

ENCUESTA SEROLOGICA CONTRA LOS VIRUS DE LA INFLUENZA*

Estudios en la Población de Lima Metropolitana
1959-1960

W. FLORES,¹ J. R. CORNEJO-UBILLUS² y M. ARCE³

El problema de la influenza es de interés mundial, debido a su naturaleza altamente infecciosa y a su capacidad de producir mutaciones rápidas, lo que hace que la inmunidad sea de poco valor. Es bien conocida la elevada morbilidad de las epidemias producidas por la influenza y sus posibles complicaciones, así como el impacto que significa sobre la vida social y económica de los países. De aquí que sea de permanente interés el estudio y prevención de esta enfermedad.

La influenza, por su alto grado de infectividad y extraordinario poder de diseminación, que alcanza, casi simultáneamente, la gran masa de la población, es un problema sanitario complejo que, pese a su baja letalidad, exige la aplicación de medidas excepcionales de emergencia. El efecto perturbador socio-económico de una epidemia de influenza causa serios perjuicios a un país, los cuales son más acentuados cuanto mayor sea la virulencia del agente causal y mayor la frecuencia de las complicaciones.

No existen recursos suficientemente eficaces que impidan o detengan el avance de una epidemia de influenza. La vacuna específica,

* Trabajo realizado bajo los auspicios del Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

¹ Profesor Asociado, Departamento de Microbiología.

² Profesor Principal, Departamento de Ciencias Médico-Sociales.

³ Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud Pública.

preparada con cepas de virus cuya estructura antigénica sea similar al que causa la epidemia, sería el único recurso de protección, pero la inmunización de toda una población, requiere la producción de vacuna y su administración con la anticipación suficiente, lo que difícilmente puede ser alcanzado aún por los países mejor dotados. La cantidad de vacuna que puede ser producida, será entonces empleada de preferencia en la inmunización de grupos humanos que por la índole de sus funciones son de mayor interés para la colectividad. Por lo tanto, la Epidemiología y la Salubridad son los métodos de lucha fundamental; la educación sanitaria de la población, encargada a los Organos de Salud Pública, es sin duda una de sus grandes tareas, que se complementa con la obligación de planear y ejecutar las encuestas epidemiológicas en forma sistemática y su razonable utilización.

Desde 1947, la Organización Mundial de la Salud (OMS) está empeñada en expandir y perfeccionar un programa de colaboración internacional para el control de la influenza. Este programa se propone recoger información epidemiológica de todas partes del mundo y divulgarlas cuanto antes; trata de descubrir variantes nuevas de virus de influenza potencialmente peligrosas; proporciona a los laboratorios industriales, cepas de las nuevas variantes antigénicas recién aisladas para incluirlas en la producción de vacunas y difunde normas técnicas, prototipos de virus y sueros patrones que son de enorme utilidad en la estandarización y simplificación de los métodos de diagnóstico e investigación en influenza.

Para cumplir estos cometidos existe en el momento un "Centro Internacional de Influenza" en Londres, y otro en Alabama, U. S. A., que trabajan en estrecha cooperación; además, repatriados en todo el mundo hay una cadena de pequeños "Centros Regionales" que tienen por objeto estar atentos a nuevos brotes de Influenza e informar inmediatamente de sus hallazgos a los Centros Principales. En el Perú pretendemos constituir un Centro de Influenza Regional que tenga por objeto el estudio de esta enfermedad en nuestro medio y que, trabajando en estrecha colaboración con el centro de Alabama y con los Organismos respectivos del Ministerio de Salud Pública, realice programas de investigación que beneficien a todo el país.

La OMS obtuvo en la última epidemia de 1957 una gran victoria, al anunciar en Mayo de ese año la epidemia en el Lejano Oriente y proveer de cepas de la nueva variante a los Laboratorios Regionales pero su estudio y la preparación vacunas, con las cuales se evitó, seguramente una incidencia mayor.

La infección en el hombre con el virus de la Influenza es seguida por la producción de anticuerpos y por lo tanto se adquiere inmunidad, aunque sólo temporal; los anticuerpos desarrollados permanecen indefinidamente, si bien con una marcada declinación de los niveles primarios de convalescencia, tales anticuerpos son relativamente cepa-específicos y son múltiples y variados, lo que está de acuerdo a la experiencia vivida y a la capacidad antigénica de los virus responsables; esto quiere decir que los individuos de distintas edades presentarían distintos anticuerpos que reflejan la naturaleza de los virus a los que

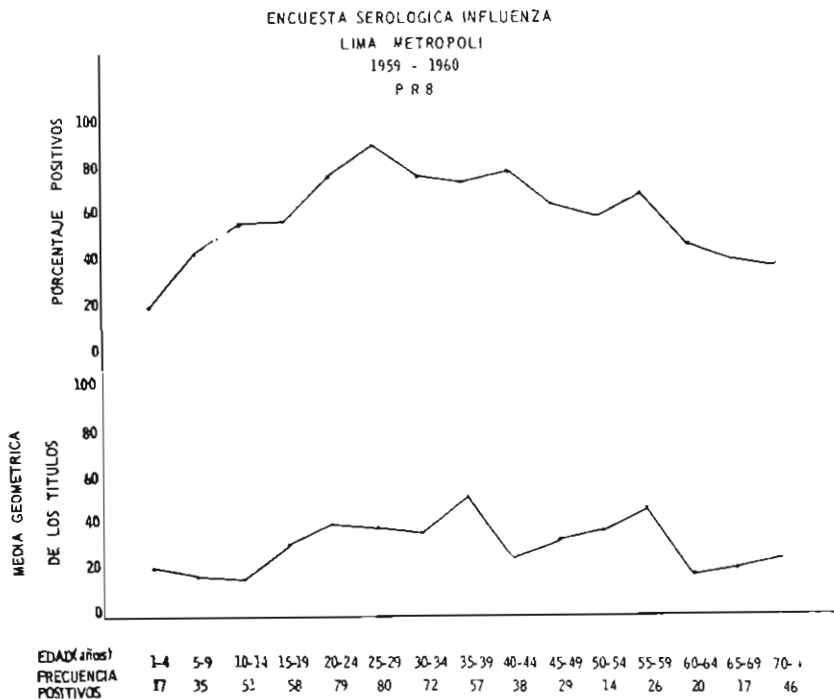
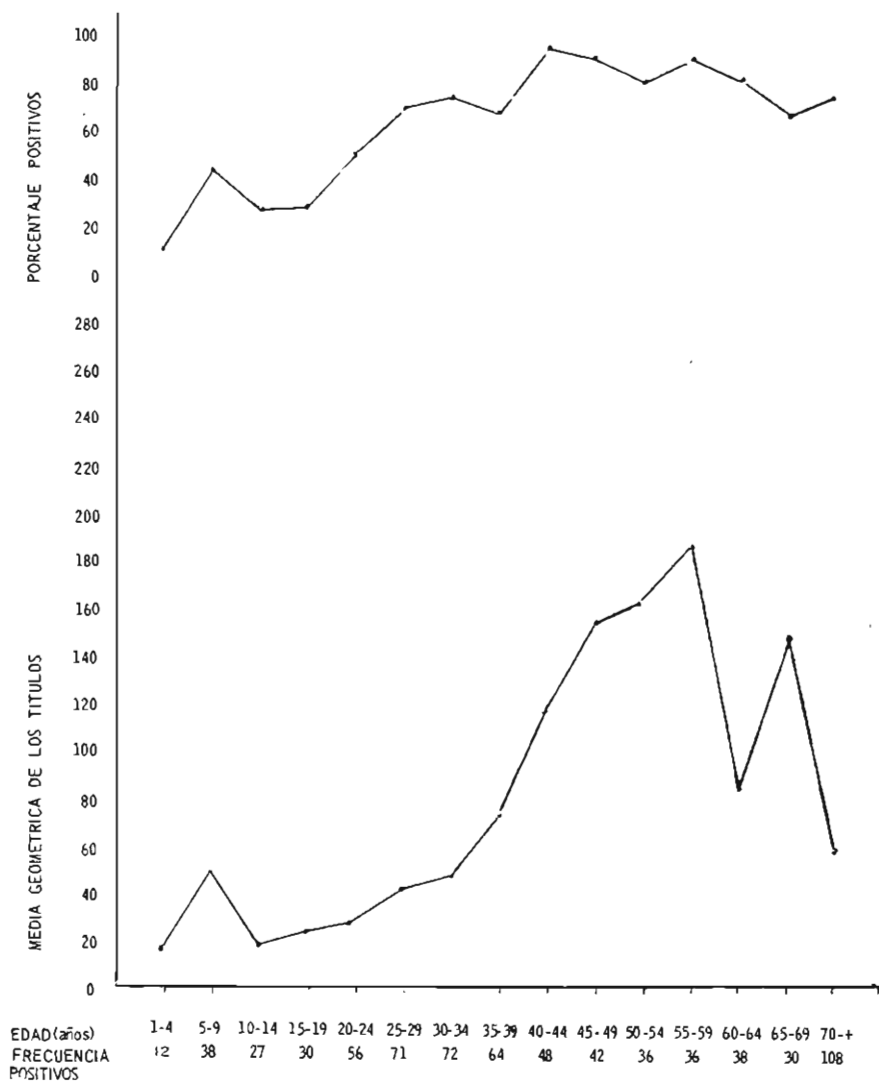


GRAFICO N° 1

fueron expuestos en algún momento de su vida. Por otra parte, hay una relación antigénica entre los virus predominantes en los últimos años, con aquellos que se presentaron en años anteriores, así se señala que el virus de influenza de la epidemia de 1932 es antigénicamente semejante al que se presentara en el año 1918, y más recientemente Mulder (1957) en Holanda, estudiando sueros de pacientes de más de 70

ENCUESTA SEROLOGICA INFLUENZA
LIMA METROPOLI
1959 - 1960
SWINE



GRÁFICA Nº 2

años, sugiere que el virus dominante en la epidemia de 1889-90, también de origen asiático, debería contener antígenos comunes al del A, Jap/57 como fue verificado serológicamente por él. Este hecho es de enorme interés, pues bien explorado experimentalmente pudiera constituir el primer ejemplo de reversión antigénica, lo que todavía no fue constatado con ninguna de las variantes de virus de Influenza A conocidas desde 1933; o también pudiera ser el punto de partida para investigaciones sobre la existencia de algún reservorio natural de la fauna asiática o en el propio hombre, desde que se acredita que una fase resistente del virus pueda coexistir con el estado inmune, sin alteraciones de su composición antigénica fase Q de Vander Vee y Mulder).

Teniendo en cuenta estas consideraciones el Dpto. de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por su Departamento de Microbiología, Sección Virus, convinieron en llevar a cabo, mancomunadamente, una encuesta serológica de la Influenza, en Lima Metropolitana, ya que el examen de las muestras de suero de diferentes grupos etareos de la población permitiría investigar la presencia de anticuerpos contra los virus de la Influenza y mediante ellos poder interpretar retrospectivamente la prevalencia de esta enfermedad en nuestra población, es decir, la ocurrencia pasada de un virus particular en dicho grupo humano y, en un sentido predictivo para evaluar o apreciar la probable ocurrencia futura de determinado virus en la población. Estos estudios son de gran valor, pues nos servirán para estar preparados y alertados para cualquier epidemia que pudiera venir en el futuro.

Este informe resume e interpreta los hallazgos de un estudio para medir el espectro de anticuerpos, de acuerdo a la edad, en la población de Lima, para seis virus de los tipos A y B, que representan antigénicamente la mayoría de los virus de Influenza conocidos hasta el presente.

MATERIAL Y METODOS

Se estimó, a priori, una muestra mínima equivalente al 1% de la población metropolitana, distribuida por edades entre 1 y 99 años, repartida en diferentes sectores de Lima Metropoli y para ambos sexos.

ENCUESTA SEROLOGICA INFLUENZA
LIMA METROPOLITANA
1959 - 1960
FM 1

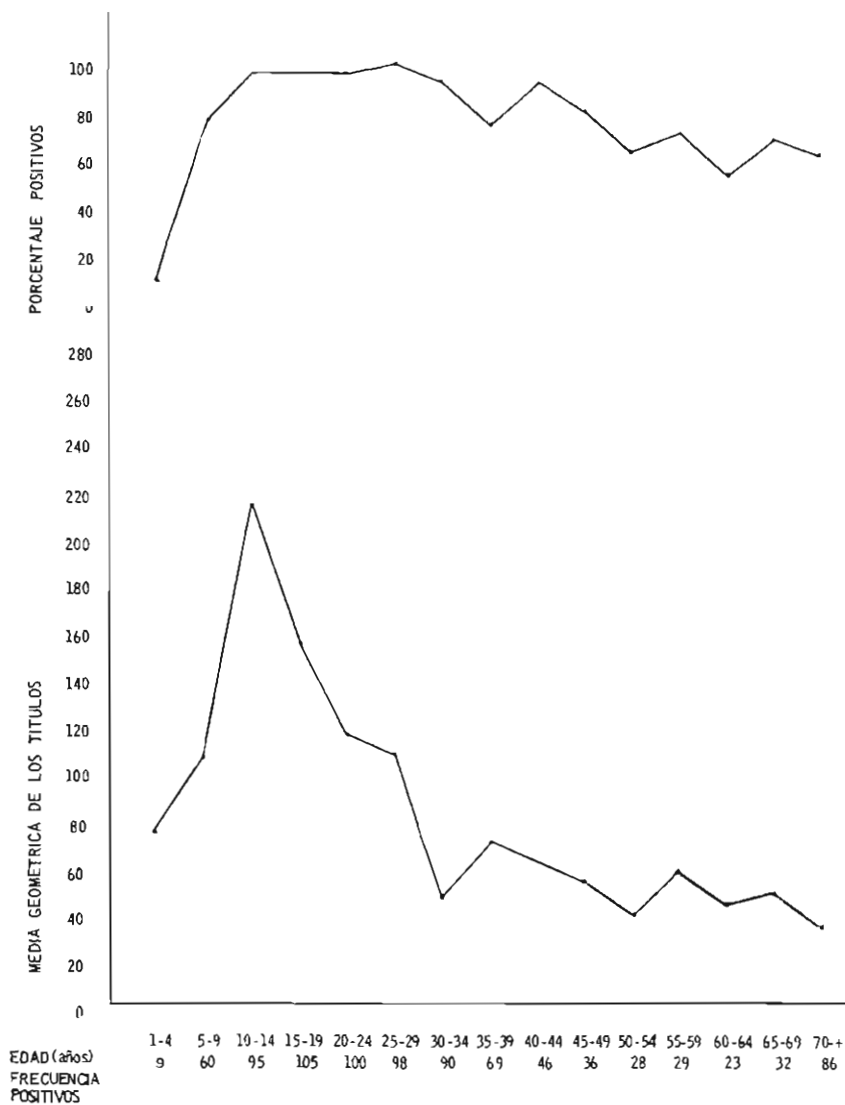


GRAFICO Nº 3

Fueron obtenidos un total de 1,276 sueros distribuidos en la siguiente forma:

| Sexo | Nº | Porcentaje |
|--|-----|------------|
| Masculino | 729 | 57% |
| Femenino | 547 | 43% |
| Edades: 1 a 4 años 26 muestras por año | 126 | |
| 5 " 39 " 20 " " " | 700 | |
| 40 " 69 " 10 " " " | 300 | |
| 70 " 99 " 5 " " " | 150 | |

Se deja constancia que en este estudio, a pesar de estar obviamente considerada como importante, no se tomó en cuenta las edades menores de 1 año, porque se estimó existieran dificultades en conseguirla.

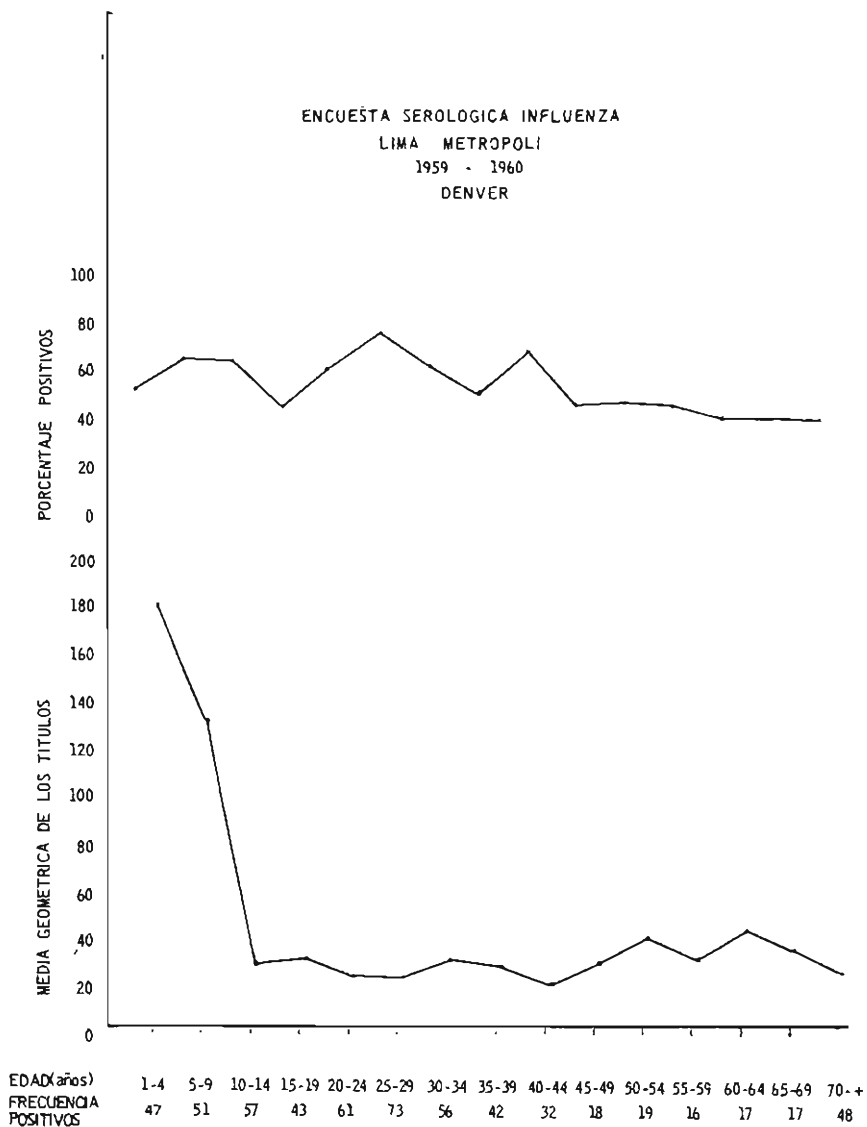
El total corresponde a grupos de personas de sexo, edad y ocupación diferentes y procedentes de diversas zonas de la población de Lima. (Tabla Nº 1).

Tabla Nº 1. Encuesta Serológica de Influenza. Número Total de sueros por Instituciones. Lima Metrópoli, Octubre-Diciembre 1959

| Instituciones | Nº de muestras |
|--|----------------|
| Centros Materno-Infantiles y Cunas Maternales | 125 |
| Colegios y Escuelas | 287 |
| Unidades de Salud | 232 |
| Dispensarios | 174 |
| Asilos de Ancianos | 263 |
| Lab. Dpto. Epidemiología | 10 |
| Cuartel Guardia Republicana | 77 |
| Fábricas | 52 |
| Distrito Fray Martín de Porres | 56 |
| | <hr/> |
| | Total 1276 |

Los resultados se refieren a un total de 1,182 muestras procesadas. Se perdió 94 muestras.

Se tomó una muestra única de 5ml., de sangre venosa de cada una de las 1,276 personas examinadas, en el período de octubre a diciembre de 1959.



GRAFICA Nº 4

Los sueros fueron titulados por el contenido de anticuerpos inhibidores de la Hemaglutinación usando la técnica de la Rockefeller: Foundation Virus Lab. 1955 que emplea glóbulos rojos de gallo. Todos los títulos están expresados en promedios geométricos a la dilución inicial de suero.

Se usó placas de plástico transparente con excavaciones de 1 ml. de capacidad *, lo que substituye con ventaja a los tubos de hemólisis.

Con el objeto de remover los inhibidores inespecíficos los sueros fueron tratados por la técnica del Periodato de Potasio, es decir: un volumen de suero inactivado a 56° C por 30 minutos era mezclado con dos volúmenes de una solución M, 90 de periodato de potasio de peso molecular 230.02, recientemente preparada sin calentamiento. Dejábese la mezcla en refrigeración por un período de 12 a 18 horas. Adicionábase después dos volúmenes de una solución de Glicerina al 1% de Sol. fisiológica. Luego agregábase solución tamponada (BSB) hasta completar la dilución al 1:10. Quedaba pues así cada suero diluido al 1:10 y a partir de esta primera dilución se hacían las siguientes.

Tabla N° 2. Cepas de virus prototipos usados en los tests

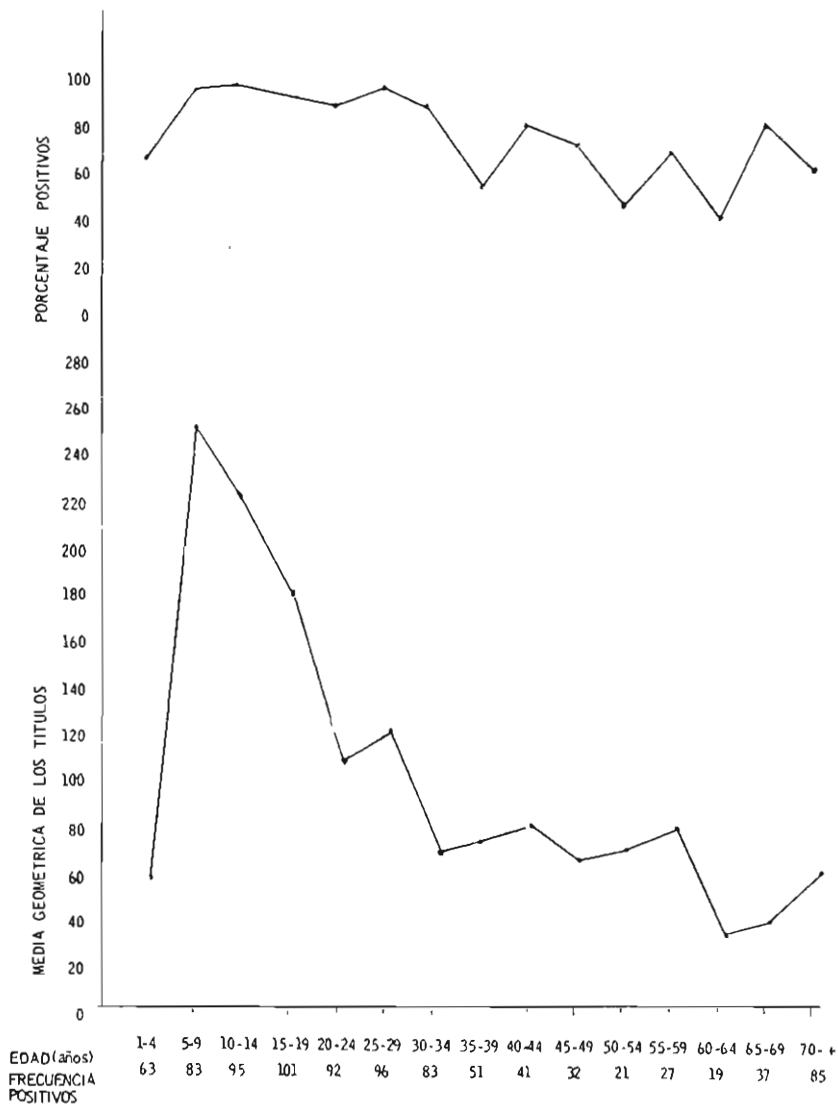
| Tipo | Familia Subgrupo | Epoca de Prevalencia | Prototipo de cepa usada | Año en que fue descubierto |
|-------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| A | Swine | ? - 1928 - ? | A-Swine-1876-30 | 1930 |
| A | PR 8 | 1934-46 | A-PR8-34 | 1934 |
| A | A'-FM1-47 | 1946-51 | A-FM1-47 | 1947 |
| A | Duch-56 | 1956-Presente | A-Denver-1°-57 | 1957 |
| A | Asian | 1957-Presente | A-Japan-305-57 | 1957 |
| B | Great Lakes'54 | 1954-Presente | B-GL-54 | 1954 |

Todos los sueros fueron guardados en refrigeración a -20° C por un período de seis meses antes de ser procesados.

Las cepas de virus empleadas en los tests fueron enviados por el Communicable Disease Center de Alabama, U. S. A. y son descritas en la tabla N° 2.

* Haemagglutination Plats, Prestware Ltd., London.

ENCUESTA SEROLOGICA INFLUENZA
LIMA METROPOLI
1959 - 1960
JAP/305/57



GRAFICA N° 5

En primer término titulábamos la actividad hemaglutinante de las cepas de virus usando la siguiente técnica: a) hacíamos diluciones sucesivas a partir de 1:10 de los seis antígenos con solución BSB; b) adicionábase volumen igual de hematíes de gallo diluido al 0,25% en BSB *; c) después de dejar 1½ horas a temperatura ambiente se efectuaba la lectura. Calculábase entonces la dilución del antígeno para ser usada en el test de inhibición y que debería contener 4 unidades (CCA) en un volumen de 0.2 ml.

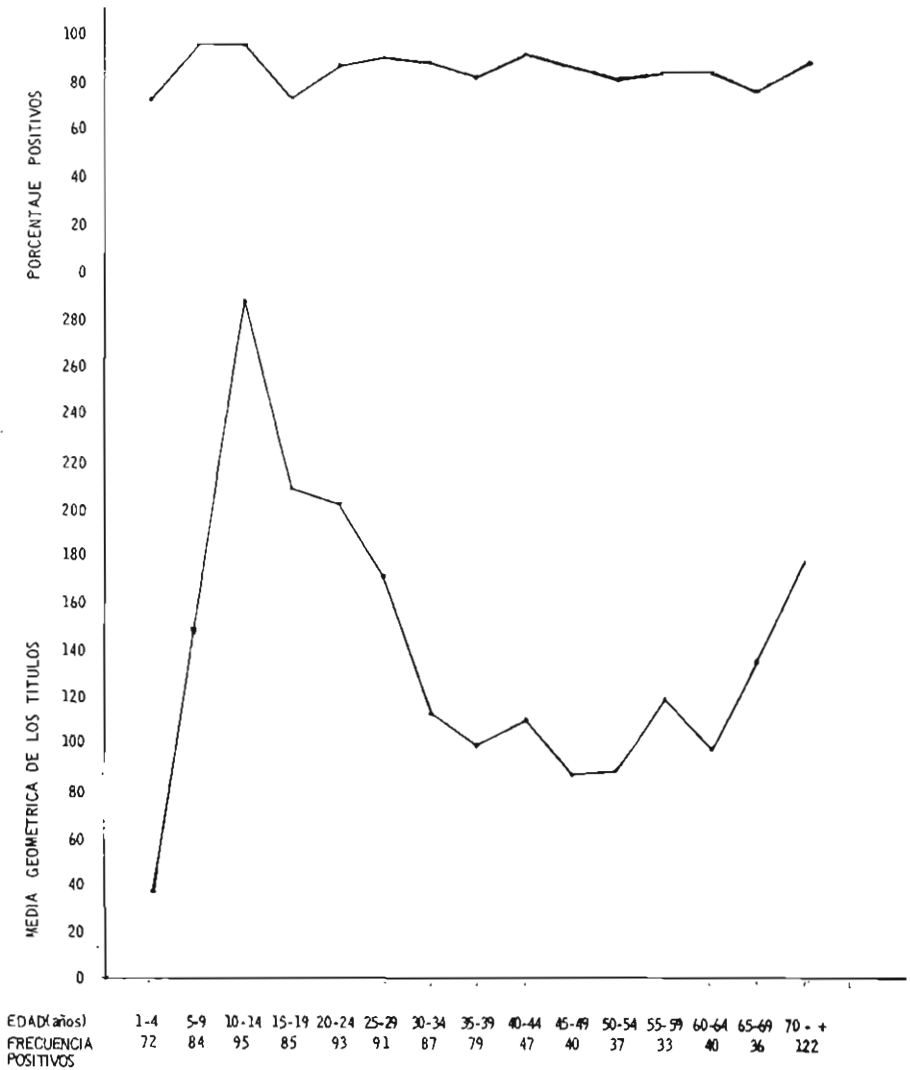
Las lecturas de la actividad hemaglutinante y de la inhibición respectiva se hicieron siguiendo el molde clásico (Chanock & Sabin, 1953): aglutinación completa +, aglutinación incompleta (+) ligera aglutinación ± y ninguna aglutinación: 0.

RESULTADOS

En las Gráficas del 1 al 6, se muestra la incidencia por edades de los títulos de anticuerpos inhibidores de hemaglutinación expresados en promedios geométricos contra los diferentes virus utilizados en esta encuesta. En la parte superior están expresados los porcentajes respectivos.

La suspensión de hematíes de gallo era preparada del siguiente modo: la sangre obtenida por punción cardiaca era recibida directamente en la solución de Alsever en la proporción de 1:4 y conservado en refrigeración a 4°C. Por ocasión del uso, un determinado volumen era centrifugado y los glóbulos lavados con salina por 3 a 4 veces. Después del último lavado la suspensión de glóbulos rojos era trasvasada para un tubo de centrifuga graduado, procediendo entonces a centrifugar por 6 minutos a 1,800 r.p.m. Pipeteado cuidadosamente el sobrenadante y leído el volumen de hematíes depositado, adicionábase la cantidad de salina necesaria para ser obtenida una suspensión de glóbulos al 10%. De esta suspensión preparábase con BSB una suspensión al 0.25% que era ajustada por turbidimetría y así usada en el test.

ENCUESTA SEROLOGICA INFLUENZA
LIMA METROPOLI
1959 - 1960
B-GL 1954



GRAFICA Nº 6

Distribución de anticuerpos de acuerdo a la edad contra virus prototipos de Influenza A, tipos Swine y PR8.

En la figura N° 7 se muestra la distribución de anticuerpos específicos para las cepas Swine (1930) y PR8 (1934), de acuerdo a la edad; los cuales están expresados en promedios geométricos de título

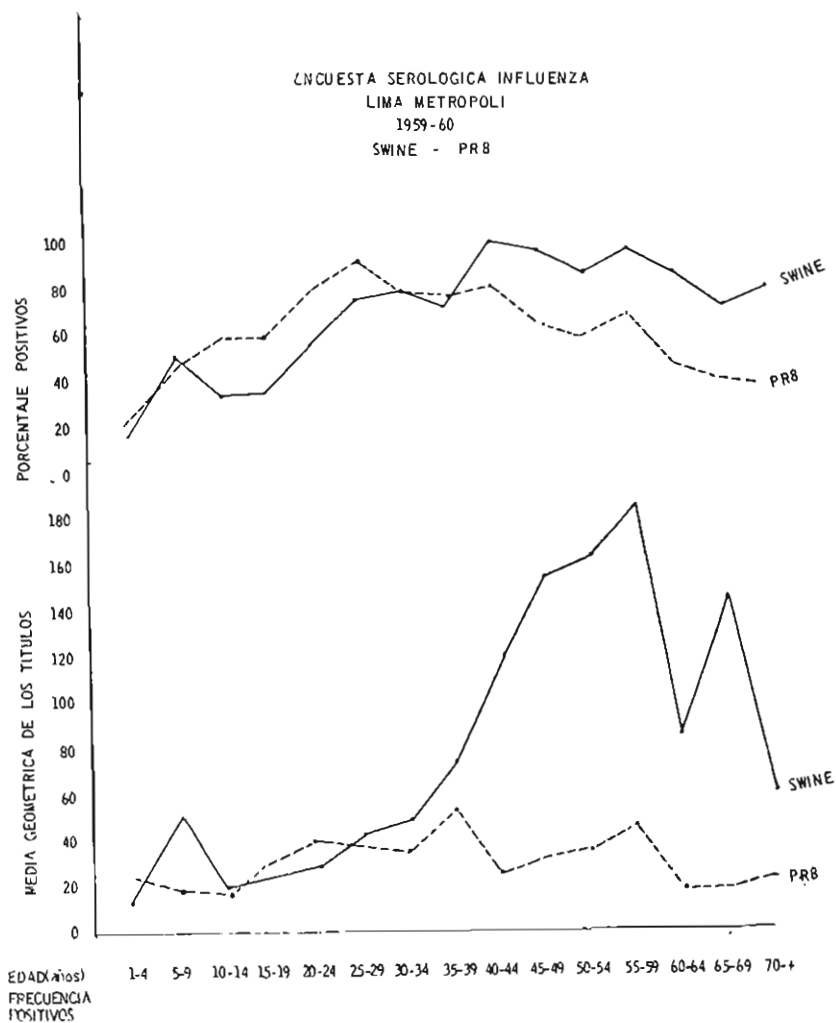


GRAFICO N° 7 (VER GRAFICOS N°s. 1 y 2)

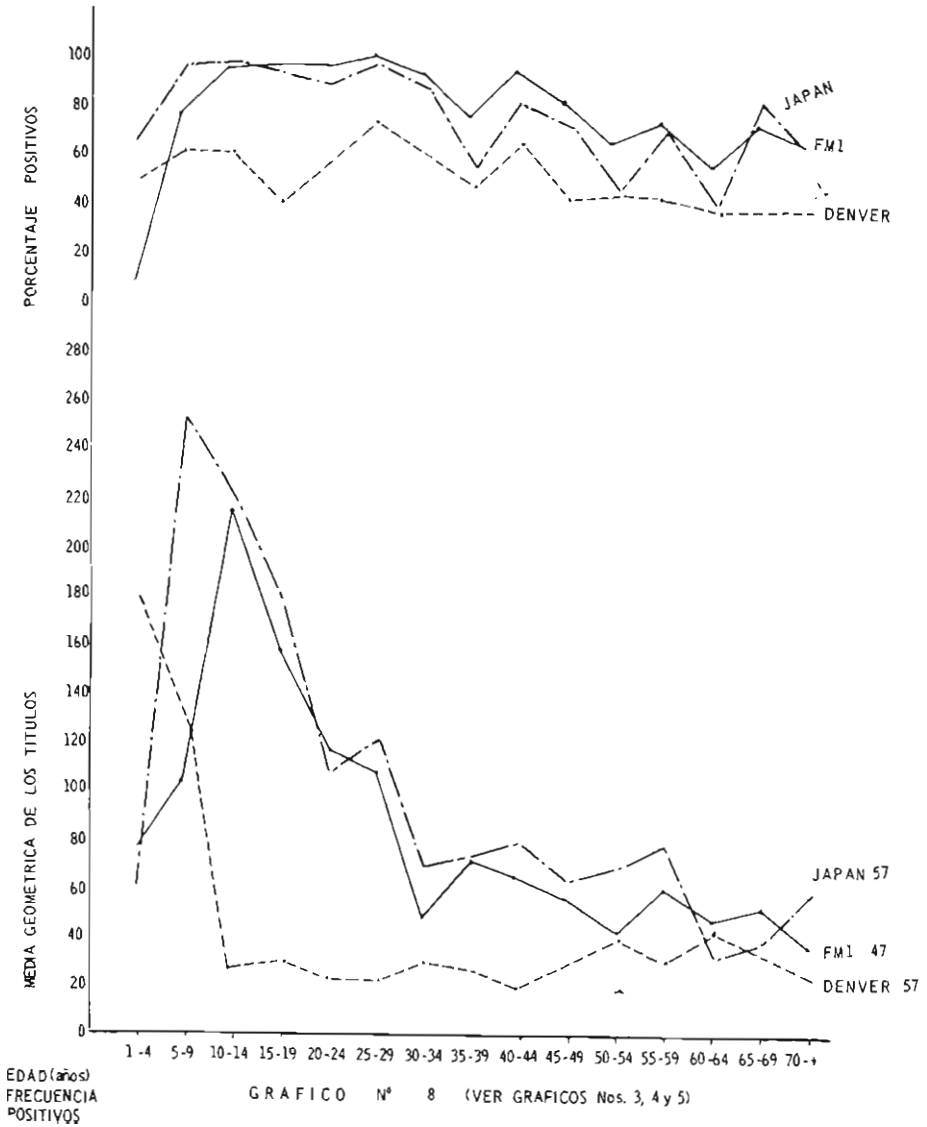
los de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y como porcentaje de sueros que tienen anticuerpos al nivel de 1:10 o más; además, también se muestra los números de sueros probados por grupos de edades. Como ha sido demostrado en encuestas realizadas en otros países se nota claramente los títulos bajos de anticuerpos contra estas cepas, sobre todo contra la cepa Swine, en el grupo de personas jóvenes que nacieron a posteriori a los años de prevalencia epidémica de las cepas Swine y PR8. El título máximo de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra virus Swine se ve que coincide en personas comprendidas entre los 55 a 59 años de edad, o sea los que nacieron entre los años 1899 y 1905 y en cuya juventud sucedió la pandemia de 1918-1919. Los títulos más altos de anticuerpos contra el virus PR8 se encuentra entre las personas de 35 a 39 años, las cuales nacieron entre el período de 1924-1929 y en cuya niñez ocurrió la prevalencia epidémica del PR8. Ahora bien, la curva de los porcentajes de incidencia nos muestra que la prevalencia está entre las personas de 25 a 29 años. Aunque es evidente la diferencia edad-específica en la curva del promedio geométrico de títulos de anticuerpos, la mayoría de las personas examinadas tenían anticuerpos contra ambas cepas de virus en títulos de 1:10 o más. Claro está que muchas de estas personas, sobre todo aquellas con título muy bajo y de edades posteriores a la de la epidemia producida por estos virus pueden reflejar, no la presencia de anticuerpos específicos, pero sí la presencia de parcelas antigénicas comunes y por tanto están dando reacciones de inhibición cruzada.

Distribución de anticuerpos de acuerdo a la edad contra virus prototipos de Influenza A: FM1, Denver y Japan 305-57.

La curva de la media geométrica de anticuerpos contra la cepa FM1, muestra una definida prevalencia entre los grupos jóvenes, especialmente incide en el grupo de personas entre los 10 y 19 años, correspondiendo a los grupos de "edad de choque" que recibió el impacto de la epidemia producida por este virus.

Es interesante anotar que las orientaciones de las curvas de los promedios de títulos de anticuerpos para los virus Japan 305-57 y Denver corren paralelos cuando se comparan los grupos jóvenes, en los cuales incide preferencialmente. La curva de anticuerpos para el Japan-305, muestra su ocurrencia mayor para los grupos de 1 a 9 años, siendo más notoria esta apreciación para el Denver, aunque es forzoso admitir que los títulos son menores. Indudablemente comprobamos la

ENCUESTA SEROLOGICA INFLUENZA
LIMA METROPOLI
1959 - 60
FM1-DENVER-JAPAN



ocurrencia reciente de estas epidemias, que están marcando, por así decirlo, los grupos más jóvenes de nuestra población. Podemos apreciar también la ocurrencia de títulos bajos de la población de edades mayores.

Distribución de anticuerpos de acuerdo a la edad contra virus prototipo de Influenza B: B-G1-1954.

En la figura N° 6, podemos apreciar en la primera parte de la curva que los títulos de anticuerpos parece seguir el molde observado por otros investigadores (Hilleman y col.). Se aprecia títulos iniciales bajos en los grupos de 1 a 9 años, para alcanzar su climax en el grupo de 10 a 14 años que se mantiene fugazmente y luego se observa una declinación más o menos marcada, observándose finalmente una tendencia a los títulos altos otra vez en los grupos de 60 años o más; parecería que la población examinada (de edad avanzada) hubiera soportado una doble onda epidémica por el mismo virus.

DISCUSION

El hecho de que en la época en que se realizó este estudio no existían trabajos sobre serología en Influenza en nuestro medio, motivó, además de los factores ya señalados en la Introducción, esta investigación, como un aporte al conocimiento de esta enfermedad en el país.

Dadas las características epidemiológicas de esta enfermedad, se consideró que una muestra de sangre tomada a priori para las diferentes edades y ambos sexos, equivalente al uno por mil de la población metropolitana, sería apropiada para los fines de esta investigación; además, las muestras fueron adecuadamente obtenidas de los diferentes sectores y estamos seguros que los resultados son bastante representativos, aunque opinamos que deben ser complementados con estudios posteriores en base a estos hallazgos.

Si bien la técnica de fijación de complemento es mucho más específica que la técnica de inhibición de la hemaglutinación para esta clase de estudios serológicos, sin embargo preferimos esta última porque se conoce que los títulos de anticuerpos fijadores de complemento son bajos y de relativamente poca duración, a diferencia de los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación que son más al-

los y más persistentes, lo que estaba más de acuerdo con la índole de nuestro trabajo y también porque las técnicas de fijación de complemento son más complicadas y más costosas.

Las cepas de virus utilizadas, si bien no son todas las encontradas hasta el momento, sin embargo representan antigénicamente todas las cepas de virus de Influenza contemporáneos y de épocas previas, y no miden, por lo tanto, el espectro de anticuerpos de acuerdo a la edad en la población humana.

Los resultados obtenidos nos demuestran que la población estudiada presenta anticuerpos contra todas las cepas de virus utilizados; dadas las características de las muestras, que la estimamos representativas de la población, consideramos la posibilidad de que, en general, suceda lo mismo con la población no estudiada, es decir, de que la Influenza como enfermedad siempre estuvo presente en nuestro medio.

Se confirma, al igual que en otros países, que las epidemias ocurridas en el pasado en otras regiones del Globo, también estuvieron presentes en el Perú y, algo más, los títulos elevados de anticuerpos en relación a las edades de las personas estudiadas, guardan relación con la aparición cronológica de dichas epidemias producidas por los virus de Influenza correspondientes; así, por ejemplo, los virus de Influenza de la epidemia última de 1957 que corresponde a la cepa Japan/305.57, da los títulos de anticuerpos más elevados en personas de edad temprana entre 1 y 9 años, precisamente aquellos que soportaron por primera vez el impacto de este virus el año 1957.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los autores presentan un trabajo en relación al problema de Influenza, estudiado desde el punto de vista serológico.

Se llevó a cabo en el año 1959-60 una encuesta serológica contra virus de Influenza, en 1276 personas de ambos sexos, cuyas edades fluctuaron entre uno y 99 años.

A los problemas propiamente médicos que produce la Influenza, hay que considerar los serios trastornos socio-económicos que son provocados por las epidemias de estos virus; esto hace que el estudio de esta virosis sea de interés mundial y por lo tanto se puntualiza la importancia y los objetivos que nos llevaron a realizar el presente trabajo.

Se emplearon las cepas de virus:

A-Swine-1876-30

A-PR8-34

A' FM1-47

A-Denver-1º-57

A-Japan-305-57

B-GL-54

Utilizando el test de inhibición de hemaglutinación. Se describe el material y métodos que fueron empleados.

El trabajo realizado indica que hay una alta prevalencia de Influenza en el medio estudiado en relación a los anticuerpos demostrados.

Se observó que la distribución de anticuerpos contra las distintas cepas empleadas, tomando en cuenta distintos grupos de edad, coincide con los hallazgos de otros países.

Los títulos más elevados de anticuerpos inhibidores de hemaglutinación contra un virus determinado, se encontraron en aquellas personas que tenían pocos años de edad en el momento en que se presentaron las epidemias de los virus correspondientes.

Se demostró que el test de inhibición de la hemaglutinación es una técnica sencilla y de bajo costo y que puede ser llevada a cabo en estudios epidemiológicos en gran escala, ayudando a conocer el estado inmunitario de una población.

Se señala la necesidad de tener servicios epidemiológicos que observen, estudien e investiguen permanentemente el problema desde sus diferentes aspectos, para lo cual es indispensable contar con eficientes servicios de laboratorio, que permitan conocer constantemente la prevalencia de los virus y su detección precoz en los brotes epidémicos.

BIBLIOGRAFIA

1. Bruno-Lobo Manoel. Gripe Asiática. Instituto de Microbiología. Río Janeiro 1958.
2. Davenport, Hennesy, Francis. Epidemiologic and immunologic significance of age distribution of antibody to antigenic variants of influenza virus. J. Exp. Med. 98: 641-656 1953.

3. Hilleman M. R.; Flotloy F. J.; Anderson S. A. y col. Distribution and significance of Asian and other Influenza antibodies in the Human Population. *New England J. Med.* 258: 969 (May 15) 1958.
4. Mulder. Asiatic Influenza in the Netherlands. *Lancet* 2: 334 1957.
5. Rivers M. Thomas, Horsfall Jr. F. L. *Viral and Rickettsial infections of Man.* Third Edition.
6. Richard E. R., Lennete E. H. and Horsfall F. L. A comprehensive study of influenza in a rural community. *Public Health Report* 55: 2146-2167. 1940.
7. Richard E. R., y col. The correlation between neutralizing antibodies in serum against influenza virus and susceptibility to influenza in man. *Public Health Report* 56: 1819-1834.
8. Travasos J., Bruno-Lobo M. y col. Estudos sobre a gripe asiática no Rio de Janeiro. I, II, III, IV. *Anais de Microbiologia.* Vol. V. 13-133.
9. Widelock D. and Klein S. Laboratory analysis of 1957-1958 influenza outbreak in New York City. Further seroepidemiological studies. *Amer. Jour. of Pub. Health*, 50: 649 1960.
10. Widelock D, Klein S. y col. Laboratory analysis of the 1957-1958 influenza outbreak (A/Japan) in New York City. I. Preliminary Report en Seroepidemiologic investigation and variant A/Japan isolate. *J. A. M. A.* 167: 541 (May 31) 1958.
11. Widelock D, Klein S. y col. Laboratory analysis of the 1957-1958 Influenza outbreak en New York City. II. A seroepidemiological study. *A. J. P. H.* 49: 847 (July) 1959.
12. Comitee on Standard Serological Procedures in Influenza Studies. Agglutination-inhibition test proposed a standard of reference in influenza diagnostic studies. *J. Immunolog* 65: 347-353, 1950.
13. American Public Health Association. *Diagnostic Procedures for Virus and Rickettsial Diseases.* Second Edition.