

Epidemiología molecular de las infecciones respiratorias por influenza en derechohabientes del ISSSTE durante el periodo 2009-2013

RESUMEN

El virus de la influenza, es un virus de ARN perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*. Este virus presenta una alta capacidad de mutación y ha producido enfermedades respiratorias emergentes con un riesgo elevado de pandemia. En el 2009 un brote del virus de la influenza A de la variedad H1N1, con recombinación ave-cerdo-humano, tuvo su foco epidemiológico en México. La Organización Mundial de la Salud (OMS) catalogó este brote como una pandemia inminente por los múltiples casos que se presentaron dentro del país y en otros países. En este estudio reportamos el seguimiento epidemiológico de cuatro años de diagnóstico molecular de influenza B y las diferentes variedades de influenza A utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de un solo paso (RT-PCR One Step, por sus siglas en inglés). Los resultados muestran que en los últimos años los casos de influenza A H1N1 han disminuido considerablemente respecto al 2009, año en el que surgió el brote; sin embargo, existe el riesgo de que existan brotes de otras variantes en los meses de invierno.

Palabras clave: influenza A, influenza H1N1, vigilancia epidemiológica, influenza B.

Molecular epidemiology of influenza respiratory infections in patients of ISSSTE for the period 2009-2013

ABSTRACT

The influenza virus is a RNA virus that belongs to the *Orthomyxoviridae* family. This virus shows high mutation ability and is responsible for many respiratory diseases. It also represents a high emerging pandemic risk. During 2009, an outbreak of influenza A H1N1 variety featured by specific recombination pig-bird-human, occurred with an epidemiological focus in Mexico. The World Health Organization (WHO) categorized this outbreak as an imminent pandemic disease, due to many cases that were recorded within the country and abroad. In the present study, we report the epidemiological monitoring of four years of molecular diagnosis of influenza B and the different strains of influenza A, using the reverse transcription and real time polymerase chain reaction (RT-PCR One Step) technique. The results show that cases of influenza A H1N1 have decreased as compared to 2009, when the outbreak started; however, the risk of outbreaks of other variants does exist in the winter months.

Keywords: Influenza A, Influenza H1N1, Epidemiological surveillance, Influenza B.

María del Rocío Thompson Bonilla¹
Manuel Lara Lozano²
Hayde Nallely Moreno Sandoval³
Celia Piña Leyva⁴
José Luis Merino García⁵
Guillermina Rosas Sandoval⁶
Sergio Israel Rangel Guerrero⁷
Esmeralda Morán Mendoza⁸
Rodríguez Gallegos Jorge⁹
Gabina Calderón Rosete¹⁰
Juana Salazar Salinas¹¹
Ricardo Núñez Ceballos¹²
Juan Antonio González Barrios¹³

¹⁻⁶⁻¹³ Doctor en Ciencias

²⁻³⁻⁴⁻¹⁰ Maestro en Ciencias

⁵⁻¹¹ Químico

¹² Epidemiólogo

⁷⁻⁸⁻⁹ Pasante de la carrera de Química

¹⁻²⁻³⁻⁴⁻⁵⁻⁶⁻¹³ Laboratorio de Medicina Genómica Hospital Regional 1° de Octubre.

³ Laboratorio de Virología, Unidad de Investigación Médica en Inmunología Hospital de Pediatría, CMN SXXI.

¹⁰ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM.

⁷ Facultad de Química UNAM.

⁸⁻⁹ Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM.

¹¹ Jefatura de Servicios de Vigilancia y Control Epidemiológico.

¹² Depto. de Vigilancia y Control Epidemiológico, Dirección Médica, ISSSTE.

Recibido: octubre 2013

Aceptado: enero 2014

Correspondencia

Dr. Juan Antonio González Barrios
Hospital Regional 1o de Octubre
Avenida IPN No. 1669
Col. Magdalena de las Salinas
CP. 07760 México, D.F.
Tel: 01 (55) 51415300 Ext. 16605
jantgonzalez@issste.gob.mx

Este artículo debe citarse como

Thompson Bonilla MC, Lara Lozano M, Moreno Sandoval HN, Piña Leyva C, Merino García JL, Rosas Sandoval G. Epidemiología molecular de las infecciones respiratorias por influenza en derechohabientes del ISSSTE durante el periodo 2009-2013. Rev Esp Med Quir 2014;19:69-79.

Los virus de la influenza se dividen en tres tipos, denominados A, B y C. Los tipos de influenza A y B son los responsables de las epidemias de enfermedad respiratoria que se producen casi todos los inviernos y que con frecuencia están asociados con aumento en los índices de hospitalización y decesos.¹ Los esfuerzos para controlar el impacto de la influenza se centran en los tipos A y B. El tipo C de generalmente produce enfermedades respiratorias leves o incluso no provoca síntomas. Los virus de la influenza tienen altas tasas de mutación o cambios, con lo que consiguen eludir al sistema inmunológico de sus huéspedes; por esta razón las personas son susceptibles a la infección durante toda su vida.

La enfermedad afecta el tracto respiratorio superior o inferior y su presentación clínica incluye: fiebre, dolor de cabeza, dolores musculares y debilidad. La enfermedad es común en la temporada invernal.

Antecedentes históricos de la influenza

El término *influenza* se originó en Italia en el siglo XV, por el papa Benedicto IV, quien atribuía el mal causado a las personas a la influencia de las estrellas mientras que los franceses describieron esta enfermedad como gripe. Hipócrates fue el primero en reportar una enfermedad respiratoria persistente muy similar a la influenza; sin embargo, no fue sino hasta 1930 cuando se identificó el virus causal de la esta enfermedad.²

A lo largo del tiempo, las grandes epidemias y pandemias han causado la muerte de millones de personas, ejemplos de estas son la epidemia conocida como gripe española, causada por un virus de la influenza A variedad H1N1 durante 1918. Otro ejemplo es la influenza de Hong-Kong causada por la variedad H3N2 durante el periodo de 1957 a 1968.^{2,3} Sucesos más recientes han causado que las autoridades estén al pendiente de nuevos brotes de carácter pandémico

ocasionados por la recombinación de virus de aves-humanos, principalmente como los casos de influenza A H5N1 en Hong-Kong en 1997, con 17 casos letales, donde un virus que no podía replicarse en humanos adquirió dicha habilidad; así como de ocasionar un contagio horizontal sin dejar alguna evidencia antigénica. En 2003 hubo reincidencia de esta variante con una mortalidad hasta de 60%.^{1,2,4,5} El caso que ha afectado más recientemente a nuestro país fue la alerta de la primera pandemia inminente en los últimos 40 años, causada por la influenza porcina o influenza A variedad H1N1, con altas tasas de morbilidad y mortalidad;⁶⁻⁹ cuando se anunció el final de la alerta pandémica, en agosto de 2010, ya se habían reportado 18,449 muertes en 214 países.¹¹

Estructura y replicación del virus de la influenza

Los virus de la influenza, junto con el togotovirus y el isavirus, son integrantes de la familia *Orthomyxoviridae*, se caracterizan por ser virus esféricos de 80 a 120 nm de diámetro. Los virus de la influenza presentan ocho segmentos de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario de sentido negativo (Figura 1); cada segmento puede ser traducido a una o dos proteínas (12 proteínas en total).¹⁰ Adicional al material genético, el virión está constituido por dos glicoproteínas en la superficie conocidas como hemaglutinina y neuraminidasa, una membrana lipídica, canales iónicos formado por la proteína M2, una matriz proteínica compuesta por la proteína M1, las proteínas no estructurales NS1 y NS2 que conforman la cápside y que se encuentran unidas al ARN viral (ARNv).^{1,3,11,12}

La hemaglutinina (HA) se encuentra formada por dos cadenas peptídicas, unidas por un puente disulfuro, conocidas como subunidad HA1, que tiene el dominio de unión a receptores de la membrana de la célula huésped, y subunidad

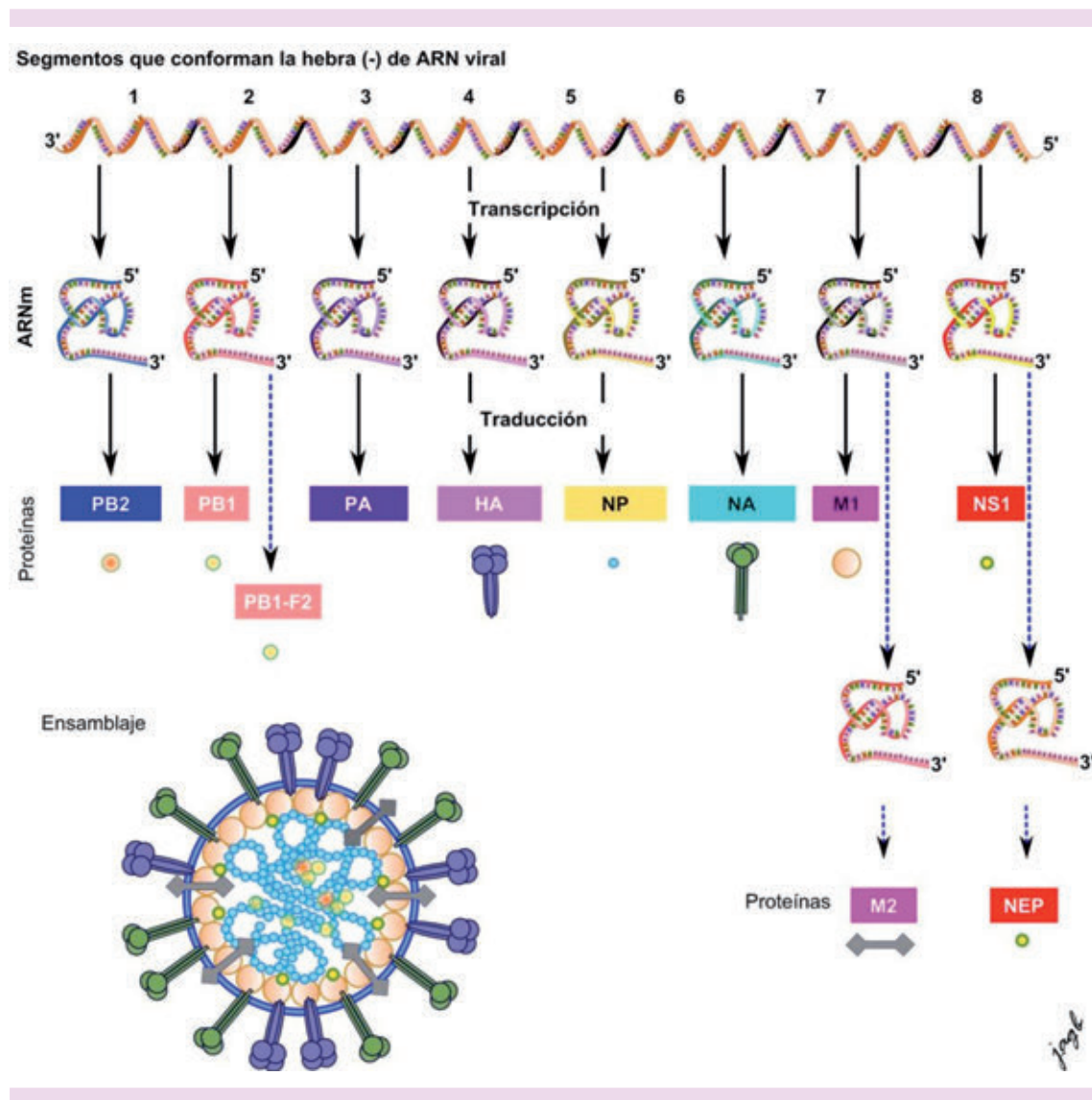


Figura 1. Representación esquemática del genoma del virus de la Influenza. La imagen muestra los 8 segmentos de ARN de cadena antisentido que transcribe para los 8 ARNm y traduce para las 10 proteínas conformacionales del virión de la influenza.

HA2, que se encuentra anclada en la membrana lipídica de la envoltura vírica y que presenta un sitio peptídico hidrofóbico de fusión en el amino terminal que sólo se expone cuando las dos subunidades HA1-HA2 son separadas.¹¹ La HA interactúa principalmente con el ácido siálico que se encuentra unido a una galactosa en

enlaces $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$ (SA $\alpha 2,3$ Gal o SA $\alpha 2,6$ Gal, respectivamente)¹² de la membrana celular de las células epiteliales de la tráquea en humanos o de las células epiteliales del tracto intestinal de aves acuáticas.³ La interacción entre el dominio de unión de la subunidad HA1 con los receptores SA $\alpha 2,3$ Gal o SA $\alpha 2,6$ Gal permite la entrada del

virión de influenza al interior de la célula mediante endocitosis mediada por receptor. Dentro del endosoma la HA cambia su conformación entre la interacción de HA1 y HA2 exponiendo el péptido de fusión que se inserta en la membrana del endosoma facilitando la fusión entre

la membrana del endosoma y la membrana del virión (Figura 2).¹¹

La neuraminidasa (NA) es una proteína tetramérica con un dominio transmembranal cerca del amino terminal; la NA libera el ácido siálico

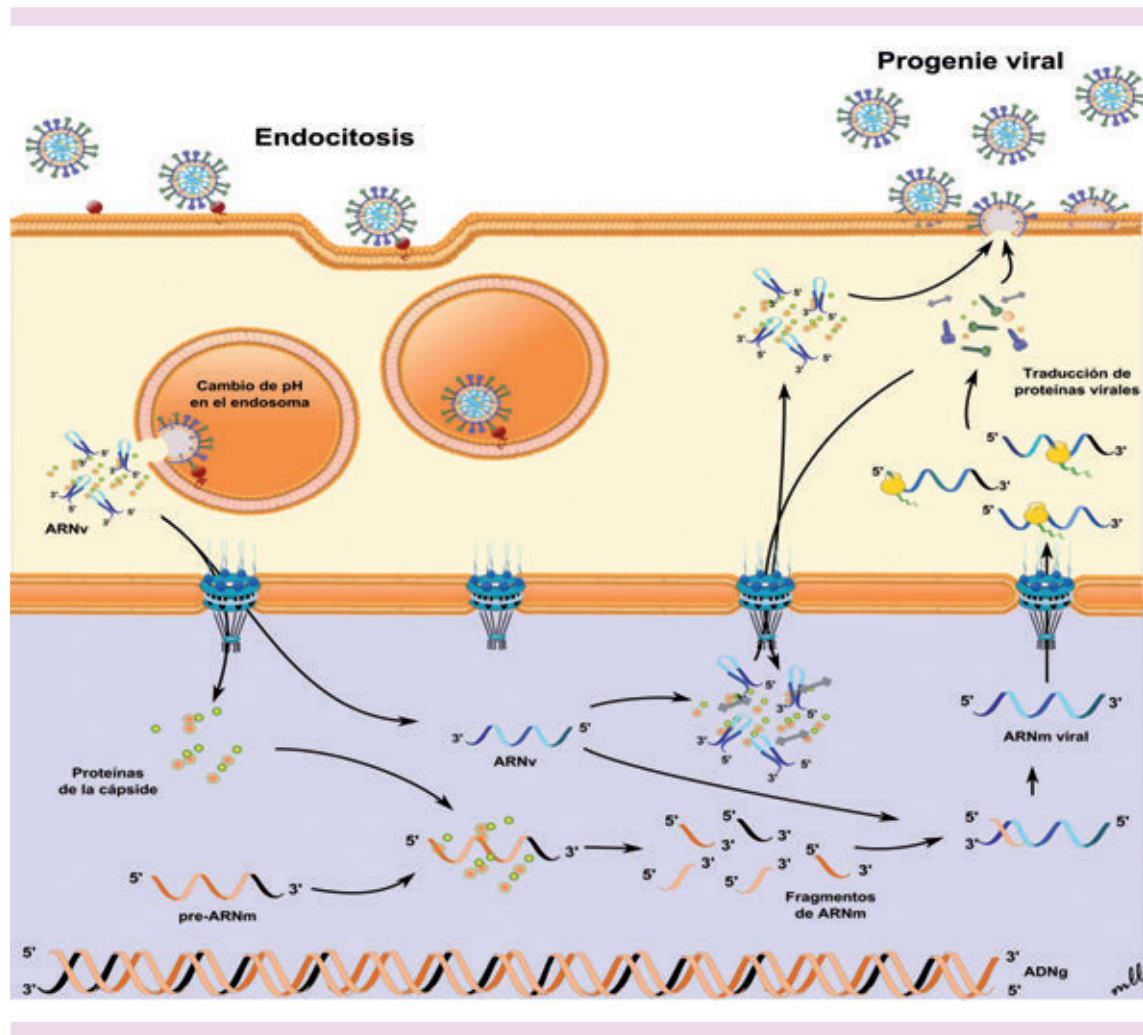


Figura 2. Representación esquemática del sistema de replicación viral. Se muestra el proceso de replicación viral, mismo que inicia con la unión del virus al ácido siálico de la superficie, induciendo de esta manera endocitosis. Cuando el endosoma cambia el pH del lumen se inicia el proceso de liberación del material genético viral al citoplasma, el cual se retrotransloca al núcleo, donde pueden suceder dos procesos: el primero es la formación de ARNm viral a partir del uso de fragmentos de ARNm celular y la traducción de proteínas virales; el segundo es la formación de ARNv nuevo que con ayuda de las proteínas virales sale del núcleo. El proceso de formación de la nueva progenie viral es a partir del uso de la membrana celular con las proteínas de la membrana viral ya ensambladas en ella.

de la galactosa y se le ha atribuido la función protectora de la progenie viral, al deshacerse del ácido siálico de células ya infectadas y facilitando el paso por la capa mucosa rica en ácido siálico.¹³ Sin embargo, se ha reportado que la NA no es requerida para el mecanismo de entrada, replicación o ensamblaje del virus de la influenza.¹⁴ Hasta la fecha dieciséis HA y nueve NA han sido identificadas en las aves, apareciendo como un gran reservorio del virus de influenza que puede ser transmitido a otras especies (Cuadro 1).^{12,15}

El canal iónico M2 es un homotetramero que se encuentra embebido en la membrana lipídica del virión. Causa el cambio de pH en el endosoma, lo que induce el cambio conformacional del canal y permite la entrada de protones al interior del virus.¹⁶ La acidificación dentro del virión debilita la interacción de la nucleocápside con la proteína M1 de la matriz proteínica, facilitando

la liberación del material genético al citoplasma de la célula huésped (Figura 2).¹¹

Cada segmento del genoma tiene una conformación helicoidal cerca de los extremos 5' y 3', formando una horquilla central debido a la presencia de múltiples copias de la proteína de la nucleocápside o NP. En los extremos 5' y 3' se une la proteína PB1 que está unida a las proteínas PB2 y PA formando un trímero. A diferencia del resto de los virus de ARN, los ortomixovirus entran al núcleo mediante la unión del complejo importina α -importina β .¹¹ Se ha descrito que el complejo PB1-PB2-PA es la maquinaria indispensable para la replicación del virus, dentro del núcleo la PB2 se une al ARN premensajero de la célula; posteriormente la actividad nucleasa de la PB1 rompe el ARN unido al PB2 que se usa como oligonucleótido para crear ARN mensajero (ARNm) viral. El ARNm viral es traducido a proteínas por la maquinaria de la célula huésped a las proteínas virales PB2, PB1, PA, NP, M1 y NS2. (Figura 2).^{10,11,17,18} La estructura química de la PA sugiere que esta proteína del complejo de la polimerasa del virus PB1-PB2-PA presenta una actividad de endonucleasa, incluso mayor que la de PB1.¹⁹

La replicación del ARNv requiere de las proteínas NP y PB1 en un proceso que no requiere de un oligonucleótido como cebador. Durante la replicación viral las NP libres se van uniendo a la nueva cadena de ARNv para evitar la formación de ARNv incompleto y darle estructura a la conformación helicoidal con el asa central.^{11,20} Las nucleocápsides hijas son transportadas al citoplasma por la unión de las proteínas M1 y NS2. Por otro lado, las proteínas de la superficie viral son sintetizadas, procesadas y finalmente insertadas en la membrana celular y concentradas en balsas lipídicas. Se ha propuesto que las proteínas M1 interactúan con segmentos intracelulares de las proteínas HA, NA y M2 para formar el nuevo virión.¹¹

Cuadro 1. Reservorios naturales para los diferentes tipos de hemaglutininas y neuraminidasas del virus de la influenza A

Tipo de glicoproteína superficial			
Hemaglutinina		Neuraminidasa	
Subtipo	Hospedero	Subtipo	Hospedero
H1	Humanos, cerdos, aves	N1	Humanos, cerdos, aves
H2	Humanos, cerdos, aves	N2	Humanos, cerdos, aves
H3	Humanos, cerdos, aves	N3	Aves
H4	Aves	N4	Aves
H5	Aves, humanos	N5	Aves
H6	Aves	N6	Aves
H7	Aves, equinos, humanos	N7	Equinos, aves
H8	Aves	N8	Equinos, aves
H9	Aves, humanos	N9	Aves
H10	Aves		
H11	Aves		
H12	Aves		
H13	Aves		
H14	Aves		
H15	Aves		
H16	Aves		

Cabe mencionar que existen otras proteínas no estructurales producidas durante la infección que favorecen indirectamente la replicación viral: la proteína NS1, que bloquea la activación de factores de transcripción, interfiere con la producción de interferón- β (IFN- β), la transcripción de genes regulados por el IFN- β , la expresión de la proteína cinasa R; y la proteína PB1-F2 induce apoptosis, posiblemente por interactuar con proteínas de la mitocondria.^{3,12}

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Las muestras utilizadas en este estudio fueron remitidas desde distintos centros hospitalarios para realizar la confirmación diagnóstica de influenza a través de pruebas moleculares que incluye las variantes: influenza A (estacional, H1, H3, H5a y H5b) o, en su caso, influenza B. Más de 90% de las muestras recibidas consistieron en exudados faríngeo o nasofaríngeo; el resto de las muestras fueron recibidas como lavado bronquio-alveolar, líquido cefalorraquídeo o biopsias.

Transporte de las muestras

Las muestras fueron transportadas dentro de tubos falcon de 15 mL con 2.5 mL de medio de transporte viral mantenido en cadena de frío a 4° C. Las muestras que no fueron procesadas el día de recepción se almacenaron en refrigeración a 4° C por no más de 72 horas. Cada 100 mL de medio de transporte viral fue preparado con: 93.78 mL de solución salina balanceada de Hank (HBSS), 2.1 mL de suero fetal bovino 1X, 1 mL de gentamicina a una concentración de 10 mg/mL, 2.1 mL de penicilina/estreptomicina a una concentración de 200 U μ g/mL, 2.1 mL de Anfotericina B a 5 μ g/mL y 500 μ L de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) a 7.5%.

Procedimiento de inactivación del virus y extracción del ARNv

Los protocolos de inactivación viral y de extracción de ARNv fueron realizados utilizando el paquete de extracción de ARN viral por columnas QIAamp (Qiagen). La inactivación se realizó utilizando 140 μ L de la muestra disuelta en medio de transporte virológico añadiéndole 560 μ L de solución amortiguadora AVL. El ARNv fué precipitado con 560 μ L etanol absoluto y transferido en columnas de sílica gel (QIAamp Mini Spin); una vez fijado fue lavado en dos ocasiones, la primera con 500 μ L de solución amortiguadora AW1 y la segunda con 500 μ L de solución amortiguadora AW2. La elución del ARNv se realizó adicionando 60 μ L de solución amortiguadora AVE sobre la matriz de la columna y centrifugado a 8,000 rpm; el ARNv obtenido fue almacenado en ultracongelación a -40° C hasta la genotipificación.

Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

El diagnóstico molecular se realizó mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de un solo paso (RT-PCR One Step) utilizando 5 μ L de ARNv y adicionándoles 20 μ L de la mezcla de reacción (18 μ L Master Mix/H₂O, 0.5 μ L de cada uno de los oligonucleótidos 5' y 3' a 40 μ M, 0.5 μ L de la sonda a 10 μ M y 0.5 μ L de la enzima Super Script III one step) para cada uno de los marcadores de genotipificación (Cuadro 2). Se utilizaron 5 μ L de Agua GBM como control negativo y 5 μ L del ARNv conocido como control positivo. El protocolo de amplificación se realizó en el termociclador de tiempo real 7900HT fast (Applied Biosystems). El protocolo de termociclado consistió de un ciclo con dos pasos: uno de 50° C por 30 minutos para la retrotranscripción y otro de 95° C por dos minutos para la desnaturalización, seguidos de 45 ciclos de amplificación conformados a

Cuadro 2. Secuencias de oligonucleótidos sentido, antisentido y sondas empleados para identificar los distintos marcadores moleculares

Marcador	Oligo	Secuencia
InfA	Sentido 5'-GACCRATCCTGTACCTCTGAC-3'	
	Antisentido 5'-AGGGCATTY TGGACAAKCGTCTA-3'	
	Sonda 5'-FAM-TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG-BHQ1-3'	
H1	Sentido 5'-AACTACTACTGGACTCTRCKGAA-3'	
	Antisentido 5'-CCATTGGTGCATTGAGKTGATG-3'	
	Sonda 5'-FAM-TGAYCCAAAGCC-(T-BHQ1)-CTACTCAGTGCAGAAAGC-SpacerC3-3'	
	Sentido 5'-AAGCATTCCYAATGACAAACC-3'	
H3	Antisentido 5'-ATTGCRCCRAATATGCCTCTAGT-3'	
	Sonda 5'-FAM-CAGGATCACATATGGGSCCTGTCCCAG-BHQ1-3'	
	Sonda 5'-FAM-TGACTACCCCGAG-(T-BHQ1)-ATTCAGAAGAAGCAAGATTAA-SpacerC3-3'	
H5a	Sentido 5'-TGGAAAGTRTAARAAACGGAACGT-3'	
	Antisentido 5'-YGCTAGGGARCTCGCCACTG-3'	
	Sonda 5'-FAM-CAACTATCCGCAG-(T-BHQ1)-ATTCAGAAGAAGCAAGATTAA-SpacerC3-3'	
H5b	Sentido 5'-GGAATGYCCCAAATATGTGAAATCAA-3'	
	Antisentido 5'-CCACTCCCCTGCTCRITGCT3'	
	Sonda 5'-FAM-TACCCATACCAACCA-(T-BHQ1)-CTACCATTCCCTGCCAT-SpacerC3-3'	
SuW	Sentido 5'-GCACGGTCAGCACTTATYCTRAG-3'	
	Antisentido 5'-GTGRGCTGGGTTTCATTTGCTC-3'	
	Sonda 5'-FAM-CYACTGCAAGCCCAT-(BHQ-1)-ACACACAAGCAGGCA-SpacerC3-3'	
Inf B	Sentido 5'-TCCTCAAYTCACTCTTCGAGCG-3'	
	Antisentido 5'-CGGTGCTCTTGACCAAATTGG -3'	
	Sonda 5'-FAM-CCAATTCGAGCAGCTGAAATCGCGGTG-BHQ1-3'	
RNasa P	Sentido 5'-AGATTGGACCTGCGAGCG-3'	
	Antisentido 5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'	
	Sonda 5'-FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ1-3'	

95° C durante 15 segundos y 55° C durante 30 segundos para la desnaturalización del ácido desoxirribonucleico viral (ADNv) y el ciclo de alineamiento de los oligonucleótidos y amplificación del ADNv complementario.

Interpretación de los resultados

Se utilizaron los marcadores Inf A, SwU, H1, H3, H5a, H5b, Inf B y Rnasa P (Cuadro 2) para cada una de las muestras. Todas las muestras procesadas tuvieron como control de extracción a la Rnasa P humana. El diagnóstico diferencial entre las distintas variantes de influenza A se realizó mediante la determinación de los genes que codifican para las proteínas de membrana hemaglutinina: H1, H3, H5a y H5b; y los genes

de la neuroaminidasa N1 con el marcador SwU que fue utilizado para diferenciar al virus de la influenza H1N1 respecto de otras variantes en la proteína NA. Las muestras positivas sólo a los marcadores Inf A y Rnasa P fueron clasificados como influenza A estacional.

RESULTADOS

Los datos mostrados en el presente estudio provienen de muestras remitidas desde distintos centros hospitalarios de la Ciudad de México, Estado de México y del Centro-Norte del país, que fueron recibidas y procesadas en el Laboratorio de Medicina Genómica, del Hospital Regional 1° de Octubre del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del

Estado (ISSSTE). Se procesaron 1,530 muestras, de pacientes hospitalizados en unidades clínicas, en el periodo comprendido entre el 16 de septiembre de 2009 y el 16 de septiembre de 2013. Durante los cuatro años sólo 41.37% de las muestras de pacientes con sospecha clínica de influenza fueron confirmados como casos positivos; 57.12% resultaron negativos y sólo 1.5% no pudieron ser diagnosticados, principalmente por problemas en la obtención y el manejo de las muestras durante el periodo de tránsito. Cabe mencionar que durante el periodo de estudio no se reportaron casos de influenza A de las variantes H5a o H5b. La distribución porcentual del diagnóstico obtenido de los pacientes sospechosos mostró una disminución del porcentaje de casos positivos en el año 2011 con sólo 15.0%, comparado con los años anteriores, 53.7% para el 2009 y 34.3% para el 2010; en el 2012 se incrementaron nuevamente los casos positivos con 44.9% y, en menor medida, en el 2013 con 28.1% (en proporción con el total de muestras procesadas cada año: $n_{2009} = 473$; $n_{2010} = 312$; $n_{2011} = 100$; $n_{2012} = 461$; $n_{2013} = 184$) (Figura 3A). En el 2009 el mayor número de casos positivos de influenza fueron de la variante A H1N1 con 44.2%, seguidos de la variante A estacional con 9.5%; no se presentaron casos de influenza A H3 o B. En 2010 las variantes predominantes fueron: influenza A de los tipos estacional y H1N1 con un diagnóstico de 17.0 y 15.4% de las muestras procesadas ese año, respectivamente. En el 2011 hubo disminución de los casos de influenza A estacional y H1N1; sin embargo, se observó incremento del número de casos de influenza B, con 8.0%, seguido de influenza A H3 con 5.0%. En 2012 se presentó un rebrote de influenza A H1N1 incrementando el número de casos en 21.7%, también de la influenza A estacional con 15.8%. En 2013 no se reportaron casos de influenza A H1N1; sin embargo, la variante de influenza predominante en la mayoría de los casos positivos es la influenza A H3 con 17.4%, seguida de la influenza B con 6.2% y sólo 4.5%

de casos con influenza A estacional (Figura 3B). Los casos de influenza A estacional se presentan principalmente en las estaciones de otoño e invierno; hay fluctuaciones en el número de casos positivos de influenza a lo largo del tiempo del periodo de estudio. Adicionalmente, se observaron dos brotes importantes de influenza A H1N1: el primero en octubre de 2009 con 106 casos y el segundo en enero de 2012 con 68 casos diagnosticados. En el periodo de noviembre de 2012 a marzo de 2013 se presentó un incremento en las frecuencias de influenza B e influenza A H3, aunque el número de pacientes diagnosticados fue menor a 16 (Figura 3C).

DISCUSIÓN

Debido a la alta posibilidad de mutación y recombinación entre distintas variantes del virus de la influenza, principalmente de la influenza A, se debe llevar a cabo un seguimiento epidemiológico estricto. Las variantes recombinadas interespecie son aquellas que tienen mayores repercusiones de salud y económicas ya que implican una disminución en la exportación de productos pecuarios, así como un incremento en sus precios debido al pobre abastecimiento y al riesgo por la migración de aves acuáticas. En México, la influenza A de la variante H1N1 produjo una alerta sanitaria y, 42 días después del primer caso, confirmado en marzo de 2009, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la catalogó como una enfermedad viral pandémica inminente. Durante ese periodo se reportaron 854 casos de neumonía en la capital del país, de los cuales en 6.91% fue letal. Posteriormente se reportaron casos en otras partes del mundo, principalmente de personas que transitaron por México.⁶

El curso agudo y mortal de la enfermedad alertó a las autoridades sanitarias nacionales y mundiales cuyo objetivo primordial fue evitar el contagio de las personas que acudían a los distintos Cen-

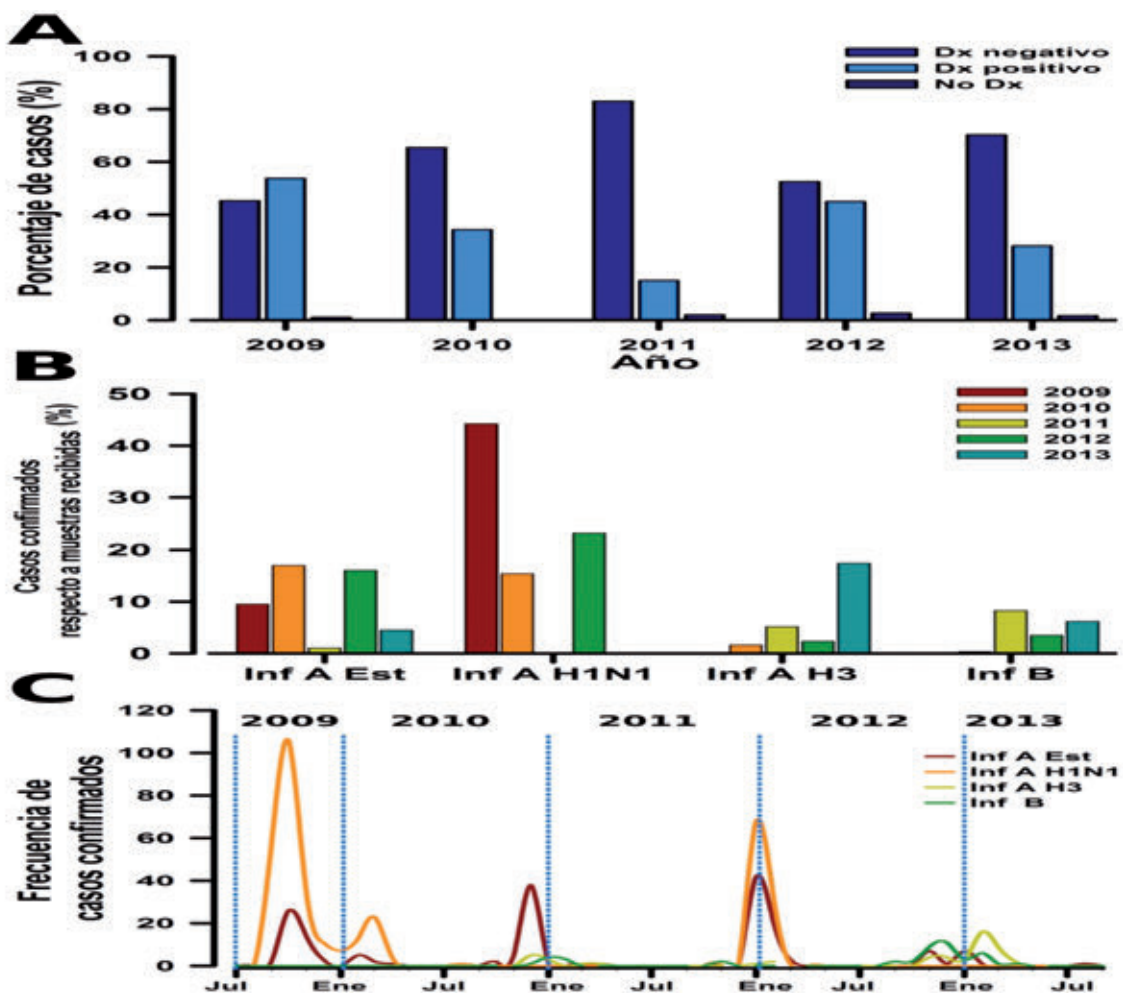


Figura 3. A) Número de casos procesados en cuatro años: se muestra el porcentaje de muestras procesadas en el Laboratorio de Medicina Genómica. Cuando los resultados fueron negativos (DX negativo), positivos (Dx positivo) o que por ser muestra inadecuada no fue posible procesar (No Dx). B) Diagnóstico específico de las muestras de pacientes positivos a influenza. La imagen muestra el porcentaje de casos de influenza A de las variedades estacional, H1N1, H3 e influenza B para cada año. C) Seguimiento epidemiológico de las variedades de la influenza. La figura muestra la frecuencia de casos confirmados de influenza a lo largo de los cuatro años. La variante H1N1 fue la más importante en los inviernos de 2009 y 2012 y, en segundo lugar, la Influenza estacional.

tros de Salud y que podían contraer la influenza A H1N1 al estar en contacto con casos positivos. Se priorizó la identificación de la variante de influenza para descartar otras enfermedades respiratorias. Como respuesta a esta alerta sanitaria se crearon y modificaron laboratorios

médicos, que a través de pruebas moleculares efectivas y rápidas realizaron seguimientos y diagnósticos diferenciales. En septiembre de 2009 el Laboratorio de Medicina Genómica del Hospital Regional 1° de Octubre del ISSSTE incluyó entre sus servicios el diagnóstico mole-

cular de influenza A de la variante H1N1; esto, por medio de la técnica de recuperación de ARN viral y posteriormente la técnica de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en un solo paso, que ha sido propuesto como el mejor método para la identificación de este virus. El panel de diagnóstico que se utiliza en el laboratorio incluye a otras variantes de importancia epidemiológica, por lo que la eficiencia de la prueba de diagnóstico ha mejorado y el aporte al diagnóstico para el tratamiento inmediato, eficiente.

Como se observa en los resultados los casos de influenza A H1N1 han disminuido desde el brote de 2009; sin embargo, pueden observarse muchos casos diagnosticados como positivos en 2012. Otro aspecto importante es que los casos remitidos que dieron positivos a influenza A H3 se han incrementado junto con los casos de influenza B. Una observación importante en el seguimiento epidemiológico realizado en el laboratorio son los brotes de influenza de distinta índole durante el periodo de octubre a marzo, lo que permite sugerir que para finales de 2013 y principios de 2014 pudiese presentarse nuevo incremento de los casos de influenza, aunque se desconoce si será de influenza A H1N1 como sucedió en 2012.

CONCLUSIONES

Debido a que la primera generación de antivirales ha disminuido su efectividad es necesario un mayor estudio del virus de la influenza o de los componentes del virión; en especial de las proteínas que intervienen directamente en la replicación o la virulencia como blancos farmacológicos. En la actualidad el enfoque radica en el estudio de las proteínas estructurales del virión. Adicionalmente, se requiere de estudios clínicos y moleculares para estar alertas ante la aparición de nuevas variedades del virus, resistentes a los antivirales actuales²¹ y mantener

una vigilancia epidemiológica continua para poder evitar una nueva pandemia del virus de la influenza A H1N1.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dirección Médica y a la Subdirección de Prevención y Protección a la Salud, al departamento de Vigilancia Epidemiológica del ISSSTE por su confianza para que el Laboratorio de Medicina Genómica del Hospital Regional 1° de Octubre aplique las técnicas de biología molecular para el diagnóstico de la influenza, así como por la asignación de los recursos financieros respectivos.

REFERENCIAS

1. Lindstrom SE, Hiromoto Y, Nishimura H, Saito T, Nerome R, Nerome K. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple co circulating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. *Journal of Virology* 1999;73:4413-26.
2. Ayora-Talavera G. Influenza: Historia de una enfermedad. *Revista Biomédica* 1999;10:57-61.
3. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 2009;459:931-9.
4. To KKW, Ng KHL, Que TL, et al. Avian influenza A H5N1 virus: a continuous threat to humans. *Emerging Microbes & Infections* 2012;1:1-12.
5. Nature reports: Avian Flu. Disponible en: <http://www.nature.com/avianflu/index.html>.
6. Organización Panamericana de la Salud 2009. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1259&Itemid=1&lang=es
7. Daput IC, Daput C, Baranovich T, et al. Genetic characterization of human influenza viruses in the pandemic (2009-2010) and post-pandemic (2010-2011) periods in Japan. *Plos One* 2012;7:1-12.
8. Zhang Y, Zhang Q, Gao Y, et al. Key molecular factors in hemmagglutinin and PB2 contribute to efficient transmission of the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Journal of Virology*, 2012; 86(18): 9666-9674.
9. Graham-Rowe D. Epidemiology: Racing against the flu. *Nature* 2011;480:S2-S3.
10. Kelvin AA, Meloni D, Sansonetti P, et al. Influenza monitoring in Sardinia, Italy identifies H3 subtype in Medi-

- terranean wild migratory birds. *Journal of Infection in Developing Countries* 2012;6:786-97.
11. Briedis D. Influenza viruses. En: *Ac Drugs: Lines of defense* heson NH. *Fundamentals of Molecular Virology*. Ed. Wiley, 2011; Cap. 18:210-224.
 12. Neumman G, Chen H, Gao GF, Shu Y, Kawoaka Y. H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties. *Cell Research* 2010;20:51-61.
 13. Colman PM. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Science* 1994;3:1687-96.
 14. Liu Ch, Eichelberger MC, Compans RW, Air GM. Influenza type a virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *Journal of Virology* 1995;69:1099-1106.
 15. Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *Journal of Virology* 2005;79:2814-2822.
 16. Sulli C, Banik SS, Schilling J, et al. Detection of Proton Movement Directly across Viral Membranes To Identify Novel Influenza Virus M2 Inhibitors. *Journal of Virology* 2013;87:10679-10686.
 17. Kawakami K, Ishihama A. RNA Polymerase of Influenza Virus. III. Isolation of RNA Polymerase-RNA complexes from influenza virus pr81. *The Journal of Biochemistry* 1983;93:989-996.
 18. Morgan B, St. Angelo C, Katze MG, Krug RM. The Three Influenza Virus Polymerase (P) Proteins Not Associated with Viral Nucleocapsids in the Infected Cell Are in the Form of a Complex. *Journal of Virology* 1987;67:16-22.
 19. Yuan P, Bartlam M, Lou Z, et al. Crystal structure of an avian influenza polymerase PAN reveals an endonuclease active site. *Nature* 2009;458:909-913.
 20. Shapiro GI, Krug RM. Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *Journal of Virology* 1988;62:2285-2290.
 21. Palmer R. *Drugs: Lines of defense*. *Nature* 2011;480:S9-S10.