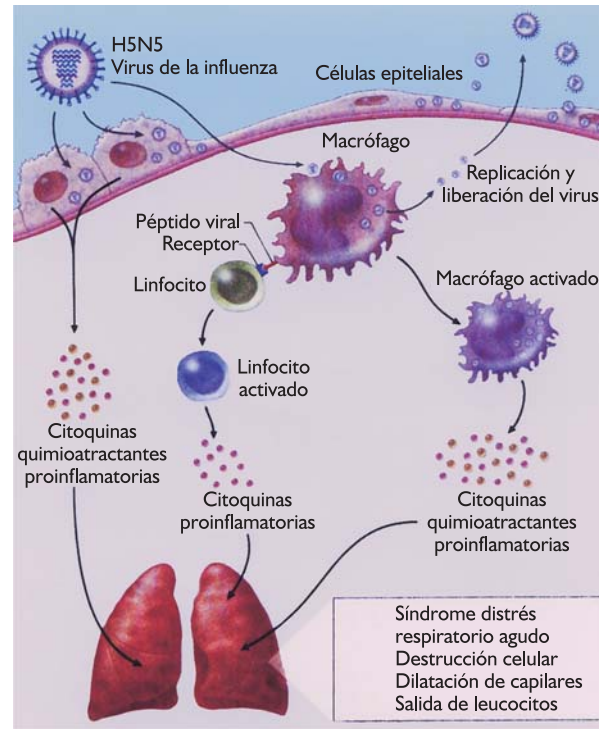


Figura 22. El virus aviar A (H5N5) infecta principalmente los neumocitos tipo II, los epitelios alveolares y los macrófagos. El epitelio activado libera las citocinas quimiotácticas de los polimorfonucleares neutrófilos. El macrófago activado induce la formación de linfocitos liberadores de las citocinas proinflamatorias, se produce así el síndrome del diestrés respiratorio agudo, forjándose virus nuevos que agravan el proceso patológico o «tormenta de citocinas».

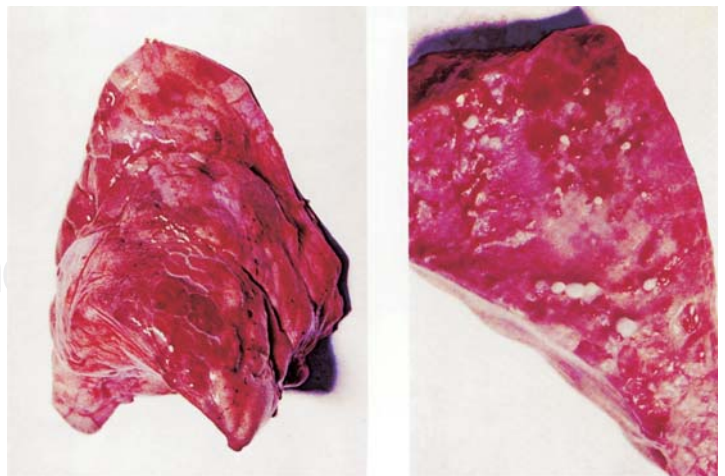




Figura 24. Influenza humana con estafilococia secundaria. Corte traqueobronquiopulmonar. Tráquea y bronquios con granulaciones amarillentas muy adherentes. Lóbulo superior izquierdo con aspecto necrótico y hemorrágico. En el cultivo se aisló el virus A (H2N2) y *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, resistente a la metacilina. Cortesía del Prof. F. Mulder.

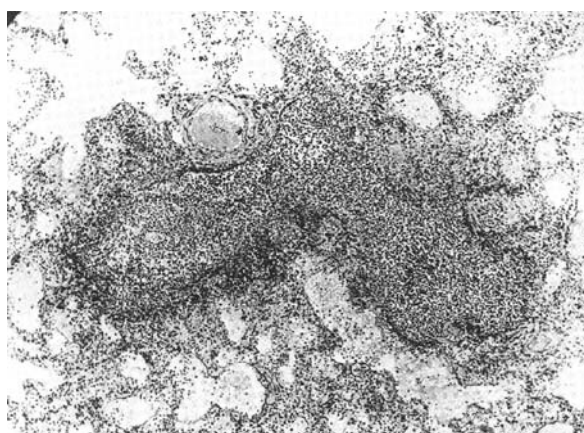


Figura 25. Influenza humana con invasión bacteriana secundaria. El ducto alveolar está ocupado por un denso exudado de polimorfonucleares neutrófilos. Congestión y necrosis del tabique interalveolar, alveolitis edematosa con exudado mononuclear abundante. (Tinción HE; 260X). Cortesía del Prof. Mulder. Mismo caso de la figura 21.

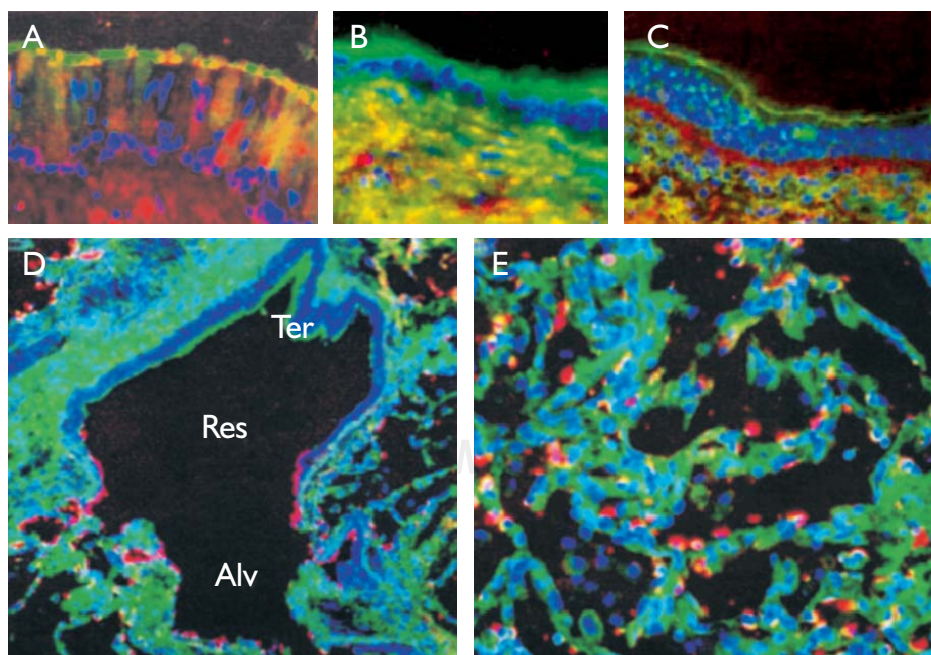


Figura 26. Reacción de dos lectinas (lec) con tejidos respiratorios de humanos, según el tipo del sialorreceptor (sire). Color verde = lec-SAMBISCUS NIGRA = sire-gal-alfa 2,6; Color rojo = lec MAACKIA AMURENSIS = sire-alfa 2,3-gal/ Contratinción de fondo = 4,6-diamidino-2-fenilindol. **A:** mucosa nasal. **B:** seno paranasal. **C:** bronquio. **D:** bronquiolo. **E:** alvéolo. **Abreviaturas:** Ter = bronquio terminal (distante del alvéolo). Res = bronquiolo respiratorio (adyacente al alvéolo). Alv = alvéolo.

polimerasa PB- 2 codifica la secuencia de los aminoácidos y, cuando lleva la lisina en posición 627, el virus aviar H5N1 aumenta considerablemente la capacidad de multiplicarse sobre los epitelios respiratorios del ratón inoculado. Cada uno de los ocho segmentos con polaridad negativa se transcriben en ARNm por efecto del macrocomplejo formado por NP más PB-2, PB-1, PA. La nucleoproteína purificada ha sido purificada y examinada con difracción cristalográfica molecular para conocer su funcionamiento; sin embargo, se requiere todavía profundizar la investigación bioquímica y averiguar de qué modo la estructura-función del macrocomplejo afecta la patogenicidad y la transmisibilidad del virus.^{1,73}

Los ratones y macacos infectados por la muy virulenta cepa quimérica A (H1N1)-1918 mostraron un incremento significativo de los ARNm codificadores de los siguientes: factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α), el RANTES expresado y secretado por los linfocitos T, dos proteínas proinflamatorias del macrófago (PIM alfa y PIM beta), la proteína quimiotáctica del monocito (PQM). Esta «tormenta de citoquinas» es provocada también por el virus aviar A H5N1 que, adicionalmente, fue capaz de estimular los macrófagos humanos *in vitro*, liberándose la proteína-10 inducible por interferón (P-10 IF) e interleucina 6 (IL-6); por el contrario, la cepa no virulenta y estacional H1N1 no indujo «la tormenta» ni mató a los ratoncillos infectados. Esta información podría ser aprovechada por aquellos interesados en producir fármacos anticitoquinas con espectro amplio.⁷⁴⁻⁷⁷

Los interferones I alfa y beta tienen efecto antiviral e inmunorregulatorio muy potente; por ello, son parte muy importante de la inmunidad innata. Mx1 es un gen del hospedador inducido por la presencia del interferón (IFN), aunque los ratoncillos consanguíneos (inbred) del laboratorio carecen de Mx1. En dos estudios recientes, esos ratones pudieron ser protegidos de las infecciones causadas por el virus letal H5N1 y por

la cepa supervirulenta H1N1-1918, a través de un mecanismo que reduce la actividad de la polimerasa y se refuerza con la aplicación de los interferones alfa y beta. Al profundizar esos trabajos, podría encontrarse otra rica veta terapéutica.^{1,78}

Recientemente, se describió la proteína viral proapoptótica PBI-F2 no necesaria para la replicación viral. Este producto lleva una secuencia carbono terminal con una hélice anfipática de carga positiva que se liga sobre las membranas mitocondriales interna y externa, provocando poros que comprometen la función de los transportadores ANT-3 y VDAC-1; aún más, el PBI-F2 sintético induce la citotoxicidad en concentraciones de 50 nM o menos. La existencia de esta potentísima virolesina en la cepa H1N1-1918 es responsable de incrementar sustancialmente la respuesta inflamatoria del pulmón atacado, junto con un mayor influjo de macrófagos, neutrófilos y linfocitos T activados y también promueve de algún modo la neumonitis bacteriana secundaria y la pneumonecrosis, productos de la acción patógena conjunta del virus A con las bacterias patógenas; se explicaría así la virulencia excepcional de la pandemia de 1918 y la frecuencia elevadísima de las neumonías letales registradas y confirmadas en todos los estudios bacteriológicos realizados en esos años.⁷⁹

Otro componente clave de la inmunidad innata son los llamados «receptores de reconocimiento selectivo». La proteína I inducible por el ácido retinoico (RIG-I), permite reconocer específicamente el ARN viral de hebra única 5' fosforilado propio del virus de la influenza, activándose la respuesta antiviral por generación de los interferones alfa y beta; por ello, los ratoncillos deficientes en RIG-I son extremadamente susceptibles frente a la infección viral.⁸⁰ Por otro lado, el virus A sintetiza la proteína N5-1 inhibidora, a su vez, del factor específico de partición poliadenilación (CPSF-30), indispensable para procesar y forjar

el ARNm formador del interferón beta. En el laboratorio, ha sido factible obtener mutantes virales incapaces de producir N5-I y, se conocen algunos fármacos nuevos que favorecen la síntesis del CPSF-30.⁸¹ La 2'-5'-oligo-sintetasa y la proteínasa R son facilitadoras en la generación del interferón.¹ Es indiscutible la necesidad de ampliar y profundizar estos estudios, con la mira de conocer mejor otros factores protectores del hospedador y precisar la estructura y funciones de las viroagresinas neumatopatógenas sin descuidar el campo fértil de la acción patógena conjunta virus-bacteria, en función de las variables edad, sexo, estado nutricional, y de las muchas deficiencias posibles en la inmunidad innata adquirida.^{82,83}

Epidemiología de la influenza

Tradicionalmente se acostumbra medir la mortalidad asociada con la influenza como indicador válido; sin embargo, la mortalidad refleja sólo parcialmente la gravedad de los brotes registrados, puesto que muchos enfermos, aun los graves, se recuperan.^{82,83} Por otro lado, los tipos y subtipos virales no son igualmente virulentos; por ejemplo, en algunos brotes examinados cuidadosamente se descubrió la cocirculación simultánea del virus A (H1N1) junto al virus B asociados con incremento de las hospitalizaciones y de las consultas médicas, pero con aumento pequeño de la mortalidad. Los epidemiólogos expertos apuntan también que la hospitalización incrementa sustancialmente la carga total del sector salud, los costos de la atención médica y el ausentismo laboral.⁸⁴⁻⁸⁶

Debe considerarse que el virus de la influenza en los países nórdicos circula principalmente de octubre a mediados de mayo (estacional), pero en los países tropicales pudiera circular durante todo el año.⁸⁷ En las naciones pobres los laboratorios de diagnóstico virológico certificados son pocos, y más difícil es aún reconocer, aislar y tipificar las cepas obtenidas de muestras bien toma-

das. Se acostumbra decir que un tipo determinado está circulando, cuando más de 20% de las muestras procesadas han resultado confirmatorias positivas.⁸⁸ Es útil medir el número de enfermos que se dan de alta en los hospitales mensualmente, examinando dos categorías diagnósticas: alta por neumonía o influenza (CIE-9- código 480-487) y hospitalización por problemas respiratorios y circulatorios (CIE-9- códigos 390-519) indicador conjunto neumonía e influenza (NI).⁸⁸ Es fundamental usar el método estadístico más apropiado con mediciones mensuales, y el modelo de regresión de Poisson en ocho grupos etarios principales: Menores de 5 años, 6 a 49, 50 a 64, 65 a 69, 70 a 74, 75 a 79, 80 a 84 y mayores de 85 años. Los interesados deberán consultar las recomendaciones de los expertos.⁸⁹⁻⁹¹

La mortalidad es un indicador valedero, sin perder de vista que la cuantificación se complica porque en los certificados de defunción no se anota la influenza como causa principal o contribuyente, simplemente porque no hubo ninguna confirmación del laboratorio; por tanto, en los cálculos de mortalidad se grafica el exceso asociado a la influenza (número de las defunciones por arriba de la banda de muertes esperadas) (*figura 33*). De modo práctico, se analiza tanto el exceso de muertes por neumonía e influenza (NI) como el exceso de muertes por todas las causas; este último es más sensible, en la mayoría de los brotes investigados el exceso de la mortalidad se descubre manteniendo la vigilancia epidemiológica activa y continuada, el indicador NI aunque útil para temporalizar el brote, subestima el impacto total por un factor de 3.8.⁸⁶ Los epidemiólogos han rastreado en retrospectiva el impacto mortífero de la influenza milenaria, analizando las estadísticas disponibles de mejor calidad, habiéndose encontrado que la curva de mortalidad según edades sirve mucho para evaluar el impacto poblacional del virus circulante.⁹² El patrón más frecuente es la curva en u, con daño moderado en los menores de un año, para luego aplanarse

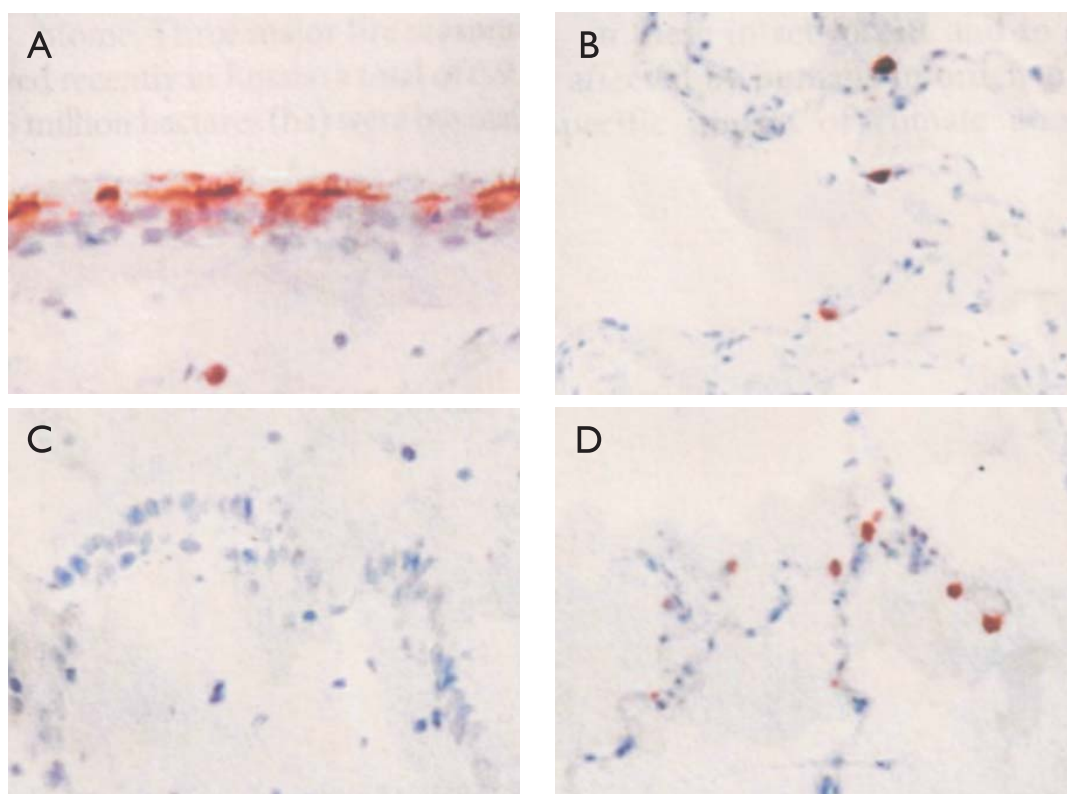


Figura 27. A y B: Infección de tejidos respiratorios por los virus A humanos. C y D: Infección de tejidos respiratorios humanos por virus aviarios. Los virus humanos infectan extensamente el epitelio de los bronquiolos y las celdillas alveolares tipo II. Los virus aviarios no infectan los bronquiolos (tinción negativa), pero sí son atacadas las células alveolares. Las células invadidas por el virus toman color café rojizo.

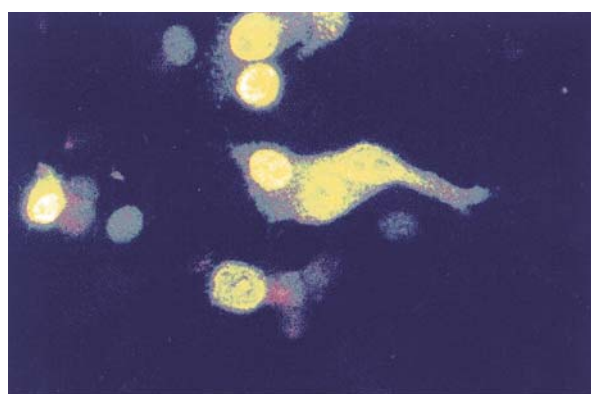


Figura 28. Células del epitelio columnar ciliado nasal obtenidas de un enfermo con influenza A (H1N1) «porcina». El color verde amarillento indica la presencia del virus en el citoplasma y núcleo de la célula atacada. (Inmunofluorescencia directa; 220X).



Figura 29. El epitelio nasal invadido por el virus porcino A (H1N1) está valonado, con cariolisis y destrucción del aparato mitocondrial y retículo endoplásmico. Compárese con la figura 28.

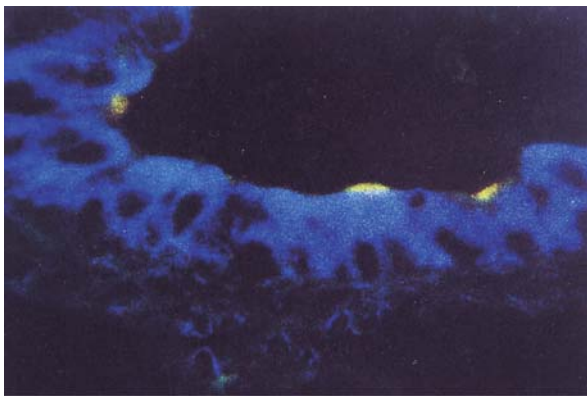


Figura 30. Inoculación intranasal experimental en el hurón por el virus porcino A (H1N1)-2009. Después de una hora, el virus (color amarillo) se une sobre los sialorreceptores galactosa-alfa-2,6, presentes sobre el epitelio nasociliar y bronquiolar ciliado del aparato respiratorio alto. (Inmunofluorescencia directa en cortes por congelación; 1,200X).

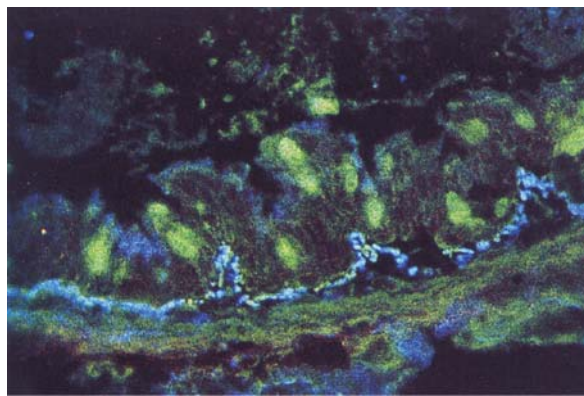


Figura 31. A las 18 horas postinoculación, el virus porcino A (H1N1)-2009 ha migrado al interior de los núcleos en el epitelio bronquiolar ciliado (color verde brillante) con desprendimiento por apoptosis. (Inmunofluorescencia directa; 800X). Compárese con la figura 30.

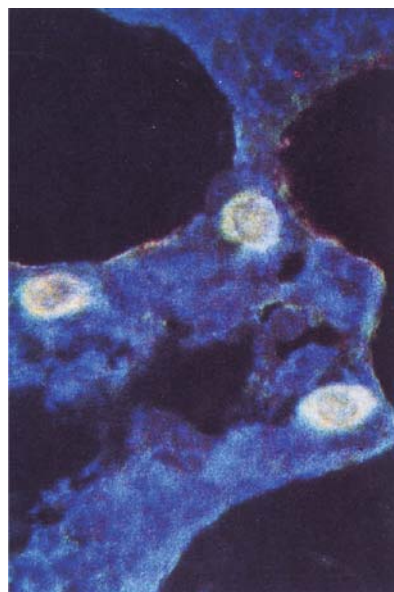


Figura 32. Infección experimental del hurón por virus porcino A (H1N1)-2009. A las 24 horas el virus llegó a los alvéolos, atacando el citoplasma (color amarillo) de los neumocitos tipo II. Corte por congelación. (Inmunofluorescencia directa; 1,200X). Compárese con la figura 24 B y D.

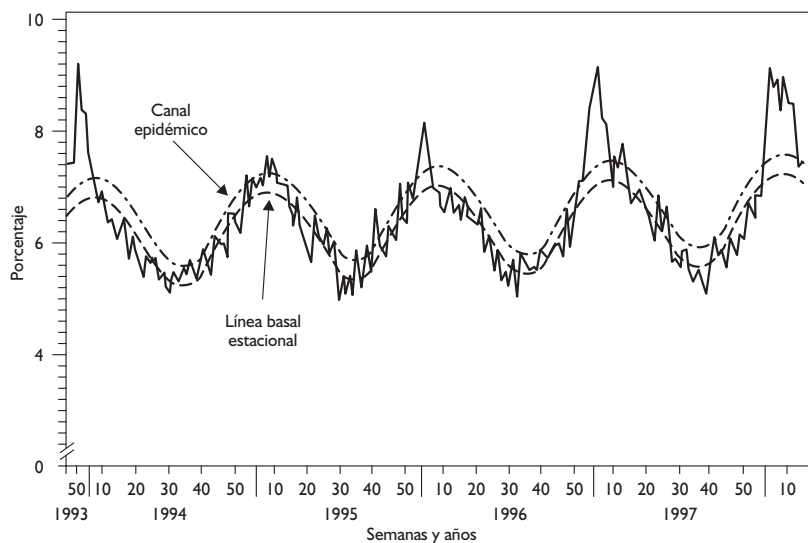


Figura 33. Mortalidad semanal por neumonías registrada en 122 ciudades de los Estados Unidos (diciembre 1993 a marzo de 1998). Los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) acostumbran monitorear la mortalidad por neumonías e influenza (indicador NI) en 122 «Ciudades centinelas», para establecer un canal epidémico. Los brotes invernales se ven como picos que sobresalen por fuera de lo esperado. Cortesía del Dr. A. Monto.

Cuadro IV. Mortalidad asociada con la influenza pandémica e interpandémicos 1918-2009, Estados Unidos.

Años de estudio	Virus circulante (mecanismo genético)	Exceso de muertes por todas las causas x 100,000 personas por año
1918-1919	H1 N1 (Virus aviar modificado) Pandemia	598.0
1928-1929	H1 N1 (Mutante-drift)	96.7
1934-1936	H1 N1 (Mutante-drift)	52.0
1947-1948	H1 N1 A ₁ (Recombinación intrasubtípica)	8.9
1951-1953	H1 N1 (Recombinación intratípica)	34.1
1957-1958	H2 N2 (Cambio antigénico), pandemia	40.6
1968-1969	H3 N2 (Cambio antigénico), pandemia	16.9
1972-1973	H3 N2 A Port-Chalmer's (mutante)	11.8
1975-1976	H3 N2 (Mutante) y H1 N1 (brote porcino)	12.4
1977-1978	H3 N2 (Mutante) y H1 N1 (Reaparición viral)	21.0
1999-1999	H3 N2 A Sydney (recombinación intratípica)	49.5
2003-2004	H3 N2 A Fujian (recombinación intratípica), y H1 N1 (mutante)	17.1
2009	H3 N2 y H1 N1 (mutante) y H1 N1 de origen porcino-aviar-humano (triple recombinante) Pandemia	?

hasta los 45 años, edad donde vuelve a elevarse haciéndose mayor y más pronunciada entre los más viejos⁸⁶ (figura 34). El brote de influenza española de 1918 es una excepción, la mortalidad fue mayor en el grupo joven de 13 a 45 años, aunque se mantuvo el ataque contra los más viejos; esa pandemia se caracterizó por muertes rápidas con disnea y cianosis facial digital, salida de líquido sanguinolento por boca y nariz, seguida por infecciones bacterianas secundarias letales; tan sólo en los Estados Unidos hubo 500,000 defunciones en exceso y la esperanza de vida se redujo 13 años.⁸² Con métodos de medición retrospectiva más finos y precisos, el Dr. Fukuda concluyó que durante la pandemia de 1968-1969 los menores de 65 años representaron la mitad de las muertes registradas;⁹² pero en las décadas subsiguientes, la influenza continuó las visitas anuales (periodo interpandémico), causando un promedio de 20,000 muertes por año. En el pico pandémico, las muertes de gente joven se elevaron 20 veces (2 por 1,000 habitantes) como se observa gráficamente en el modelo Simonsen-Clarke-Fukuda⁹³ (figura 35 y cuadro IV). En una ciu-

dad determinada la epidemia de influenza comienza bruscamente, alcanza el pico máximo en dos a tres semanas y tiene una duración promedio de cinco a 10 semanas.⁹³ En ese lapso, aumentan las consultas por enfermedad respiratoria aguda febril,⁹⁴ con una tasa de ataque de 10 a 20%; pero en escolares susceptibles y ancianos residentes en asilos la tasa puede ser de 40 a 50% o mayor.⁹⁴⁻⁹⁶ Vale la pena destacar el papel transmisor de los escolares (33 de 100 en el estudio de Houston),⁹³ ya que las familias con niños en la escuela son atacadas dos veces más que aquellos sin escolares. Los escolares con cultivo positivo acrearon el contagio dentro del hogar afectando a los preescolares y adultos; por eso, el ausentismo escolar es seguido por ausentismo laboral, mientras las hospitalizaciones por neumonía-influenza de los viejos ocurren casi al final del brote.⁸² Los menores del año con influenza se hospitalizan con tasa de 30 por 1,000, incrementan el uso de antibióticos y otros fármacos costosos.^{97,98} El tamaño del brote refleja la variación antigénica y la capacidad de replicación del virus, la inmunidad previa del grupo atacado y que sufren más

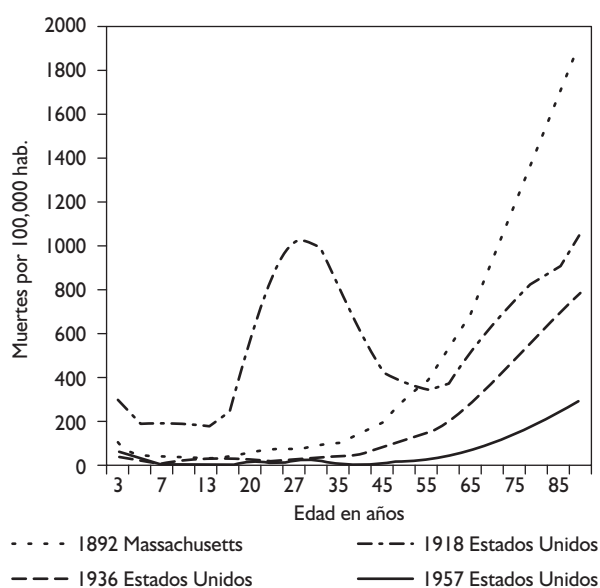


Figura 34. Mortalidad por influenza, cuatro curvas epidémicas de periodos distintos, según edades. La mortalidad es mayor en los menores de cinco años y se incrementa a partir de los 45 años. La curva de 1918 tuvo un predominio franco en personas de 13 a 45 años de edad. Cortesía del Dr. A. Monto.

quienes nunca se vacunan, además del efecto negativo causado por la pobreza con malnutrición, la diabetes descontrolada, el asma bronquial, el SIDA y el embarazo (comorbilidades).⁹⁸⁻¹⁰⁰

La pandemia de influenza española

El origen geográfico de la pandemia de 1918-19 es desconocida.¹⁰¹ El brote primero se reportó en marzo de 1918 en el Lejano Oriente, Europa y los Estados Unidos; durante el verano azotó las tropas en Europa por ambos lados del frente bélico. En el otoño del 18 y primeros meses fríos de 1919 estalló por todos los continentes la segunda onda más virulenta. Tan sólo en los Estados Unidos hubo un exceso de 550,000 defunciones por influenza, en total 675,000 muertos, pero a nivel mundial, se le atribuyeron entre 20 y 40 millones de fallecidos.⁸² En Filadelfia, Estados Unidos, se registraron 16,000 defunciones y

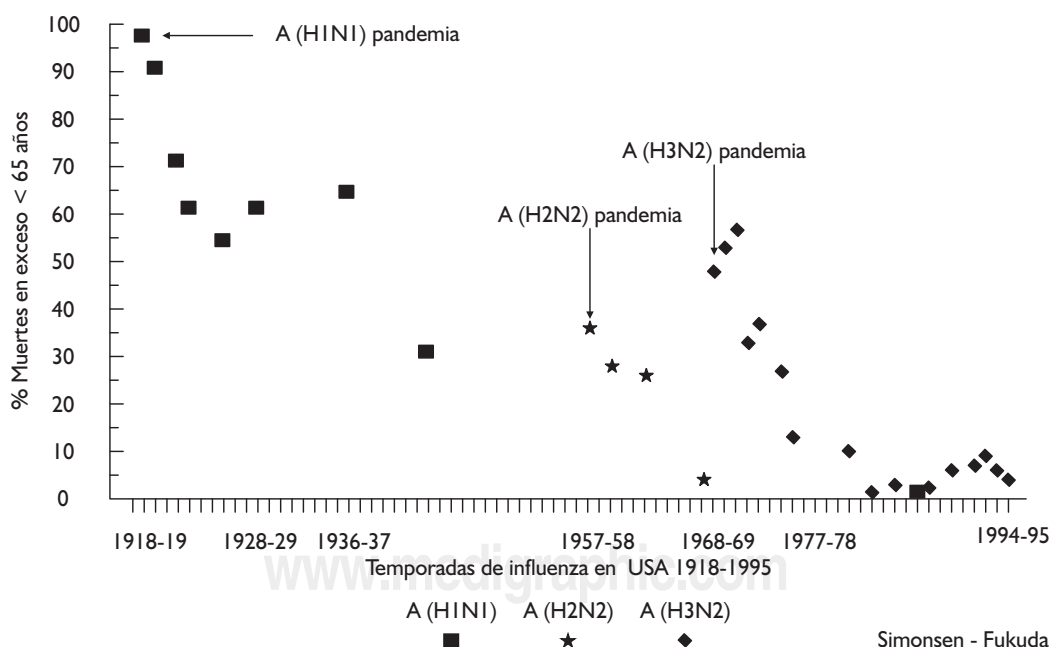


Figura 35. Mortalidad por influenza registrada en tres pandemias del siglo XX. La aparición del virus recombinante nuevo se acompañó de un incremento en la letalidad, en el periodo interpandémico de duración variable; se registraron brotes anuales con letalidad relativamente menor. Cortesía de los Drs. I. Simonsen y MJ Clarke.

11,000 de ellas ocurrieron en octubre; entre 100,000 militares hubo 43,000 bajas por la influenza maligna española (figura 36) y el grupo de edad más atacado fue el de 15 a 45 años.¹⁰¹⁻¹⁰³

Es importante recapitular: 97% de los enfermos tuvieron fiebre de 38 °C o más por tres días y se mejoraron, 2 a 3% restante tuvieron pulmonía con infección bacteriana secundaria.⁸² Un grupo más pequeño de las víctimas jóvenes, fueron atacados violentamente a las 24–42 horas del inicio, y en la necropsia se demostró la neumonitis edematohemorrágica masiva. Los estudios seroepidemiológicos retrospectivos practicados en los sobrevivientes y los nacidos después de 1920 proporcionaron evidencias de que el agente causal fue A (H1N1).¹⁰¹⁻¹⁰⁴ La Dra. A. Reid pudo recuperar el ARN viral a partir de los cortes histológicos incluidos en parafina, obtenidos de dos soldados fallecidos en 1918 y del cuerpo exhumado de una mujer esquimal prácticamente congelada ese mismo año. El primer «caso» era varón, 21 años de edad, originario de Carolina del Sur, fue admitido al Hospital el 20 de septiembre de 1918, con diagnóstico de influenza y pulmonía, tuvo curso clínico progresivo con cianosis y disnea; falleció al sexto día. La necropsia demostró neumonía lobar bacteriana del pulmón izquierdo, bronquiolitis aguda focal y alveolitis del pulmón derecho, datos compatibles con la neumonía primaria por influenza.

El segundo «caso», otro varón de 30 años de edad, de Nueva York, hospitalizado con diagnóstico de influenza el 28 de septiembre de 1918; el curso clínico fue fulminante, murió con insuficiencia respiratoria aguda a los tres días. La autopsia mostró edema pulmonar bilateral masivo y bronconeumonía focal aguda. De los cortes histológicos fijados en formol e incluidos en parafina se logró extraer los fragmentos de 120–200 nucleótidos, copiados por transcripción reversa-reacción de polimerasa en cadena (TR-PCR). El tercer «caso» correspondió a una mujer de la etnia Inuit de edad desconocida; el cuerpo fue enterra-

do dentro del hielo (permafrost). No hubo registros de la enfermedad, pero por la investigación histórica se averiguó que la villa donde vivía fue diezmada en noviembre de 1918, muriendo 72 personas (85% de los habitantes) en tan sólo cinco días. El examen histológico de la biopsia pulmonar cortada por congelación, demostró la hemorragia y edema pulmonar masivos, de este material se logró extraer los genes del ARN viral.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

El análisis secuencial de los nucleótidos en los fragmentos amplificados del primer caso indicaron que los cuatro genes encontrados estaban relacionados más cercanamente con los virus de la influenza de los mamíferos más que con los de las aves. Se pudo así reconstruir el gene HA y secuenciarlo en los tres casos, usando los 22 fragmentos que luego se llamaron A/Carolina del Sur/1/18, A/New York/1/18 y A/Breving Mission/1/18, respectivamente.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷

El análisis filogenético comparativo de los genes HA encontrados, permitió diagnosticar tres clases distintas: humano, aviar y porcino, como fuentes generadoras del virus. La HA 1918 es filogenéticamente distante de los virus aviares actuales; sin embargo, guarda la similitud aviar por el número de sitios (epítomos) en que se une con los anticuerpos, los sitios de la glicosilación y el lugar en que se enlaza con el receptor celular; todo parecería señalar que el ancestro del virus H1N1 1918 entró en la población humana alrededor de 1915, aunque probablemente estaba circulando desde 1900.¹⁰⁴ Los estudios genéticos permitieron establecer que el virus de la pandemia «Asiática» A H2N2 de 1957, obtuvo la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA) y la polimerasa (PB-1) de una cepa aviar y se generó por la recombinación entre A (H1N1) circulante y el virus A aviar nuevo. Del mismo modo, el tipo pandémico H3N2–Hong Kong–1968 fue producto de una segunda recombinación: los genes HA y PB-1 son de procedencia aviar neta, el resto provenía de un circulante A H2N2.⁸²

Sin duda, podría elucubrarse que la secuencia del fragmento H, provenía de las aves con pocas modificaciones, y en un lapso de 30 años, las secuencias aviares se modificaron por la deriva continua. Así, el dominio H-1918 más antiguo difiere en 26 aminoácidos; en 1957 la diferencia se acorta a sólo 15 aminoácidos; en 1968 a nueve y en 1987 sólo a dos; esto es, el virus aviar del 18 sufrió la deriva antes de atacar a los humanos, o bien, se adaptó progresivamente en los mamíferos (cerdos).¹⁰⁴

La secuencia genética de la NA-1918 conlleva un marco de lectura con 1,407 bases y siete sitios de glicosilación característico sólo de los virus aviares, es decir, tiene 14 sitios concordantes con el grupo aviar, pero además carga otra clase de sitio de mamífero, muy semejante al virus porcino clásico H1N1.¹⁰⁸

La influenza en Copenhague Dinamarca-1918

En 1918, la capital danesa tenía 534,000 habitantes y 350 médicos, quienes notificaron semanal-

mente los principales motivos de consulta, hospitalización y las defunciones del periodo 1910-1920; es decir, había un sistema de vigilancia robusto y confiable. En ese año se registraron tres ondas epidémicas sucesivas atribuibles a la influenza pandémica: la primera en el verano (junio-julio), la segunda otoñal de magnitud mayor (septiembre-noviembre), la tercera invernal fue la más aplanada, pero con duración mayor (diciembre 1918-abril 1919) (*cuadro V*).

En verano la morbilidad subió 300 veces en comparación al nivel medio calculado del periodo semejante de 1910-1917, habiéndose enfermado 5% de los habitantes; en otoño enfermó 10% más y en invierno sólo 7%, en total 24%, es decir, fue atacada casi la cuarta parte de la población. En verano se hospitalizaron 0.8% (*figura 37*).

La mortalidad en exceso por todas las causas fue: 90 defunciones en verano (tasa 1.7/10,000) y 1,450 en otoño (tasa 27/10,000). La letalidad por ciento veraniega 0.35 contra 2.3 de la onda otoñal. Las muertes por edades golpearon principalmente a los de 15 a 44 años: 3.1% en vera-

Cuadro V. Morbilidad y mortalidad por influenza en tres ondas. Copenhague 1918-1919.

Indicador epidemiológico	Verano, 12 semanas 23 jun-septiembre	Otoño, 12 semanas 15 sep- 1 diciembre	Invierno, 24 semanas 8 dic-27 abril	Suma total
Exceso enfermedades por In % población que sí se enfermó	480	1170	710	2,370
Exceso de hospitalizaciones In	40 (0.4%)	80 (0.8%)	7	24
			60	180
Exceso de defunciones respiratorias	1.4	27.0	12.0	41.1
Exceso de defunciones, Tc.	1.7	27.0	12.6	41.2
Letalidad por ciento	0.35	2.3	1.7	1.7
< 15 años	0.2	12.2	17.3	29.7
15-44	3.1	46.7	14.9	64.7
45-64	0.3	7.7	7.3	15.5
> 65 años	0.0	0.5	0.0	0.5
Casos de influenza diagnosticados	25,360*	61,285**	—	—
Tasa por 10,000 personas	471	1,090	—	—
Defunciones atribuidas a la influenza	85	1,239	—	—
Tasa por 10,000 personas	1.5	23.1	—	—

In- = Influenza; Tc = todas las causas con el modelo de regresión Serfling. *30 jun-7 sep. **8 sep-30-nov.



Figura 36. En la epidemia de Filadelfia 1918-Octubre, los hospitales fueron insuficientes para atender a los atacados por la influenza española. Fue necesario atender a los enfermos en los gimnasios improvisados como hospitales.

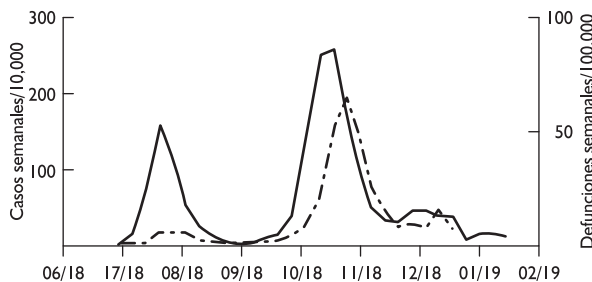


Figura 37. La pandemia 1918-1919 investigada en Copenhague, Dinamarca, cursó con tres ondas sucesivas. La primera veraniega fue rápida y moderada, con pocas defunciones. La segunda otoñal, más violenta y mortífera, atacó principalmente a la gente joven. La onda invernal fue la más prolongada y benigna; se acompañó de pocas defunciones. Es probable que las dos primeras redujeran sustancialmente la población susceptible.

no, 46.7% en otoño y 14.9% en invierno, las tres ondas de influenza mataron sólo a 0.41% de la población urbana.

La transmisibilidad R se midió por el número de casos secundarios producidos por las personas infectadas al comienzo de un brote (fase ascendente). Durante el verano, cuando la población era totalmente susceptible, R varió entre 2.2 y 5.4, en verano bajó, 1.2 a 1.4. En síntesis: la onda veraniega permitió la propagación rápida del virus, pero la magnitud del daño mayor ocurrió

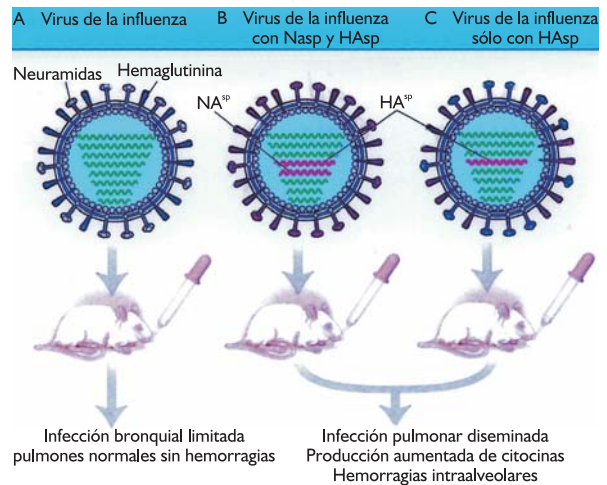


Figura 38. El ratón de la izquierda fue inoculado con el virus estacional A (H1N1). Los ratoncillos del centro y derecha infectados con la cepa quimérica hipervirulenta portadora de la hemaglutinina sp (1918), mostraron lesiones pulmonares edematohemorrágicas con «tormenta de citocinas» agregada. La hemaglutinina (HA) fue el principal factor de virulencia encontrado. Cortesía del Dr. R. Belche.

durante el otoño. Dado que el invierno nórdico es muy drástico se esperaba un daño más grande; sin embargo, la morbilidad se abatió y las muertes fueron pocas. Esta investigación demuestra la utilidad enorme del método epidemiológico detallado y semanal, siempre y cuando la información recolectada sea oportuna, de calidad buena y confiable (Jour Infect Dis 2008; 197: 270-278).

El resucitamiento molecular del virus A-1918

El Dr. Kobasa usó la poderosa técnica de la «genética en reversa» para sintetizar en el laboratorio los genes de la HAsp-1918 y NAsp-1918 sobre la base de las secuencias genéticas «desenterradas» por los Drs. Reid y Taubenberger. El investigador japonés «fabricó» virus de la influenza quiméricos (artificiales), inyectándoles uno de esos dos genes reconstruidos. El virus que expresaba la HAsp tuvo la capacidad de replicarse sobre una monocapa de células cultivadas *in vitro*,

formando placas visibles, aun en ausencia de tripsina. Normalmente se requiere de una proteasa (tripsina) para iniciar la activación de la HA y la infección de las células cultivadas; pero el virus A-1918 pudo activarla con la sola cooperación de su propia NA, aunque se desconoce el proceso bioquímico en detalle.^{109,110}

Los virus quiméricos fueron inoculados en ratoncillos del laboratorio: el virus A-1918 resultó ser 100 veces más letal para el ratón que cualquier otro virus de la influenza conocido, aunque la dosis letal media (DL_{50}) fue relativamente baja 10^3 dosis infecciosas para un huevo (DIH_{50}). La replicación pulmonar fue muy rápida, alcanzándose títulos altísimos del virus $> 10^7$ DIH_{50} por mL y, al aplicar inóculos más altos, los ratones liberaron cantidades masivas de citoquinas proinflamatorias en ambos pulmones, se promovió así el reclutamiento de leucocitos en los alvéolos, resultan finalmente las lesiones edemato-hemorrágicas bilaterales y muerte al tercer día (figura 38). Los ratones del grupo testigo no expuesto frente a la HASP-1918, sólo tuvieron bronquiolitis de curso limitado y se recuperaron, sin daño pulmonar residual. La investigación del Dr. Kobasa fue más allá: comprobó que los sueros de las personas nacidas después de 1920 no tenían anticuerpos neutralizantes contra la hemaglutinina HASP-1918; mientras los sueros de aquellos infectados en 1918-1919 podían neutralizar la HASP aún después de 80 años (memoria inmune perdurable), es decir, a partir del año 1920 el virus original había ya mutado (deriva) y no fue reconocido por el sistema inmune (cambio antigénico). Dícese con razón que la Dra. Reid resucitó el parque jurásico del virus de la influenza A-1918, y el Dr. Kobasa revivió al tiranosaurio (HASP) causante de la neumonitis hemorrágica letal, usando los virus quiméricos reconstruidos en su laboratorio.¹¹¹ El Dr. Taubenberger pudo aclarar de qué modo el virus de 1918 adaptado ya en los humanos pudo propagarse con mucha eficiencia, transmitiéndose en los aerosoles expulsados por los tosedores infectados. Aquí el rol de la polimerasa

PB-1 es crítico, este gen se transfiere durante la recombinación junto con el de HASP (translocación genética ligada). Se encontraron cuatro aminoácidos presentes en PA, uno en PB-1 y cinco en PB-2 existentes sólo en el virus-1918, pero no en los virus aviares; esos aminoácidos están situados en la porción nuclear señalizadora de la polimerasa, como sabemos es la responsable de conducir la velocidad de replicación viral en los tejidos infectados. Es necesario y urgente conocer a fondo la organización y funcionamiento macromolecular de PB-1 y sus mutantes; se prevé que, en corto plazo, se forjarán mutantes artificiales de HASP para definir cuáles microlocus (o epítomos) fueron los responsables de la tan impresionante virulencia del virus A-1918. Paradójicamente, los muchos adultos jóvenes y sanos que fallecieron en el brote de 1918-1919 montaron una respuesta inmune rápida contra el antígeno HASP, pero fue exuberante, mientras la influenza interpandémica recoge la mayor cosecha de víctimas entre los más viejos que tienen el sistema inmune «cansado» o defectuoso, por la presencia de neumopatía crónica obstructiva (tabaquismo), diabetes descontrolada, cardiopatía crónica, SIDA o, infecciones pulmonares latentes y debilitantes (bronquitis crónica), malnutrición o cáncer, más los efectos nocivos del ambiente contaminado y sucio (comorbilidades),¹¹² el desempleo y la pobreza imperantes. Las pandemias históricas de 1830 y 1832 fueron también muy mortíferas; pero la población mundial era más pequeña y la movilidad poblacional de un continente a otro estaba limitada por la lentitud del transporte marítimo y terrestre; muchos poblados rurales, selváticos o insulares permanecieron casi aislados. Hoy en día la población del mundo es poco más de 6.5 mil millones, tres veces más que en 1918, el transporte aéreo creciente y la apertura mucho mayor del comercio mundial han borrado las fronteras; por tanto, una nueva pandemia incluso «moderada» podría matar muchos millones de personas en un plazo más corto.¹¹¹⁻¹¹⁴

En las pandemias de 1918-1919 y 1957-1958, se observó que los casos de neumonía fatales por influenza se complicaban con infecciones bacterianas.^{116,120}

Pandemia de 1957-1958, asiática, virus A H2N2

Comenzó en febrero de 1957 en la provincia Kwei-Chow en el sur de China; en marzo se extendió por Hunan y en abril alcanzó Singapur y Hong Kong. El agente causal fue aislado en Japón en mayo y para noviembre había invadido casi todo el mundo. Los primeros aislamientos virales en Inglaterra y los Estados Unidos fueron en junio-julio de 1957; el pico epidémico se alcanzó en octubre, con letalidad excesiva. La tasa de ataque más alta > 50% ocurrió en niños y adolescentes de 15 a 19 años. El número de muertes atribuibles a la influenza se estimó en 69,800 en Estados Unidos.¹¹⁵

38

Pandemia de 1968, Hong Kong, virus A H3N2

El nuevo virus fue aislado en Hong Kong en julio de 1968. El brote se diseminó con aumento de la mortalidad en los Estados Unidos en el invierno de 1968-1969, en el Reino Unido la epidemia se presentó hasta el invierno de 1969-1970. La tasa de ataque etario máxima fue de 40% en los niños de 10 a 14 años, el exceso de muertes en los Estados Unidos se estimó en 33,800. Esta pandemia fue la menos mortífera porque la población más vieja poseía anticuerpos neutralizantes contra N2.¹¹⁶⁻¹¹⁸

El riesgo de morir por neumonías-IRAS en México

En el año 2002, la Dirección General de Epidemiología calculó el riesgo probable de morir por neumonías, influenza y otras infecciones respiratorias agudas (IRAS), por entidades y municipios de la República Mexicana. Los municipios exami-

nados se clasificaron en cuatro categorías de riesgo: muy alto cuatro veces la tasa media nacional (TMN); alto tres veces la TMN; mediano doble de la TMN; bajo riesgo por debajo de la TMN. La tendencia de la mortalidad por IRAS-neumonía-influenza bajó de 38.8 por 100,000 en 1985 a sólo 17.3 en 2000, reducción de 55.3% en esos quince años. En el periodo examinado, los grupos de edad más afectados fueron los extremos de la vida: menores de un año con tasa de 168.2 defunciones por 100,000 y mayores de 65 años con tasa media de 197.6, habiendo sido las neumonías responsables de 86% de todas las defunciones; 55.5% de las muertes registradas ocurrieron en el hogar. De todos los municipios, 57.7% se consideraron con riesgo bajo, pero Puebla, el Estado de México, Jalisco, Veracruz y Chiapas tuvieron más de la mitad de los municipios con riesgo muy alto, alto y medio. De manera global, las entidades con tasas de mortalidad por IRAS más altas fueron: Yucatán 25.8, Estado de México 25.4, Puebla 23.6, Guanajuato 21.5 y Querétaro 20.6. Esta información debe ser aprovechada para distribuir racionalmente las vacunas, los medicamentos y otros recursos y prevenir las muertes por influenza epidémica.¹¹⁹

La pandemia en México, 2009, virus A (H1N1) S-OIV

El 28 y 30 de marzo, en San Diego, California, hubo dos casos clínicos de influenza A (H1N1). Se tomaron muestras y se encontró un virus «genéticamente-atípico». Los aislamientos fueron enviados a los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) y se comenzó a procesarlas.¹²⁰⁻¹²²

Del 9 de marzo al 10 de abril de 2009 se registró un brote de infección respiratoria aguda en el poblado «La Gloria», comunidad alta y fría con 3,000 habitantes, situada 8.6 km de las «Granjas Carrol, criadero porcícola intensivo de 15,000 cerdos, ubicado en Perote, Veracruz. El primer caso clínico ocurrió en un niño de cinco años de

edad, quien se recuperó totalmente. Hubo también otros 25 casos notificados. El 12 de abril el Dr. M. Ryan, de Alemania y Respuesta Global-OMS, solicitaron información del brote en Veracruz. El día 4 de abril, en el estado de Oaxaca, se enferma una señora e ingresa al hospital el 12 de abril con diagnóstico de pulmonía grave y fallece al día siguiente. Clínicamente se sospechó la posible existencia de un coronavirus neumotropo y virulento; (SARS).

El 17 de abril de 2009, llegó de visita a México el Presidente Barak Obama. El CDC informó a México que los dos casos diagnosticados en California fueron causados por un virus porcino (swine) H1N1 nuevo. El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de la Secretaría de Salud (SS) informó también que, en el área de urgencias, estaban ingresando casos de neumonías graves, registrados en adultos jóvenes. Se tomaron muestras de los enfermos y se demostró la coexistencia de los virus A (H1N1) y H3N2. El Laboratorio de Referencia del INDRE no identificó los virus nuevos por carecer de los protocolos para el estudio cabal de patógenos emergentes; se pensó eran «cepas estacionales», ya conocidas. El 22 de abril la Secretaría de Salud envió al Laboratorio de Winnipeg, Canadá, 51 muestras clínicas, incluidos el caso de Perote Veracruz y los tejidos de la muerta en Oaxaca. El 23 de abril se demostró que 17 de esos casos fueron causados también por un virus de influenza «porcino», semejante al identificado previamente en California. La Secretaría de Salud (SS), a través del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), había lanzado una alerta epidemiológica, solicitando información de aquellos enfermos hospitalizados por neumonía grave. Habiendo realizado un recorrido por 23 hospitales públicos y privados de la Ciudad de México, se contabilizaron 120 casos ingresados por cuadros neumónicos graves y se recogió la información de cinco personas fallecidas por esa causa: dos del Hospital de Iztapalapa de la SS,

otros dos del INER y uno más del Hospital Privado Ángeles Pedregal.

El inicio de la epidemia en México fue accidentado y difícil: un brote pequeño y autolimitado ocurrido en un poblado rural veracruzano cercano a un criadero porcícola insalubre, regido por una empresa contaminadora con reputación terrible. En los años 1997, 2000 y 2006 estuvo enlistada por la Revista *Multinacional-Monitor* para designar a las peores empresas del año. Los habitantes del poblado La Gloria señalaron: «10% de los pobladores tenían familiares trabajando en la capital del país, quienes visitaron la comunidad en Semana Santa entre el 3 y el 19 abril; ellos allá trabajan en hoteles y restaurantes y, que casualidad, después que regresaron empiezan a enfermarse allá y sale el gobierno a decir que hay epidemias y, añadieron, un camión de pasajeros llega cada semana directo del Distrito Federal». Esta nota del periódico *Reforma* (30 de abril de 2009, p. 5, 6) es de interés epidemiológico, porque coincide con el tiempo del brote registrado en esa población, la más alejada del Municipio de Perote. Hubo luego otro caso, aparentemente inconexo acaecido en Oaxaca y la epidemia creciente en la Ciudad de México. La confusión fue empeorada por la falla aparente del INDRE que trabajaba prácticamente sin recursos y técnicamente desactualizado. La vigilancia epidemiológica es actividad principal del Sector Salud, pero sufrió un recorte presupuestal drástico (3.5%), se puede trabajar pero no hacer milagros. En México deben mejorarse los laboratorios de Salud Pública, empezando por el Laboratorio Nacional de Referencia.

La Dirección del INDRE ha hecho notar la falta de infraestructura y equipos necesarios para procesar las numerosas muestras. Hasta el 22 de mayo de 2009 se había procesado 4,174 (A.M. Nacional sábado 23/mayo/2009). Felizmente, desde 1980 México ha venido fortaleciendo el Sistema de Inteligencia Epidemiológica, cientos de médicos han recibido adiestramiento epidemiológico avanzado, un ejército de especialistas en

salud pública recogen y procesan la información diariamente y, ciertamente, el gobierno nunca ocultó la información y trabajó vigorosamente para intentar reducir el avance del brote: limitado las reuniones públicas, cerrando las escuelas, instruyendo y educando a la población, se ha buscado también cooperación internacional y se tiene planeado corregir las deficiencias encontradas (Frenk J. a.m. 2/Mayo/2009).

El 30 de abril de 2009, el Laboratorio del IN-DRE, alertado, diagnosticó 99 casos de influenza A «porcina»: 83 en México Distrito Federal, 13 en el Estado de México, uno en Colima, uno en Oaxaca y uno en Jalisco. El centro del país cursaba una epidemia creciente, habiéndose reconocido ocho defunciones atribuibles al neovirus A swine H1N1. La Secretaría de Salud decretó suspender las labores no esenciales de la Administración Pública y del Sector Privado del 1 al 5 de mayo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) elevó la fase alerta de 4 a 5, consecuencia de haberse comprobado la transmisión humano-humano por el neovirus reconocido en México y los Estados Unidos. El periódico *Reforma*, por medio de una encuesta telefónica, demostró que la mitad de la población encuestada tenía miedo de ser contagiada, y 49% se mostraron acorde con la decisión de cerrar los restaurantes en el Distrito Federal (DF).

Las repercusiones inmediatas de la epidemia fueron disminución de 35% en el transporte terrestre nacional y mayor a 50% en el DF. Las líneas Estrella Blanca, Ómnibus de México y Primera-Plus reportaron, en promedio, de siete a 10 cancelaciones de corridas por día. La Dirección General de Aeronáutica Civil estimó una reducción de 15 mil reservaciones diarias, y dejaron de recibirse 5 mil 500 viajeros internacionales por día. Los puertos de Cancún, Mazatlán, Puerto Vallarta y Ensenada dejaron de recibir los cruceros cargados con turistas y las reservaciones se redujeron 15% en los hoteles de la Riviera Maya. A nivel internacional, Cuba y Argentina, sin

ninguna coincidencia de las recomendaciones hechas por la OMS, suspendieron todos los vuelos procedentes de México; Ecuador restringió por un mes los vuelos desde y hacia México; Perú adoptó la suspensión de vuelos directos a comienzos de mayo (a.m. 10/mayo/2009).

El 10 de mayo, en Hong Kong, se detectó un pasajero mexicano de 25 años quien había viajado por Volaris vía Guadalajara-Tijuana-Shangai (Aeroméxico), con diagnóstico virológico confirmado por el gobierno chino por lo que deciden buscar a los 170 pasajeros del mismo avión. Fueron sacados del hotel y 71 mexicanos permanecieron en cuarentena forzada, aislados durante siete días; aquél fue el primer caso confirmado en Asia. Alemania y Austria confirmaron también cuatro casos de gripe porcina, en España sumaron 10. Nueva Zelanda reportó 10 casos, acaecidos en un grupo de escolares que habían regresado de México; en Gran Bretaña se detectaron tres casos nuevos. En Egipto se ordenó la matanza de 300,000 cerdos, pese a no haberse comprobado ningún caso humano. En Estados Unidos, la Sra. Janet Napolitano, Secretaria de Seguridad Interna, contestó así a los senadores que la presionaban para cerrar la frontera: «Tomaremos las decisiones basándonos en la ciencia y en lo que creemos es razonable. Cerrar la frontera no tiene ningún sentido, nuestro objetivo deberá ser mitigar la epidemia».

La importancia del tráfico aéreo en la propagación de las epidemias se mostró en una investigación de los médicos canadienses. En los meses de marzo y abril de 2008, de acuerdo a la información disponible en la Asociación Internacional del Transporte Aéreo (IATA), hubo 2.35 millones de pasajeros que volaron de México hacia 1,018 ciudades en 164 países del mundo; sin embargo, 80.7% de los aeropasajeros tuvieron como destino los Estados Unidos o Canadá; 8.8% volaron a Centroamérica, Sudamérica o el Caribe; 8.7% a Europa Occidental; 1% al Oriente Asiático y 0.8% a otros sitios. Aquellos lugares que recibie-

ron más de 1,400 pasajeros tuvieron un riesgo elevado de importar el nuevo virus A (H1N1), con sensibilidad de 92% y especificidad de 92%, a saber: Estados Unidos 1,744 655, Canadá 149,137, Francia 47,501, España 42,815, Alemania 33,448, Cuba 29,123, Argentina 28,789, Italia 24,252, Brasil 23,125, Guatemala 19,719, Reino Unido 17,993, Colombia 16,583, (Información OMS, 25/Mayo/2009). Esta información permite valorar la importancia del tráfico aéreo-comercial-turístico en la diseminación rápida de los virus respiratorios y otros agentes patógenos; del mismo modo, la interrupción de los vuelos implica pérdidas económicas cuantiosas y graves daños a la industria hotelera-restaurantera y turística internacional (The Bio. Diaspora Project. Toronto, ST Michael Hospital).

El 3 de mayo de 2009, Costa Rica informó tres casos confirmados; Italia registró un caso e Israel otro; sin embargo, el grueso del brote estaba en México 397 casos con 16 defunciones, Estados Unidos 160 casos y una sola defunción, Canadá 55 casos. El 4 de mayo Colombia informó el primer caso sudamericano, un hombre de 42 años de edad, quien días antes había estado en México. El 6 de mayo Guatemala confirmó la influenza porcina en una niña de 11 años, procedente de Cuernavaca, México. Para esa fecha, la cifra de casos confirmados en los Estados Unidos superó los 400, el estado más afectado era Nueva York con 90, California 49, Texas 41, Arizona 17, California del Sur 16 y Oregon 15, además de Illinois, Georgia y Maine. La única defunción correspondió a un niño mexicano quien falleció en Texas. La Dra. Nancy Cox, Directora de la División de Influenza en el CDC, y el Dr. Peter Palase apuntaron que los virus causantes de las pandemias de 1918, 1957 y 1968 tenían codificado en el genoma el factor de virulencia PBI-F2 que los hacía potencialmente mortíferos y, no está presente en el neovirus porcino A (H1N1); por ello, la virulencia del brote podría ser menor, aunque no excluyeron la posibilidad de un rebrote invernal mayor.

La pandemia se extendió primeramente en Norteamérica, Europa Occidental, Centro y Sudamérica países con los que México mantiene intercambio humano y comercial extenso y continuado. El 11 de mayo de 2009, la OMS reconoció 4,379 contagiados en 29 países con 49 defunciones: México 1,626, Estados Unidos 2,254, Canadá 280, España 93, Gran Bretaña 39, Francia 12, Alemania 11, Italia nueve, Nueva Zelanda siete, Brasil seis, Japón cuatro, Salvador dos, Panamá tres, Holanda tres, Argentina uno, Australia uno, Austria uno.

En forma comparativa, presentó la curva epidémica registrada en los Estados Unidos de Norteamérica. Allí el brote había comenzado el 28 de marzo de 2009; en el lapso del 15 de abril al 5 de mayo se confirmaron por aislamiento viral o PCR 642 casos humanos; se demostró la circulación del virus A (H1N1)-S-OI α en 41 estados, aunque sólo 36 (9%) enfermos requirieron de hospitalización. El 15 de abril se identificó plenamente el neovirus S-OI α en un niño de San Diego, California; el 17 de abril se confirmó el segundo caso porcino S-OI α y se notificó a la OMS. El 23 de abril el CDC informó a la prensa Internacional sobre la naturaleza del virus y del brote. El 25 de abril la OMS declaró emergencia pública de interés internacional. El 26 de abril la OMS elevó a fase 3 el nivel de alerta, habiéndose confirmado la ocurrencia de «casos esporádicos o grupos de ataque pequeños» causados por el neovirus recombinante de composición genética mixta porcino-aviar-humano. El 26 de abril se declaró alerta sanitaria en los Estados Unidos y al día siguiente la OMS elevó la alerta a fase 4, habiéndose comprobado «la transmisión interhumana continuada», con brotes comunitarios múltiples de envergadura mayor, primeramente ocurrido en una escuela pública de Nueva York que fue cerrada, sin afectar otras actividades de la ciudad. El 29 de abril la OMS declaró fase 5, habiéndose confirmado la epidemia creciente en dos países de la región norteamericana: México y los Estados Unidos. El CDC

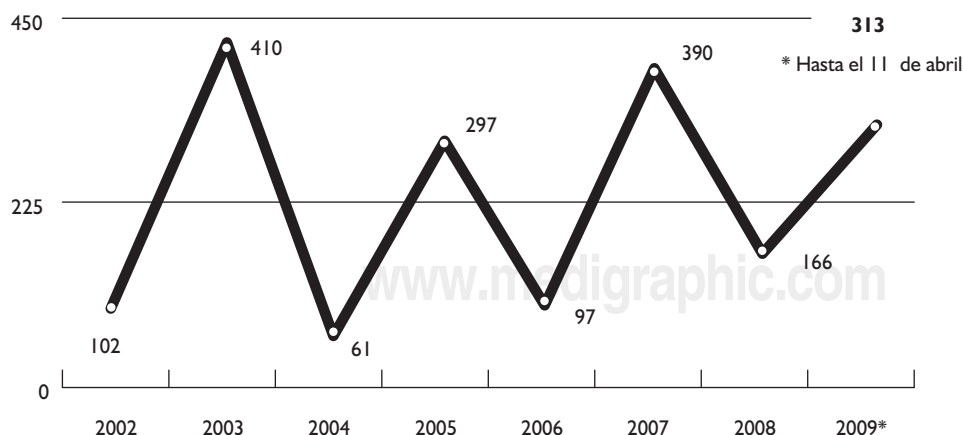
Cuadro VI. Mortalidad proporcional por neumonía grave según edades. Comparación estacional del periodo 2006-2008 contra un periodo bimestral en 2009 (estudio). Estados Unidos Mexicanos.

Edades años	Periodo estacional 2006-2008	Periodo estudiado marzo 24/ abril 29	Razón calculada
0-4	17	5	0.3
5-9	1	5	7.6
10-14	1	6	10.7
15-19	1	7	8.6
20-24	1	13	11.7
25-29	1	11	10.3
30-34	1	9	6.0
35-39	2	15	9.4
40-44	2	9	4.8
45-49	2	5	2.1
50-54	2	4	1.6
55-59	3	3	1.2
60-64	3	0	0.0
65-69	5	1	0.2
70-74	7	2	0.3
75-79	9	2	0.2
> 80	42	3	0.1

Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Secretaría de Salud de México.

aconsejó hacer mayor acopio de información epidemiológica con estudios detallados de laboratorio; hubo pocas hospitalizaciones manejadas con el tratamiento antiviral, y no se recomendó cerrar los sitios de trabajo ni los restaurantes; fueron cerrados temporalmente sólo los locales (escuelas) afectados por el brote. El presidente Barak Obama elaboró una frase muy sensata «No debemos alarmarnos, pero sí debemos estar en alerta».

Del 24 de marzo al 29 de abril de 2009 el SINAVE mexicano reportó 2,155 casos de neumonía grave hospitalizados; en ese mismo periodo, el INDRE procesó 8,817 muestras faríngeas, habiendo resultado positivas para influenza A 3,664 (42%), con una submuestra en la que se confirmó la existencia del virus A (H1N1) S-Ol̄ porcino 2,582 (70%) por el método de transcriptasa inversa-PCR. El grupo etario de 5 a 59 años acaparó 87% de las defunciones registradas (*cuadro VI*) en comparación con sólo 17% de los años epidémicos previos; el incremento relativo fue 11.7 contra sólo 1.2, hubo disminución a sólo 0.3% de las muertes acaecidas en menores de cuatro años y mayores de 60 años, es decir, 71% de las neumonías graves se dieron entre los más jóvenes 5 a 59 años, situación semejante a la registrada en la pandemia



Fuente: Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) México, D.F.

Figura 39. Casos confirmados de influenza en México, 2002-2009. Antes del 2009, en México cocirculaban los virus A (H3N2) estacional, el virus-B y en menor grado el virus A (H1N1) estacional, habiéndose generado brotes epidémicos anuales. El virus «porcino» hizo su aparición en abril-2009, aunque inicialmente no fue reconocida su existencia.

de 1918-19.¹²³ La figura 39 muestra los casos confirmados de influenza durante el lapso comprendido del 1 de enero de 2002 al 11 de abril de 2009, con una máxima de 410 registrados en el periodo invernal 2002-2003. Al comienzo de la pandemia de 2009, México había agotado los 18 millones de vacunas compradas el año anterior.

Las repercusiones socioeconómicas del brote

El Secretario de Turismo mexicano R. Elizondo declaró: «La industria turística es el cuarto generador de divisas. Se ha reportado la cancelación de 64 cruceros, por ello, 134 mil turistas no bajarán a tierra, lo que significa pérdidas de 10 millones de dólares. El Distrito Federal ha resentido con más fuerza la baja de visitantes, la ocupación turística-hotelera es apenas 14%» (periódico *Reforma* 2/mayo/2009).

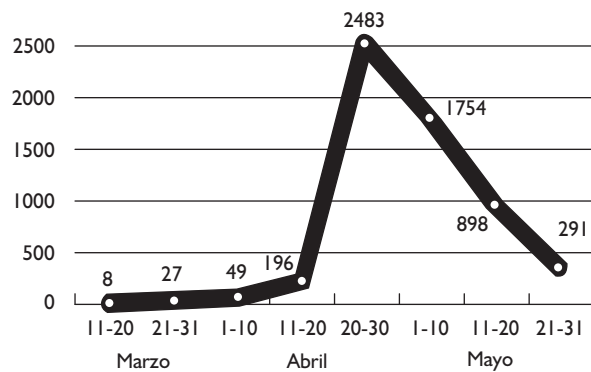
El 8 de mayo la inflación llegó a 6.17%. En abril de 2008 el precio de la canasta básica de: aceite, arroz, café soluble, bistec, chiles procesados, huevo, jamón, leche, tortilla, jitomate, cebolla, pollo, frijol, refresco, pan de caja, bolillo y sopa costaba 417 pesos contra 479 en abril de 2009, causado principalmente por las compras de pánico y la alerta por la influenza (periódico *Reforma* 8/mayo/2009). El resultado neto fue un incremento en los precios de los alimentos, blanqueadores de cloro, pañuelos desechables, y disminución drástica del producto bruto interno a -7.0, situación nunca vista en los últimos 15 años.

En 2004 llegaron al aeropuerto de Cancún, Q. R. 10.1 millones de pasajeros y en 2008 12.8 millones (incremento de 26%). La Sra. Sara Latife, Secretaria Estatal de Turismo, señaló: «El impacto de la alerta sanitaria ha sido muy fuerte, en tan sólo diez días, de los 120 mil turistas extranjeros que había en la entidad salieron 115 mil, con pérdida diaria de 10 millones de dólares. Más de 12,700 habitaciones quedaron fuera de servicio, habiéndose originado 30 mil despidos. La econo-

mía de Cozumel, dependiente de los cruceros, quedó paralizada (periódico *Reforma* 13/mayo/2009). Durante la semana del 4 al 10 de mayo la ocupación hotelera del país descendió 22.2%, fue aún más baja en San Juan de los Lagos, Jalisco, 4%, y en la ciudad capital de Guanajuato 9%. De manera global, la caída en los niveles de ocupación hotelera nacional fue 62%, en comparación con el mismo periodo del 2008 (periódico *Reforma* sábado 16/mayo/2009). El 29 de mayo, Daniel Karam, Director del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), aseguró que la epidemia había generado gastos extra por 600 millones de pesos; tan sólo la adquisición de antivirales costó 434 millones, además de los materiales necesarios para protección del personal y atención de los enfermos graves, y por pagos de horas extra al personal se gastaron 68 millones. Adicionalmente el IMSS dejó de recaudar 800 millones de pesos, y 213 mil trabajadores que fueron dados de baja, dejaron de pagar cuotas (periódico *Reforma* viernes 20/mayo/2009).

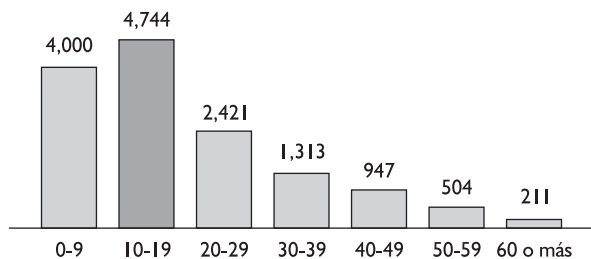
Morbilidad y mortalidad en México

La pandemia en México comenzó con un brote primaveral de febrero a abril de 2009; pronto alcanzó el pico máximo 2,483 casos y descendió en la primera semana de mayo, estabilizándose con 291 casos semanales (figura 40). El descenso coincidió con el cierre por decreto de las escuelas, centros laborales, bares, restaurantes, playas, cines, teatros, estadios, centros deportivos-culturales, oficinas del gobierno y del sector privado. Quedaron exentos los mercados, las tiendas de autoservicio, el transporte público y los aeropuertos. La epidemia temprana afectó principalmente la Ciudad de México, el Estado de México, Tlaxcala e Hidalgo. La distribución por edades de los casos notificados y confirmados del trimestre abril-julio se muestra en la figura 41. Los grupos de edad más atacados, en orden de importancia



Fuente: Secretaría de Salud.

Figura 40. Onda primaveral de la influenza pandémica en México. Inició el 11 de abril de 2009 y alcanzó su pico máximo en la última semana de abril. El brote pareció desacelerarse en mayo, aunque el virus porcino continuó propagándose hacia los estados del país.



Fuente: Secretaría de Salud.

Figura 41. Casos confirmados de influenza A (H1N1). Distribución por grupos de edad. México, marzo-julio de 2009. El grupo joven de 10-29 años fue más atacado por la influenza porcina pandémica. En México, los menores de cinco años acarrearon la infección dentro del hogar. Probablemente los más jóvenes y niños carecían de inmunidad protectora y muchos nunca habían sido vacunados contra la influenza.

numérica fueron: 10 a 19 años 4,744 (33.5%), 0 a 9 años 4,000 (28.3%), 20 a 29 años 2,421 (17.1%), es decir, el contagio mayor se dio entre los jóvenes y niños.

En la República Mexicana el virus porcino continuó propagándose hacia cuatro focos: a) Los estados del sureste: Yucatán, Quintana Roo y Tabasco, b) El Centro Occidental: Jalisco, Zacatecas y Nayarit, c) El Noreste: Nuevo León y Ta-

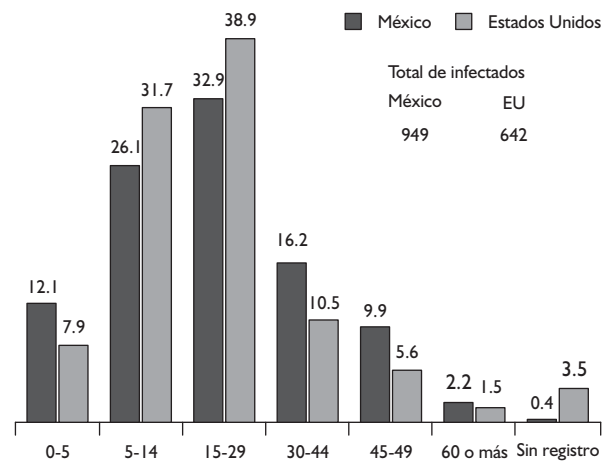


Figura 42. Pacientes con influenza A (H1N1) en México y Estados Unidos. Porcentaje por edades. Cifras del 1 de marzo al 5 de mayo de 2009. El grupo de 15-49 años de edad fue el más atacado en ambos países, situación semejante a lo ocurrido en la pandemia 1918. Fuente: Informe Semanal de Morbimortalidad, Departamento de Salud de los Estados Unidos de América.

maulipas, d) Sonora en el Noroeste, además del pequeño estado de Morelos, vecino al Distrito Federal. La figura 42 muestra gráficamente los porcentajes de las personas contagiadas según edades en México y en los Estados Unidos: los grupos más atacados en orden de importancia fueron los de 15 a 19 años, 5 a 14 años y 30 a 44 años con 10.5 a 16.2%, sin embargo, los menores de cinco años fueron también afectados en ambos países, pero más los de México 7.9 a 12.1%.

Durante el regreso a la escuela, el 6 de mayo, se limpiaron y desinfectaron casi todos los establecimientos; sin embargo, hubo ya 28 estados de la república afectados por el brote con un total de 1,626 casos confirmados por laboratorio a nivel nacional, de los cuales 908 (55.8%) fueron de México Distrito Federal, seguido por el Estado de México 123 (7.6%), San Luis Potosí (6.5%), Hidalgo 99(6.1%) y Veracruz (2.7%) (figura 43). El Laboratorio del INDRE había ya realizado 5 mil 580 pruebas de laboratorio y diariamente se procesaban 800 más para confirmar la presencia del virus. Del 8 de abril al 7 de mayo de 2009 se

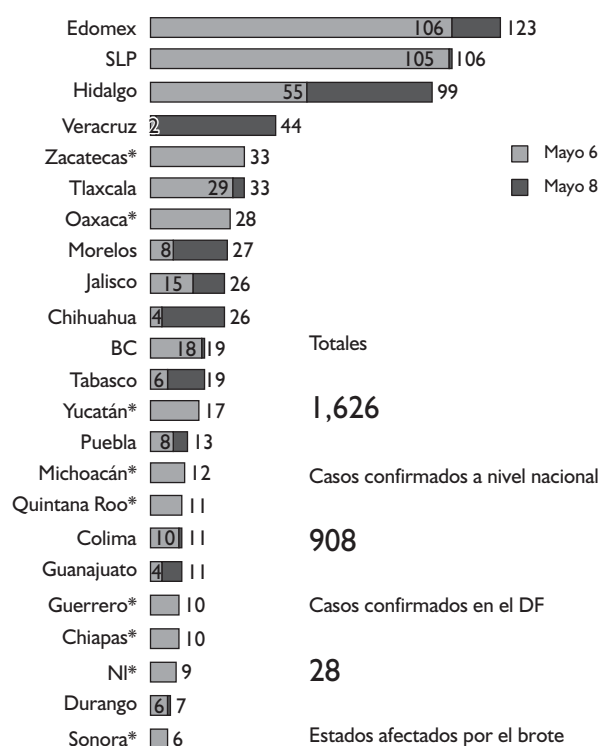


Figura 43. Distribución geográfica de la influenza en la República Mexicana. El Distrito Federal fue el más afectado (908 casos). Las entidades con más casos fueron el Estado de México, San Luis Potosí e Hidalgo. Fuente: Secretaría de Salud.

acumularon 42 defunciones por influenza, fueron más afectados los jóvenes de 20 a 39 años (figura 44).

Al regresar a las clases la Secretaría de Salud recomendó: la limpieza exhaustiva con agua y jabón de 244,347 planteles escolares (aunque muchos no tienen aulas, ni disponen de agua limpia). Se indicó también aplicar un cuestionario y filtro sanitario, el uso obligado de cubrebocas, además del lavado de manos. En la *Gaceta Oficial del Distrito Federal* se publicaron los requisitos sanitarios mínimos para restaurantes y establecimientos públicos: «El aseo de los baños cada hora y la obligación para meseros y empleados de usar cubrebocas, no usar corbatas, hacer limpieza y desinfección constantes de los enseres de mesa». En los autobuses se deberá utilizar ocho cucharadas soperas del desinfectante por litro de agua, y en los actos

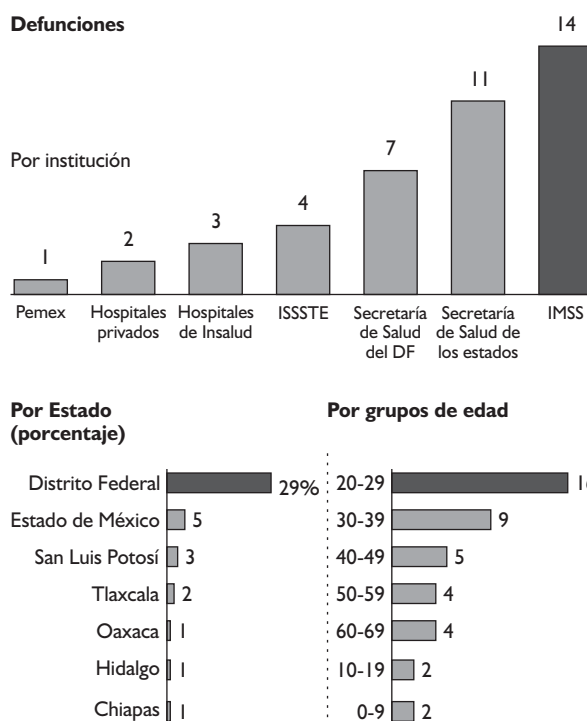


Figura 44. Muertes por influenza A (H1N1) confirmadas en México registradas del 8 de abril al 7 de mayo de 2009. La mortalidad fue mayor en el grupo de 20-39 años. El Distrito Federal aportó el mayor número de defunciones. Fuente: Secretaría de Salud.

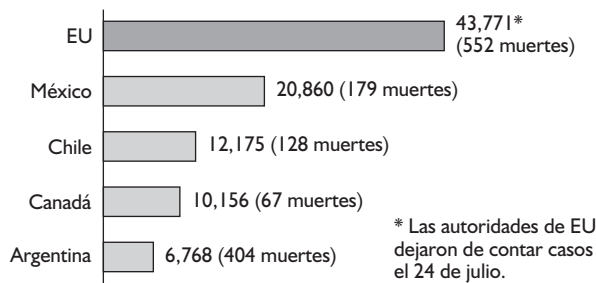
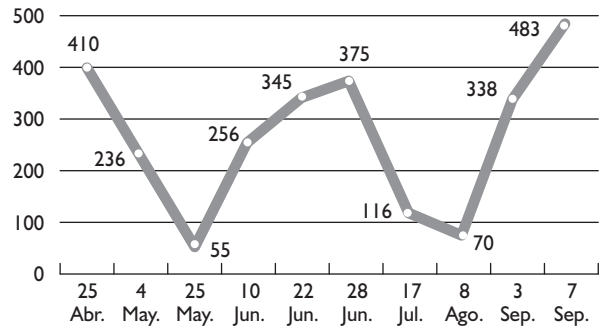


Figura 45. Países de América con incidencia mayor de influenza A (H1N1) confirmada. Periodo del 1 de abril al 15 de agosto de 2009. De acuerdo con los datos proporcionados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), al 15 de agosto, los Estados Unidos, México y Canadá acumularon 74,787 casos de influenza A (H1N1) confirmados por laboratorio, pero la letalidad más alta (5.97%) se registró en Argentina.

Argentina tuvo 6,768 casos, pero la letalidad registrada fue la más alta: 5.97%, a pesar de que tal país ordenó suspender todos los vuelos procedentes de México (Información de la OPS/OMS). La segregación y el aislamiento protegen sólo temporalmente, lo más efectivo es educar a la población y promover vigorosamente la vacunación protectora, con oportunidad.

Del 25 de mayo al 8 de agosto de 2009 ocurrió en México la segunda onda epidémica, con pico máximo de 375 casos el 28 de junio, al haberse desplazado el virus hacia todos los estados del país. En la primera semana de septiembre, los niños regresaron a las escuelas y llovió durante una semana, iniciándose la tercera onda otoñal, más violenta y mortífera, producto probable del mayor contacto humano y de la humedad ambiental (figura 46). El año 2009 fue extremadamente seco y caliente con promedio diario de 30 a 33 °C. Se sabe que la humedad ambiental y el frío favorecen la propagación del virus, aunque tiene mayor peso el movimiento de los niños y jóvenes en las escuelas como acarreadores de la infección, así como la falta de inmunidad específica protectora.¹²⁰

Para el 14 de agosto de 2009, la epidemia mexicana se había desplazado hacia los estados más



Casos acumulados
27,700 al 22 de sept.

29,417 al 24 de sept.

Figura 46. Casos de influenza A (H1N1) acumulados. Abril-septiembre de 2009. La segunda curva del muy seco verano bajó cuando los niños y jóvenes abandonaron las escuelas (17 de julio) y fue seguida por una tercera onda otoñal que coincidió con el regreso a las aulas y el inicio de la estación lluviosa a comienzos de septiembre. Del 22 al 24 de septiembre se acumularon 1,717 casos y subieron también las defunciones registradas. Fuente: Secretaría de Salud.

pobres y marginados del Sureste, principalmente Chiapas con 3,239 casos, lo mismo que a Yucatán (2,541), Tabasco (903), Veracruz (933) y la capital de Jalisco (1,183) junto con la zona conurbada del estado. El brote continuó, aunque en menor grado, en el DF y Estado de México. Del 30 de julio al 18 de agosto (dos semanas) hubo 2,419 casos confirmados con pruebas de laboratorio. Al 22 de septiembre, en el país se habían acumulado 222 defunciones por influenza; el DF registró 54 (24.3%) muertes, Chiapas 35 (15.8%), el Estado de México 25 (11.3%), San Luis Potosí 10 (4.5%), Jalisco 10 (4.5%), Oaxaca, Yucatán y Guerrero nueve (4.1%) defunciones cada uno y Tamaulipas ocho (3.6%).

Al 22 de septiembre se hizo un análisis comparativo de las defunciones registradas por grupos de edad en México y los Estados Unidos de Norteamérica (figura 47). En ambos países, fue mucho más afectado el grupo de 25 a 49 años. Se registraron más muertes en personas de 50 a 64 años 11.9-24% y que en las mayores de 65 años. En México las muertes de niños menores de cuatro años fueron 4.6 veces mayores que en los

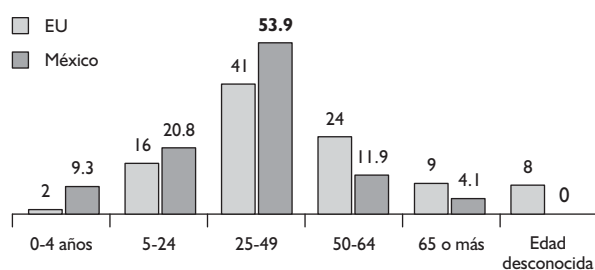


Figura 47. Análisis de la mortalidad registrada en México y Estados Unidos del 8 de abril al 22 de septiembre de 2009. Distribución porcentual por edades. Fuente: Secretaría de Salud y CDC/Atlanta. El grupo joven (25-49 años) fue el más afectado. En México murieron más niños preescolares que en Estados Unidos (efecto pobreza + desnutrición).

Estados Unidos. Estas consideraciones son de importancia para seleccionar los grupos blanco de la vacunación. El Secretario de Salud señaló: en otros años las infecciones respiratorias representaban 2% de las muertes maternas, ahora se han incrementado 12 a 13%, por ello, las mujeres embarazadas son el segundo grupo a ser vacunada (a.m. Sección A. 14 Nov. 2009 p5). Hasta el 11 de noviembre se habían registrado 61,633 casos confirmados y 482 defunciones causadas por el neovirus A(H1N1). De los fallecidos, 36.7% presentó diabetes mellitus tipo II descontrolada u otro padecimiento metabólico, 16.4% tuvieron bronquitis crónica y enfisema causados por el tabaquismo, 9.3% padecían enfermedades cardiovasculares y 6% asma bronquial y otras neumopatías. Para esa fecha, la tercera ola de influenza parecía estar a la baja; sin embargo, al comienzo de noviembre se incrementó el frío y aumentaron las defunciones en Hidalgo 82 con 1,735 casos, Nuevo León 46, Jalisco 54, Sonora 29, Baja California 23, Estado de México 22, Querétaro 35, Aguascalientes 32, Yucatán 19, Sonora 29, es decir, la epidemia se desplazó hacia los estados de la frontera Norte. El Gobierno planeó iniciar la vacunación el 23 de noviembre, empezando por el personal de salud y las embarazadas. El *cuadro VII* marca los casos confirmados y las defunciones registrados hasta el 4 de noviembre de 2009.

Cuadro VII. Casos y defunciones atribuibles al virus de la influenza A (H1N1) registrados en la República Mexicana del 1 de abril al 4 noviembre de 2009.

Grupo de edad (Años)	Casos*		Defunciones	
	n	%	n	%
0-4	5,736	10.56	33	8.29
5-9	8,636	15.90	22	5.52
10-19	16,844	31.02	25	6.28
20-29	10,121	18.64	80	20.10
30-39	5,565	10.25	90	22.61
40-49	3,873	7.13	77	19.35
50-59	2,243	4.13	51	12.81
60 y más	928	1.70	20	5.02
No especif.	325	0.59	0	0.00
Total	54,298	100.00	398**	100.00

* Sólo se realiza prueba de laboratorio a 10-30% de los contagiados.

** Letalidad 0.73%

Fuente: Secretaría de Salud de México.

El agente causal del brote pandémico 2009

47

El virus porcino (swine) clásico A (H1N1) estaba circulando en Norteamérica desde 1930 o antes. En 1998 se identificó el triple recombinante porcino (TRP), con cinco genes derivados del clásico, más dos segmentos de las polimerasas PB-2 y PA procedentes del aviar norteamericano, y el PBI venía del humano estacional predominante H3N2 (*figura 48*). En abril de 2009, el CDC identificó dos aislamientos procedentes de casos humanos de California,¹²⁰ Estados Unidos: este neovirus llevaba el genoesqueleto básico del TRP, pero los segmentos NA y M mostraron afinidad genómica con el linaje porcino euroasiático de procedencia primaria aviar (pato) (*figura 49*). La nueva cepa pandémica siglada convencionalmente S-OlŃ, es indistinguible del virus A/México/IN-DRE 4487/2009 (H1N1) aislado en un paciente de la Ciudad de México, DF. El análisis detallado del gen M demostró la mutación de la serina-31 por asparragina; esa circunstancia confirmó al neovi-

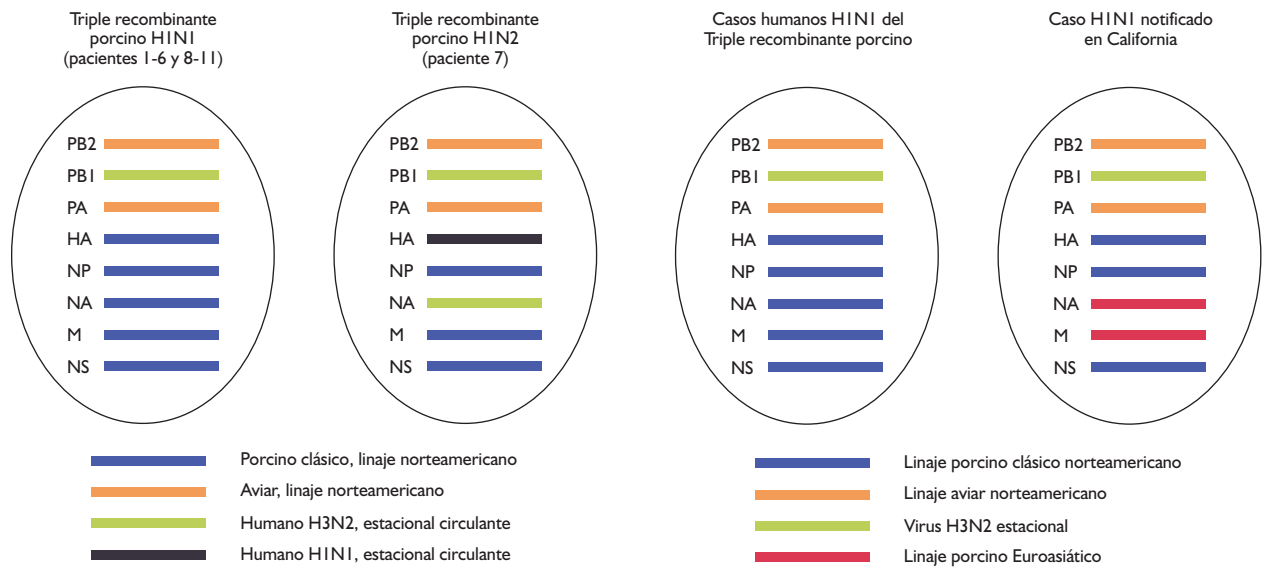


Figura 48. Componentes genéticos del virus porcino triple recombinante (TR) aislado de 11 casos humanos entre diciembre de 2005 y febrero de 2006 en los Estados Unidos. El virus H1N2 lleva la neuraminidasa (NA) procedente del H3N2 estacional, que no está presente en el H1N1.

Figura 49. Comparación de genotipos de H1N1 en casos recientes en los Estados Unidos. El neovirus H1N1-5-OI03 notificado en California-2009 lleva el genesqueleto del triple recombinante porcino H1N1, con dos genes nuevos NA y M importados del linaje porcino Euroasiático. Este virus, aislado también en México, ha sido causante de la pandemia en curso.

48

rus resistencia frente a los fármacos bloqueadores del M2, incluso amantadina y rimantadina. En el periodo 2008-2009 las cepas de influenza A estacional H1N1 aisladas en los Estados Unidos eran resistentes al oseltamivir; sin embargo, el examen genético y fenotípico demostró que el neovirus pandémico S-OI03-2009 sí era susceptible al oseltamivir y zanamivir, por tanto, el CDC recomendó reservar la terapia antiviral con inhibidores de la neuraminidasa para los enfermos hospitalizados o con riesgo alto de complicaciones. También se autorizó el uso de tales medicamentos en 102 niños menores de un año como tratamiento de la influenza, o para quimiopprofilaxis en niños con tres meses de edad o más.^{121,122}

El apellido inicial del neovirus A como «porcino» causó en México dificultades y pérdidas económicas: La población mexicana afectada elaboró la frase: «Cría puercos iy te sacarán los mocos!» y, se habló también de estarse sufriendo un «puer-calipsis». Al diagnosticarse la llamada «influenza porcina», varios países entre ellos Japón, cerra-

ron las puertas a la compra de carne mexicana de puerco. En México, el consumo nacional interno cayó de inmediato 50%, dejaron de venderse 40 toneladas del producto y se despidió a 30% de los trabajadores en la industria porcícola. Las pérdidas globales por este concepto sumaron más de 47 millones de pesos.

Discusión

Las epidemias de influenza son como las inundaciones causadas por los huracanes de Tabasco: todas son malas y dañinas. Algunas resultan ser mucho peores y, a pesar de los preparativos, prevenciones e inversiones, siempre generan una buena cosecha de enfermedades respiratorias inesperadas y muertes. En los Estados Unidos cada año mueren de 30,000 a 50,000 personas infectadas por los virus A y B circulantes; la mortandad mundial es 20 o 30 veces mayor. Cuando hay

escasez de vacunas, la gente grita y clama protección.^{24,25} Desafortunadamente, la capacidad de los laboratorios para producir vacunas inactivadas es limitada y lenta (seis meses). En el 2009, Estados Unidos (país rico y tecnológicamente preparado) comenzó a vacunar a comienzos de octubre; a fines de noviembre, México (país tecnológicamente atrasado y sin laboratorio de producción vacunal propio) apenas iniciaría la vacunación del personal de salud y de las embarazadas; ese retardo implica descuido, falta de interés de los políticos y directivos, pobreza de metas y mala planeación. Para revertir ese grave mal, se requiere educar a la población, motivándola, reinvertir en acciones preventivas más que curativas y, promover vigorosamente la educación de los médicos y del personal de salud. La influenza no se detiene con discursos ni promesas de cambio, se requiere poner en marcha el Laboratorio Nacional Productor de Vacunas (inversión estratégica), reforzar la vigilancia epidemiológica y fortalecer la investigación virológica con apoyo de las universidades y de médicos jóvenes y talentosos: el estudio de la virología médica es actividad muy necesaria para el país y ciertamente gratificante. Este trabajo es una invitación abierta, encomendada a promover lo que mucho se necesita para salir adelante y mejorarnos.^{115,123,124}

Como he intentado demostrar, el virus A (H1N1) no se extingue, simplemente cambia genes y mejora sus probabilidades de supervivencia,¹⁰⁴ a veces, se hace protagonista y mata más, recogiendo la mayor cosecha de víctimas entre los inmunodeficientes, las embarazadas, los fumadores y cardiopatas y, sobre todo, entre aquellos que no están vacunados; si bien las vacunas tienen algún riesgo pequeño, son mucho mayores los beneficios.^{125,126} Vacunar es un riesgo calculado que se intenta minimizar,^{1,126} los médicos inteligentes deben dedicar más de su tiempo en educar a los pacientes, promover la inmunización de aquellos con alto riesgo, usar racionalmente los antivirales inhibidores de la neuraminidasa sin des-

perdicios y mantenerse alertas, bien informados. Ese es el propósito de este trabajo que sale a la luz, sin ningún interés político, económico o sectorial. Lo he llevado a cabo sólo con la pensión que generosamente me otorga el IMSS, y con el apoyo decidido del Dr. E. Navarrete, amigo fiel y editor brillante de la *Revista Mexicana de Patología Clínica*.

El papel del laboratorio es fundamental: muestras bien tomadas, procesamiento rápido con técnica de alta calidad, y no hay ninguna razón para descartar el uso de las pruebas rápidas. En Rochester, Minnesota, se han usado pruebas rápidas DP durante muchos años con buenos resultados (Newton DW Abstract Annual Meeting Amer Soc Microbiol, Chicago, H, 1999. Abstract c-319).

La investigación virológica es fuente de riqueza conceptual y avance tecnológico, con aplicación práctica y puede ser también una fuente de divisas, que mucho necesitamos. El CONACYT debería promover la investigación específica de la influenza, la formación de virólogos y genetistas moleculares. En Irapuato, Guanajuato, está un Laboratorio de Genética Vegetal del CINVESTAV bien equipado y mejor dispuesto; allí podría extenderse el estudio profundo de la influenza humana y animal, eso sería aprovechar con ventaja lo existente que funciona bien. Es lamentable el desinterés manifiesto de la Secretaría de Agricultura y Ganadería que ha permanecido callada y sin participación, y las Escuelas de Medicina Veterinaria que han hecho tan poco para promover la salud de los cerdos en particular. En México, han crecido los criaderos masivos de cerdos para engorda insalubres y mal manejados como el de «La Gloria»; los puercos son transportados en condiciones de hacinamiento terribles e inhumanas y, se han hecho poquísimos estudios sobre la influenza porcina y aviar que no son ajenas a los males que afligen a los humanos.⁸⁶ El virus S-OIŃ lleva genes procedentes del cerdo norteamericano y del linaje euroasiático; no sabemos cómo ni cuándo se recombinaron, pero sí sabemos que pue-

den causar una pandemia, tan grave como la que hoy sufrimos.¹²⁰⁻¹²² Los políticos han negado el origen porcino, aunque la ciencia afirma lo contrario.¹²² Se requiere pensar, reflexionar y usar correctamente el saber existente.^{127,128} Es inútil discutir si el virus partió de «La Gloria» o de México DF, pero sí es verdad que los virus porcinos TR circulaban en los Estados Unidos desde 1977-2009, también es cierto que las aves y los cerdos hacinados y maltratados pueden transmitir la infección a los humanos y viceversa.¹²⁷⁻¹³⁰ Lo importante es fomentar el estudio profundo y continuado de la influenza animal, como un modo seguro de avanzar en el conocimiento de la enfermedad, que seguramente ha estado presente desde tiempos remotos, y seguirá existiendo mientras el hombre conviva con los animales domésticos y silvestres portadores de los virus A y B.¹²⁴

El estudio de la patogenia es un capítulo abierto. Sabemos algo, pero ignoramos más; tampoco sabemos el porqué una cepa se propaga pandémicamente, ni se conoce el mecanismo molecular que facilita la adaptación de un virus animal en patógeno humano. La vacuna inactivada preparada con una mezcla de las clades es buena y segura; existen también las vacunas vivas atenuadas recomendables para los niños. La influenza es un campo vasto y fértil, donde mucho se puede cosechar; ojalá los investigadores de México le presten mayor atención, seguramente hallarán mucho donde trabajar. Es deseable formar grupos interdisciplinarios, motivados y entusiastas; con espíritu de servicio y amor por la camiseta. La intención de este trabajo modesto y preliminar: generar una discusión crítica, constructiva y muchos trabajos de investigación, que aporten nueva luz y conocimiento profundo.

Agradecimientos

El trabajo es un homenaje póstumo a mis brillantes mentores en virología médica: Prof. Dr. Noel

Griest, Director, Ruhill Institute of Medical Virology, Glasgow University, Escocia, en su laboratorio aprendí a cultivar, diagnosticar y titular el virus de la influenza porcina. Prof. Dr. A. P. Water-son, Director and Professor Department of Medical Virology and Electronmicroscopy, London University, The Royal Postgraduate Medical School, bajo su dirección comencé a estudiar la ultraestructura del virus de la influenza, en el laboratorio inicié la preparación de los anticuerpos fluorescentes específicos y, el estudio morfológico de la influenza experimental en ratones y hurones, ambos fueron maestros excelentes. No hubiera podido realizar esta investigación sin el apoyo generoso de los colegas: La Dra. Nancy J. Cox y el Dr. W.W. Thompson, del CDC en Atlanta, GA, quienes me facilitaron su rico archivo epidemiológico de varios años. El Dr. Robert G. Webster, Division of Virology, St. Jude's Childrens Research Center en Memphis, TEN, me prestó su acervo de influenza aviar y mi Secretario particular el Señor Juan Emmanuel Jiménez Rodríguez quien me auxilió gentilmente en elaborar los textos, las figuras y gráficas y otros materiales científicos usados para el diseño y construcción del trabajo ilustrado. A todos ellos mi gratitud eterna y afecto sincero.

Referencias

1. Salomon R, Webster RG. Cell 2000; 136: 402-410.
2. Nicholson KG. Human influenza. In: Nicholson KG, Hay AJ, Webster RG (eds). Textbook of influenza. Boston: Blackwell Science; 1998. p. 222-246.
3. Kilbourne ED. The influenza viruses and influenza London: Academic Press; 1975. p. 1-539.
4. Shope RE. Swine influenza I. Experimental transmission and pathology. J Exp Med 1931; 54: 349-372.
5. Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. A virus obtained from influenza patients. Lancet 1933; 2: 66-68.
6. Francis T Jr. A new type of virus from epidemic influenza. Science 1940; 92: 405-408.
7. Magill TP. A virus from cases of influenza-like upper. Respiratory infection. Proc Soc Exp Biol Med 1940; 45: 162-164.
8. Burnet FM. Growth of influenza virus in the allantoic cavity of the chick embryos. Aus J Exp Biol Med Sci 1941; 19: 291-295.
9. Hirst GK. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. Science 1941; 94: 22-23.

10. Laver WG. Structural studies of the protein subunits from three strains of influenza virus. *J Mol Biol* 1964; 9: 109-124.
11. Laver WG, Webster RG. Studies on the origin of pandemic influenza. 2. Peptide maps of the light and heavy polypeptide chains from the hemagglutinin subunits of A2-influenza viruses isolated before and after the appearance of Hong-Kong influenza. *Virology* 1972; 48: 445-447.
12. Kilbourne ED. The molecular epidemiology of influenza. *J Infect Dis* 1973; 127: 478-487.
13. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawoka J. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992; 56: 152-159.
14. Nicholson KL, Wood JM, Zambon M. influenza Seminar). *Lancet* 2003; 362: 1733-1745.
15. Manjarrez-Zavala ME, Arenas-López G. Virus influenza: Enigma del pasado y del presente. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1999; 12: 290-299.
16. Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ (eds). *Textbook of Influenza*. Oxford: Blackwell Science; 1998.
17. Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza virus in pigs. *Vet Microbiol* 2000; 74: 29-46.
18. Ito TY, Kawoka J. Host-range barrier of influenza A viruses. *Vet Microbiol* 2000; 74: 71-75.
19. Suarez DL. Evolution of avian influenza viruses. *Vet Microbiol* 2000; 74: 15-27.
20. Sway DE. Understanding the ecology and epidemiology of avian influenza viruses: implication for zoonotic potential. Chapter 6. In: Brown C, Bolin C. *Emerging Diseases of Animals*. Washington DC: ASM Press; 2000.
21. Zimmer SM, Burke DS. Historical perspective-emergence of influenza A (H1 N1) viruses. *N Engl J Med* 2009; 361: 279-285.
22. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. The persistent legacy of the 1918 influenza virus. *N Engl J Med* 2009; 361: 225-229.
23. Tambaut A, Pybus OG, Nelson MI, Viudoute C, Taubenberger JK, Holmes EC. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza virus. *Nature* 2008; 453: 615-619.
24. Shope RE. The incidence of neutralizing antibodies for swine influenza virus in the sera of human beings of different ages. *J Exp Med* 1936; 36: 669-684.
25. Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Tauberger JK, Paulson JC, Wilson IA. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5 N1 influenza virus. *Science* 2006; 312: 404-410.
26. Nelson MI, Viboud C, Simonsen L. Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1 N1 influenza A virus since 1918. *Plos Pathog* 2008; 360: 2605-2615.
27. Wright PF, Newman G, Kawoka J. Orthomyxovirus. In: Knipe DM, Howley PM. eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 1961-2740.
28. Novel Swine-Origin Influenza A (H1 N1) Virus Investigation Team. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1 N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009; 360: 2605-2615.
29. Garten RJ, Davis CT, Russell CA. Antigenic and genetic characteristic of swine – origin 2009 A (H1 N1) influenza virus circulating in humans. *Science* 2009; 8-16.
30. Newman AP, Reisdorf E, Beinemann J. Human case of swine influenza A (H2 N1) triple reassortant virus infection, Wisconsin. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1470-1472.
31. Ramírez SH. Aislamiento e identificación del virus de la influenza porcina en México. Tesis de Licenciatura. México, DF: Fac Med Vet Zoot, UNAM; 1981.
32. Cortez AE. Frecuencia del virus de la influenza porcina en pulmones de cerdos afectados por neumonía. Tesis de Licenciatura. México, DF: Fac Med Vet Zoot, UNAM; 1985.
33. Rodríguez TJ, Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC. Muestreo serológico a nivel de rastro para detectar anticuerpos contra el virus de la influenza porcina. *Vet Mex* 1996; 27: 17-21.
34. Álvarez-Fleitez M, Rodríguez BJC, Ciprián-Carrasco A, Rodríguez GL, Ayora TG, Segura CJ. Perfil serológico del virus de influenza porcina, *Mycoplasma hypopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en granjas de Yucatán, México. *Vet Mex* 2004; 35: 295-305.
35. Writing Committee of the Second World Health Organization Consultation on Clinical Aspects of Human Infection with Avian Influenza A (H5 N1) Virus. *N Engl J Med* 2008; 358: 261-273.
36. Webster RG, Govorkona EA. H5 N1 Influenza-continuing evolution and spread. *N Engl J Med* 2006; 355: 2174-2177.
37. Peiris JS, Yu WC, Leung CW. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5 N1 disease. *Lancet* 2004; 363: 617-619.
38. Hulse PDJ, Sturm RKM, Humberd J. Role of domestic duck in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5-N1 influenza viruses in Asia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 10682-10687.
39. Noble GR. Epidemiological and clinical aspects of influenza. In: Beare AS ed. *Basic and applied influenza research*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1982. p. 11-50.
40. Taubenberger JK, Morens DM. Pandemic influenza – including a risk assessment of H5 N1. *Rev Sci Tech* 2009; 28: 187-202.
41. Parrish CR, Holmes EC, Morens DM. Cross-species virus transmission and emergence of new epidemic diseases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; 72: 457-470.
42. Wright PF, Ross KB, Thompson J, Karzon DT. Influenza A infection in young children. *N Engl J Med* 1977; 296: 829-834.
43. Wright PF, Bryant JD, Karzon DT. Comparison of Influenza B/Hong Kong virus infection among infants, children, and young adults. *J Infect Dis* 1980; 141: 430-435.
44. Woodwall J, Rowson KEK, McDonald JC. Age and Asian influenza. *BMJ* 1957; 1958: 1316-1318.
45. Paisley JW, Bruhn FW, Lauer BA, McIntosh L. Type A 2 influenza virus infection in children. *Am J Dis Child* 1978; 132: 34-36.
46. Price DA, Postlethwaite RJ, Longson M. Influenza virus and gastrointestinal symptoms in young children. *Clin Pediatr* 1976; 15: 362-367.
47. Dagan R, Hall CB. Influenza A virus infection imitating bacterial sepsis in early infancy. *Pediatr Infect Dis J* 1984; 3: 218-221.
48. Noble GR. Epidemiological and clinical aspects of influenza. In: Beare AS ed. *Basic and applied influenza research*. Boca Raton: CRC Press; 1982. p. 11-50.
49. Neuzil KM, Reed GW, Mitchell EF, Simonsen L, Griffin MR. Impact of influenza on acute cardiopulmonary hospitalization in pregnant women. *Am J Epidemiol* 1998; 148: 1094-1102.
50. Ferson MJ, Morton JR, Robertson PW. Impact of influenza on morbidity in children with cystic fibrosis. *J Pediatr Child Health* 1991; 27: 308-311.
51. Minor ME, Dick EC, Baker JW, Ouellette JJ, Cohen M, Reed CE. Rhinovirus and influenza A infections as precipitants of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1976; 113: 149-153.
52. Fujimoto S, Kobayashi M, Uemura O. PCR on cerebrospinal fluid to show influenza associated acute encephalopathy or encephalitis. *Lancet* 1998; 352: 873-875.
53. McCullers JA, Facchini S, Chesney PJ, Webster PG. Influenza B-virus encephalitis. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 898-900.
54. McDonald KL, Osterholm MT, Hedberg CW. Toxic shock syndrome: a newly recognized complication of influenza and influenza-like illness. *JAMA* 1987; 257: 1053-1058.

55. Gerberding JL, Morgan JG, Shepard JA, Kradin RL. Case 9-2004: An 18 year-old man with respiratory symptoms and shock. *N Engl J Med* 2004; 350: 1236-1247.
56. Ebell MH, White LL, Casault T. A systematic review of the history and physical examination to diagnose influenza. *J Am Board Fam Pract* 2004; 17: 1-5.
57. Carrat F, Tachet A, Rouzioux C, Housset B, Valeron AJ. Evaluation of clinical case definition in influenza: detailed investigation of patients during the 1955-1996 epidemic in France *Clin Infect Dis* 1999; 28: 283-290.
58. Deville WL, Buntix F. Guidelines for conducting systematic reviews of studies evaluating the accuracy of diagnostic tests. In: Knotterus JA (ed). *The Evidence Base of Clinical diagnosis*. London, England: BMJ Books; 2002. p. 156-159.
59. Rodríguez WJ, Schwartz RH, Thome MM. Evaluation of diagnostic tests for influenza in a pediatric practice. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 193-196.
60. Magnard C, Valette M, Aymard M, Linda B. Comparison of two nested PCR, cell culture, and antigen detection for the diagnosis of upper respiratory tract infections due to influenza viruses. *J Med Virol* 1999; 59: 215-220.
61. Call SA, Vollenweider MA, Hornung CA, Simel DL, Mc Kinney WP. Does This Patient Have Influenza *JAMA* 2005; 293: 987-997.
62. Mizgerd JP. Acute Lower Respiratory Tract Infection. *N Engl J Med* 2008; 358: 716-727.
63. Cheung CY, Poon LLM, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shhortridge KF y cols. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5-N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease. *Lancet* 2002; 360: 1831-1837.
64. Lucke B, Wight T, Kime E. Pathologic anatomy and Bacteriology of influenza: epidemic of autumn, 1918. *Arch Intern Med* 1919; 24: 154-237.
65. Oseasohn R, Adelson L, Kaji M. Clinic pathologic study of thirty three cases of Asian influenza. *N Engl J Med* 1959; 260: 509-518.
66. Yeldandi A, Colby TV. Pathologic features of lung biopsy specimens from influenza pneumonia cases. *Hum Pathol* 1994; 25: 47-53.
67. Craghead JE. *Pathology and pathogenesis of human viral disease*. San Diego, Cal: Academic Press; 2000.
68. Mulder J, Hers JF. *Influenza. The Netherlands: Wolters Noordhoff Pub Gronigen*, 1972: 1-300.
69. Gu J, Xie Z, Gao Z. H5-N1 infection of the respiratory tract and beyond: a molecular pathology study. *Lancet* 2007; 370: 1137-1145.
70. Uiprasertkul M, Kitphati TC, Pathavatha P. Apoptosis and pathogenesis of avian influenza A (H5-N1) virus in humans. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 708-712.
71. Neg WF, Lam WWL, Ng TK, Lee KC. The comparative pathology of severe acute respiratory syndrome and avian influenza A subtype H5-N1 a review. *Hum Pathol* 2006; 37: 381-390.
72. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006; 440: 435-436.
73. He X, Zhou J, Bartlam M, Zhang R, Ma J, Lou Z et al. Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB-1. 2008; 454: 1123-1126.
74. Cheung CY, Poon LL, Lau AS, Lau Y L, Shortridge KF y cols. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5-N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet* 2002; 360: 1831-1837.
75. De Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJ, Chau TN et al. Fatal outcome of influenza A (H5-N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 2006; 12: 1203-1207.
76. Chan MC, Cheung CY, Chui WH, Tsao SW, Nicholls JM, Chan YO et al. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5-N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respir Res* 2005; 6: 135-136.
77. Kash JC, Tumpey TM, Proll SC, Carter V, Perwitasari O, Thomas MJ et al. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature* 2006; 443: 578-581.
78. Tampey TM, Szretter KJ, Van Hoeven N, Katz JM, Kochs G, Haller O et al. The Mx1 gene protects mice against the pandemic 1918 and highly lethal human H5-N1 influenza viruses. *J Virol* 2007; 81: 10818-10821.
79. McAuley JL, Hornung F, Boyd KL, Smith AM, Raelene McKeon, Bennik J et al. Expression of the 1918 Influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe* 2007; 2: 240-249.
80. Pichlmair A, Schuls O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F et al. RIG-L mediated antiviral responses to single stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 2006; 314: 997-1001.
81. Ludwig S, Pleschka S, Planz O, Wolff A. Ringing the alarm bell: Signaling and apoptosis in influenza virus infected cells. *Cell Microbiol* 2006; 8: 375-386.
82. Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: Past and present. *Annu Rev Med* 2000; 51: 407-421.
83. Eickhoff TC, Sherman IL, Serfling RE. Observations on excess mortality associated with epidemic influenza. *JAMA* 1961; 176: 776-782.
84. Glezen WP. Serious morbidity and mortality associated with influenza epidemics. *Epidemiol Rev* 1982; 4: 25-44.
85. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* 2003; 289: 179-186.
86. Monto AS. Epidemiology and virology of influenza *J illness. Amer J Manag Care* 2009; 6: S255-S264.
87. Griffin NR, Neuzil KM. Global Implications of Influenza in Hong Kong. *N Engl J Med* 2002; 347: 2159-2162.
88. Dauer CC, Serfling RE. Mortality from influenza 1957-1958 and 1959-1960. *Am Rev Respir Dis* 1961; 83 (suppl): 15-28.
89. Serfling RE. Methods for current statistical analysis of excess pneumonia-influenza deaths. *Public Health Rep* 1963; 78: 494-506.
90. Thompson WW, Weintraub E, Dhankhar P, Cheng PY, Brammer L, Meltzer MI et al. Estimates of US influenza associated deaths made using four different methods. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2009; 3: 37-49. (www.blackwellpublishing.com/influenza).
91. Simonsen L, Fukuda K, Schonberger LB, Cox NJ. The impact of influenza epidemics on hospitalizations. *J Infect Dis* 2000; 181: 831-837.
92. Simonsen L, Clarke MJ, Schonberger LB, Arden NH, Cox NJ, Fukuda K. Pandemic versus epidemic influenza mortality: A pattern of changing age distribution. *J Infect Dis* 1998; 178: 53-60.
93. Glezen WP, Couch RB. Interpandemic influenza in the Houston area, 1974-76. *N Engl J Med* 1978; 298: 587-592.
94. Fox JP, Hall CE, Cooney MK. Influenza virus infection in Seattle families, 1975-1979. I. Study design, methods and the occurrence of infections by time and age. *Am J Epidemiol* 1982; 116: 212-227.
95. Chin TDY, Foley JF, Doto IL. Morbidity and mortality characteristic of Asian strain Influenza *Public Health Rep* 1960; 75: 149-158.
96. Monto AS, Kioumehri F. The Tecumseh study of respiratory illness. I. Occurrence of influenza in the community 1966-1971. *Am J Epidemiol* 1975; 102: 553-563.

97. Izurieta HS, Thompson WW, Kramarz P, Shay DK, Davis RL, De Stephano F y cols. Influenza and the rates of hospitalization for respiratory disease among infants and young children. *N Engl J Med* 2000; 342: 232-239.
98. Neuzil KM, Mellen BG, Wright PF, Mitchell EF, Griffin MR. The effect of influenza on hospitalization, outpatient visits, and courses of antibiotics in children. *N Engl J Med* 2000; 342: 225-231.
99. Collins SD, Lehmann J. Excess deaths from influenza and pneumonia band from important chronic diseases during the period, 1918-51. Washington DC: Government Printing Office, 1953.
100. Meier CR, Napalkou PN, Wegmiiller Y, Jefferson T, Jick H. Population based study on incidence, risk factors, clinical complications and drug-utilization associated with influenza in the United Kingdom. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 834-842.
101. Frost WH. The epidemiology of influenza. *JAMA* 1919; 73: 313-318.
102. Francis T Jr. The new acquaintance. *Ann Intern Med* 1953; 39: 203-221.
103. Walker OJ. Pathology of influenza pneumonia. *J Lab Clin Med* 1919; 5: 154-175.
104. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origen and virulence of the 1918 Spanish Influenza virus. *Philos Trans R Soc London Biol Sci* 2001; 356: 1829-1839.
105. Reid AH, Fanning TG, Hultin JU. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1651-1656.
106. Reid AH, Taubenberger JK, Fanning TG. Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 909-914.
107. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 2005; 437: 889-893.
108. Muños FM, Galasso GJ, Gwaltney JM, Hayden FG, Murphy B, Webster R et al. Current research on influenza and other respiratory viruses II International Symposium. *Antiviral Res* 2000; 46: 91-124.
109. Kobasa DF, Takada A, Shinga K. Enhanced virulence of influenza A viruses with haemagglutinin of 1918 pandemic virus. *Nature* 2004; 431: 703-707.
110. Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. Initial genetic characterization of the 1918 «Spanish» influenza virus. *Science* 1997; 275: 1793-1796.
111. Hoft DF, Belshe RB. The genetic archeology of influenza. *N Engl J Med* 2004; 351: 2550-2551.
112. Belshe R. The origins of pandemic influenza lessons from the 1918 virus. *N Engl J Med* 2005; 353: 2209-2211.
113. Taubenberger JR, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of 1918 influenza virus polymerase gene. *Nature* 2005; 437: 887-893.
114. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PU. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 2005; 310: 77-80.
115. Noble GR. Epidemiological and clinical aspect of influenza. In: Beare AS (ed). *Basic and Applied Research*. Boca Raton, FL: CRC; 11-50.
116. Glezen WP. Serious Morbidity and Mortality associated with influenza epidemics. *Epidemiol Rev* 1982; 4: 25-44.
117. Stuart Harris CH, Schild GC, Oxford JS. *Influenza The Viruses and the Disease*. 2a ed. Victoria, Can: Eduard Arnold Ed; 1985. p. 118-138.
118. Andreasen V, Viboud C, Simonsen L. Epidemiologic characterization of 1918 influenza pandemic summer wave in Copenhagen: Implications for pandemic control strategies. *J Infect Dis* 2008; 197: 270-278.
119. Navarrete LRC, Betancourt CM, Murguía MP. Panorama de la mortalidad por infecciones respiratorias en México durante el año 2000. Una identificación de municipios de riesgo. *Epidemiología (Mex)* 2003; 20 (11): 1-3.
120. Olsen CW. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res* 2002; 85: 199-210.
121. Vincent AL, Ma W, Lager KM, Yanke BH, Richt JA. Swine influenza viruses: A North American Perspective. *Adv Virus Res* 2008; 72: 127-154.
122. Novel Swine Origin Influenza A (H1-N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009; 360: 2605-2615.
123. Chowell G, Bertozzi E, Colchero M A, Lopez Gatell H, Alpuche Aranda C, Hernández M, Miller MA. Severe Respiratory Disease Concurrent with circulation of H1-N1 Influenza. *N Engl J Med* 2009; 361: 674-679.
124. Osterholm MT. Preparing for Next Pandemic. *N Engl J Med* 2005; 352: 1839-1842.
125. Johnson NP, Mueller J. Updating the account global mortality of 1918-1920 «Spanish» influenza pandemic. *Bull Hist Med* 2002; 76: 105-115.
126. Miller MA, Viboud C, Olson DR, Grais RF, Rabaa MA, Simonsen L. Prioritization of influenza pandemic vaccination to minimize years of life lost. *J Infect Dis* 2006; 192: 661-668.
127. Newman AP, Reisdorf E, Beinemann J. Human case of swine influenza A (H2-N1) triple reassortant virus infection Wisconsin. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1470-1472.
128. Karasin AI, Schutten MM, Cooper LA. Genetic characterization of H3-N2 influenza viruses isolated from human and reassortant virus genotypes. *Virus Res* 2006; 68: 71-85.
129. Myers KP, Olsen CW, Gray GC. Cases of swine influenza in humans: A review of the literature. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1084-1088.
130. Pensaert M, Ottis K, Vandeputte J, Kaplan MM, Bachman PA. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance to man. *Bull World Health Organ* 1981; 59: 75-78.