

## Tesis de Posgrado

# Epidemiología molecular de los virus influenza humanos circulantes en la Argentina en el período 1995-2002

Pontoriero, Andrea

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Pontoriero, Andrea. (2003). Epidemiología molecular de los virus influenza humanos circulantes en la Argentina en el período 1995-2002. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3659\\_Pontoriero.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3659_Pontoriero.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Pontoriero, Andrea. "Epidemiología molecular de los virus influenza humanos circulantes en la Argentina en el período 1995-2002". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3659\\_Pontoriero.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3659_Pontoriero.pdf)

*Universidad de Buenos Aires*  
*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LOS  
VIRUS INFLUENZA HUMANOS  
CIRCULANTES EN LA ARGENTINA EN EL  
PERÍODO 1 995 – 2 002**

AUTORA: LIC. ANDREA PONTORIERO

DIRECTORA: DRA. CELIA E. COTO

DIRECTORA ASISTENTE: BIOQ. VILMA SAVY

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
DOCTOR EN LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**LABORATORIO DE VIROSIS RESPIRATORIAS – DEPTO. VIROLOGÍA  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS (INEI)  
ANLIS “DR. CARLOS G. MALBRÁN”**

AÑO: 2003

3659

***Key words:*** Human Influenza Virus; Respiratory Infection; Argentine Influenza Strains; Influenza Epidemiology; Prevalent Influenza Strains; Influenza A and B viruses.

*Esta tesis está dedicada a mis padres y a mi hermano, por demostrarme su apoyo incondicional en este y en el resto de los proyectos que encaré a lo largo de mi vida. A Juan, por estar a mi lado como mi amor, mi compañero y amigo.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Celia E. Coto por haber aceptado dedicar parte de su tiempo a la fabulosa aventura de ser mi Directora de tesis. Por enseñarme, con paciencia y dedicación, a interpretar mi trabajo desde un punto de vista diferente, ayudándome así a enriquecer la información generada a partir de los resultados obtenidos.

Muy especialmente a la Dra. Vilma Savy, por su incentivo constante para generar nuevas cosas y su apoyo que me motivó para escribir este trabajo de tesis. Porque a pesar de las dificultades que tuvo que superar, me ayudó a concretar en el transcurso de seis años tres pasantías en Centros Internacionales de Referencia del exterior dándome así la posibilidad de crecer como profesional y como persona.

Muy especialmente también a la Dra. Elsa Baumeiter, que desde el momento que me recibió como estudiante de biología compartió conmigo todos sus conocimientos como así también al resto de las integrantes del Servicio de Virosis Respiratorias del Instituto INEI ANLIS “Carlos G. Malbrán”, Ana, Karina, Estela y Marta, por acompañarme en cada nueva idea y hacerme participe de sus proyectos. Por las facturas, las tazas de café y las palabras de apoyo que me ayudaron a seguir adelante en la mesada y en la vida.

A los directores y a los grupos de trabajo de los Centros Internacionales de Referencia de Londres y del CDC de Atlanta que me hicieron sentir una más dentro del laboratorio, por responder a todas mis inquietudes siempre, a pesar de la distancia y por acceder a apoyar nuestro trabajo con el envío de cepas y de reactivos que no habríamos podido obtener por otro medio.

Agradezco a todos los integrantes de los laboratorios que forman parte de la Red Nacional de Vigilancia de Influenza porque sin la colaboración y el esfuerzo personal de cada uno de ellos este estudio no habría sido posible.

A la Dra. Karin Bok, por ayudarme a entender un poco más acerca de cómo encarar un estudio de filogenia, por facilitarme algunas de las herramientas de análisis utilizadas en este trabajo de tesis y por enseñarme a organizar mis ideas.

Al Dr. Jorge Gómez, por toda la ayuda que me brindó siempre que la necesité.

A la Dra. Viviana Castilla por dedicar parte de su tiempo a enseñarme a llevar a cabo parte de la metodología utilizada en este estudio sin la cual no habría sido posible resolver uno de los objetivos planteados.

A todos los integrantes del Departamento de Virología del Instituto INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, que en mayor o en menor medida colaboraron en la realización de este trabajo.

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LOS  
VIRUS INFLUENZA HUMANOS  
CIRCULANTES EN LA ARGENTINA EN EL  
PERÍODO 1 995 – 2 002**

**AÑO: 2 003**

## **Epidemiología molecular de los virus Influenza humanos circulantes en la Argentina período 1 995-2 002**

### **Resumen.**

Se realizó un estudio de aislamiento de virus (virus respiratorios sincicial, adenovirus, parainfluenza, influenza A y B) causantes de infecciones respiratorias, en muestras de pacientes menores de cinco años internados por infección respiratoria aguda baja, entre los años 1 995 a 1 999. Se pudo demostrar que alrededor del 6% de los casos son debidos al virus influenza. Para ese mismo período las curvas de mortalidad por influenza y neumonía muestran que los grupos de riesgo de la población son los menores de cuatro años y los mayores de 65, siendo muy importante la mortalidad por esta causa para los mayores de 75 años. El análisis de los datos recolectados por el SINAVE durante el período 1 995-1 999 permitieron correlacionar los máximos de aislamientos positivos de virus influenza con los picos de morbilidad por síndrome tipo influenza notificados para toda la población.

El análisis antigénico y genómico de aislamientos de virus Influenza humano provenientes de distintas localidades de la República Argentina durante el período 1 995- 2 002 permitió establecer que las cepas circulantes de virus influenza A (H3N2) se relacionaron en forma cercana antigénicamente con las correspondientes cepas vacunales sólo a partir del año 1 999, mientras que las cepas H1N1 se relacionaron con las componentes vacunales durante los años 1 998, 2 000, 2 001 y el 2 002. Las cepas de influenza B no se relacionaron con las vacunales en los años 1 995, 2 002 y lo hicieron parcialmente en el 2 001. En la mayoría de los años estudiados hubo co-circulación de cepas de influenza A (H1N1 ), (H3N2) e influenza B. El análisis de la epidemiología del virus influenza en la Argentina permite concluir que el patrón epidemiológico es similar a lo que ocurre en el resto de los países del mundo desconociendo por el momento si nuestras aves también actúan como reservorios del virus así como el papel de los cerdos y otros mamíferos en el ciclo de vida de estos virus.

Este estudio demuestra también que una situación similar ocurre en los países del Cono Sur, especialmente para la cepas de virus influenza A.



## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ADV	Adenovirus
ANF	Aspirado nasofaríngeo
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNv	Ácido ribonucleico viral
ATB	Antibiótico
ATCC	"American Tissue Culture Collection"
CDC	"Centers for Disease Control and Prevention"
DI	Dosis infectante
DICT <sub>50</sub>	Dosis infectiva cultivo de tejidos 50
EBV	Epstein Barr
ECP	Efecto citopático
ELISA	Enzimoimmunoensayo
FC	Fijación de complemento
FDA	"Food and Drug Administration"
Flu A	Influenza A
Flu B	Influenza B
FluNet	"Global Influenza Surveillance Network"
GR	Glóbulos rojos
GROG	Grupo de observación de la gripe
HA	Hemaglutinina
Ha	Hemaglutinación
HA <sub>0</sub>	Hemaglutinina inmadura
HA <sub>1</sub>	Primera porción de la molécula hemaglutinina
HA <sub>2</sub>	Segunda porción de la molécula hemaglutinina
HEF	Proteína de fusión hemaglutinina-esterasa
HN	Hisopados nasales
HNF	Hisopados nasales y faríngeos
ICTV	Comité Internacional Taxonómico de Virología
IF	Inmunofluorescencia
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgA	Inmunoglobulina clase A
IgM	Inmunoglobulina clase M
IHA	Inhibición de la hemaglutinación
IRA	Infección respiratoria aguda
IRAB	Infección respiratoria aguda baja
Kda	Kilodaltons
M1	Proteína matriz
M2	Proteína-canal transmembrana
MDCK	Células de riñón de perro Madin-Darby
MEM	"Modified Eagle medium"
NA	Neuraminidasa
NC	Nucleocápside
NP	Nucleoproteína viral
NS1	Proteína no estructural 1
NS2	Proteína no estructural 2
Nt	Nucleótido

OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PA	Polimerasa A
PARA	Parainfluenza
Pb	Pares de bases
PB1	Polimerasa B1
PB2	Polimerasa B2
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Marcador de peso molecular
PMK	Cultivos primarios de riñón de mono
RDE	Enzima destructora de receptor
RFLPs	"Restricción fragment length polymorphism"
RN	Reacción de neutralización
RPM	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Animal
SF	Solución fisiológica
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
UHA	Unidad hemaglutinante
UV	Ultravioleta
VERO	Células de riñón de mono verde africano
VRS	Virus Sincicial Respiratorio

## Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Virus Respiratorios	1
I.1.1 Generalidades	4
I.2 Virus influenza	4
I.2.1 Generalidades	4
I.2.2 Taxonomía	6
I.2.3 Morfología y estructura	7
I.2.4 Genoma viral y productos génicos	7
I.2.5 Diferencias entre los géneros	12
I.2.6 Ciclo de replicación	14
I.2.7 Variabilidad genética	21
I.2.8 Cuadro clínico	24
I.2.9 Patogénesis	25
I.2.10 Diagnóstico	26
I.2.11 Situación epidemiológica	31
I.2.12 Reservorios	34
I.2.13 Prevención y control	38
I.2.14 Vigilancia epidemiológica	42
I.2.15 Situación en la Argentina	44
II. OBJETIVOS	47
III. MATERIALES Y MÉTODOS	48
III.1 Virus	48
III.2 Células	48
III.3 Medios de cultivo	48
III.4 Anticuerpos monoclonales	48
III.5 Titulación de virus por hemaglutinación	50
III.6 Aislamiento viral	51
III.6.1 Procesamiento de las muestras clínicas	51
III.6.2 Detección de antígeno de NP viral por IFI	52
III.6.3 Infección de cultivos celulares	52
III.6.4 Amplificación del stock viral	53
III.7 Técnica de IHA	54
III.7.1 Tratamiento de los sueros	56
III.7.2 Calibración del stock viral	56
III.7.3 IHA	56
III.8 Análisis genómico	58
III.8.1 Extracción de ARN total	60
III.8.2 Síntesis de ADNc	60
III.8.3 Amplificación mediante PCR	61
III.8.4 Programación del termociclador	62
III.8.5 Visualización de los productos de PCR	63
III.8.6 Técnica de RT-PCR semi-anidada	63

III.8.7 Purificación de las bandas correspondientes a los productos de PCR de la porción HA1 y NA	66
III.8.8 Secuenciación	68
III.9 Análisis de resistencia antiviral	71
III.9.1 Detección de genomas mutantes	72
III.9.2 Estudio de sensibilidad a la rimantadina <i>in vitro</i>	75
IV. RESULTADOS	78
IV.1 Morbilidad y mortalidad en la Argentina en el período 1 995-1 999	78
IV.1.1 Registro de tasa de mortalidad	78
IV.1.2 Aislamiento de virus respiratorios en el grupo etario de los niños menores de cinco años de edad, el período 1 995-1 999	80
IV.2 Indicadores de períodos epidémicos	83
IV.2.1 Morbilidad por síndrome tipo influenza, 1 995-2 001	83
IV.2.2 Mortalidad por influenza y neumonías, 1 990-1 999	84
IV.3 Relación entre las notificaciones al SINAVE del número de síndromes tipo influenza y el número de aislamientos de influenza	88
IV.4 Origen de las cepas de virus influenza utilizadas para su posterior estudio antigénico y genómico	90
IV.5 Cepas prevalentes	91
IV.5.1 Número de subtipificaciones, cepas virales recuperadas en cultivo y caracterizaciones antigénicas de cepas argentinas	91
IV.5.2 Resultados de la caracterización antigénica de cepas argentinas y su comparación con cepas vacunales	93
IV.5.3 Número de subtipificaciones, aislamientos y caracterizaciones antigénicas de las cepas regionales, período 1 999-2 002	98
IV.5.4 Resultados del análisis filogenético de las cepas argentinas y regionales, período 1 995-2 002	100
IV.5.4.1 Estudio molecular de la HA viral	100
IV.5.4.2 Estudio molecular de la NA viral	129
IV.7 Análisis de resistencia antiviral	145
V. DISCUSION	150
VI. CONCLUSIONES	164
VII. BIBLIOGRAFÍA	166

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1- Virus Respiratorios

### I.1.1- Generalidades

Los virus (lat: veneno) están ampliamente distribuidos en la naturaleza afectando a los organismos de los reinos animal y vegetal, protistas y hongos. Debido a su capacidad para producir enfermedad son causa de epidemias severas en el hombre y/o en los animales ocasionando graves problemas de salud pública y cuantiosas pérdidas económicas cuando afectan al ganado o a las plantas que se utilizan como alimento.

El nombre virus respiratorios no obedece a una división taxonómica sino que reúne a numerosos agentes virales pertenecientes a distintas familias que tienen como blanco el aparato respiratorio y producen cuadros clínicos similares (1). Los virus respiratorios ingresan al organismo por vía aerógena y su sitio de replicación es el tracto respiratorio. La infección no sólo ocurre por vía aerógena (gotitas de Flüge) sino también por las manos u objetos contaminados con secreciones.

Los virus que producen infecciones respiratorias agudas (IRA), se ubican en diferentes familias de acuerdo a sus características. Algunos de ellos, como el virus del sarampión y de la parotiditis no quedan localizados en la puerta de entrada, sino que se diseminan a otros órganos por medio de la sangre.

Clínicamente, las IRA pueden clasificarse en altas y bajas. Las IRA altas son aquéllas que afectan los órganos ubicados por encima de la laringe (rinitis, faringitis, sinusitis, etc.), mientras que las IRA bajas afectan los órganos ubicados por debajo de la laringe (bronquitis, bronquiolitis, neumonía, etc.), pudiendo por ello revestir mayor gravedad y ser causales de muerte.

Las IRA del tracto respiratorio inferior son una de las principales causas de mortalidad de niños en el mundo, particularmente en países en desarrollo, causando aproximadamente un tercio de todas las muertes estimadas en niños menores de cinco años. En la Argentina, la dificultad respiratoria del recién nacido y las neumonías representan la segunda y la cuarta causa de mortalidad en menores de un año y en niños de uno a cuatro años, respectivamente (2). Es importante recordar que las

infecciones respiratorias pueden ser producidas no solamente por virus, sino también por bacterias, clamidias, rickettsias, micoplasmas, hongos o parásitos. Sin embargo, entre los agentes etiológicos descritos, los virus se reconocen como los agentes etiológicos predominantes en las IRA, tanto en niños como adultos, ya sea en países en desarrollo o en países industrializados. En los cuadros 1a y 1b se mencionan los virus respiratorios humanos y otros virus que no se consideran respiratorios pero como consecuencia de la infección que originan pueden producir infección respiratoria aguda en el hombre.

**Cuadro 1a. Virus respiratorios humanos**

Familia	Subfamilia	Género	Especies-Tipo	Hospedador
<i>Orthomyxoviridae</i>		<i>Influenzavirus A</i>	Virus influenza A	Vertebrados
		<i>Influenzavirus B</i>	Virus influenza B	Vertebrados
		<i>Influenzavirus C</i>	Virus influenza C	Vertebrados
		<i>Thogotovirus</i>	Virus thogoto	Vertebrados
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Morbillivirus</i>	Virus sarampión	Vertebrados
		<i>Respirovirus</i>	Parainfluenza 1 y 3	Vertebrados
		<i>Rubula</i>	Parainfluenza 2, 4a y 4b	Vertebrados
	<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	Virus respiratorio sincicial	Vertebrados
		<i>Metapneumovirus</i>	Metaneumovirus	Vertebrados
<i>Adenoviridae</i>		<i>Mastadenovirus</i>	Adenovirus humano C	Vertebrados
<i>Picornaviridae</i>		<i>Rhinovirus</i>	Rinovirus humano 1A	Vertebrados
<i>Coronaviridae</i>		<i>Coronavirus</i>	Coronavirus humano SARS-Co	Vertebrados Vertebrados

**Cuadro 1b. Otros virus capaces de causar infección respiratoria aguda**

Familia	Subfamilia	Género	Tipo-Especies	Hospedador
<i>Picornaviridae</i>		<i>Enterovirus</i>	Poliovirus	Vertebrados
			Enterovirus humano B	Vertebrados
			Enterovirus humano C	Vertebrados
<i>Herpesviridae</i>	<i>Alfaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Herpesvirus humano 1	Vertebrados
	<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Varicellovirus</i>	Virus varicela-zoster	Vertebrados
		<i>Citomegalovirus</i>	Citomegalovirus	Vertebrados

Los virus más comunes productores de IRA altas son los rhino, los corona y los virus influenza mientras que los causales de las IRA bajas son virus respiratorio sincicial (VRS), parainfluenza y adenovirus en niños e influenza y VRS en ancianos y grupos de riesgo. Sin embargo, otros virus además de los mencionados, pueden causar afecciones respiratorias altas o bajas en niños; entre ellos puede mencionarse al virus herpes simplex, el Epstein Barr (EBV), el virus del sarampión y el de parotiditis. La infección viral puede causar por sí misma una enfermedad leve o grave o puede complicarse favoreciendo una posterior infección bacteriana. La neumonía viral es más común que la neumonía bacteriana en los niños, pero el riesgo de muerte es considerablemente menor. En los adultos, la infección viral se encuentra muchas veces en el origen de una neumonía bacteriana severa.

En un estudio multicéntrico internacional coordinado por *el Board on Science and Technology for International Development* de la *National Academy of Sciences* de Estados Unidos, se determinó que en las neumonías la etiología viral está presente en mayor proporción que la bacteriana, variando los porcentajes de identificación viral según el país entre 17 y 44% de las IRA en niños menores de cinco años. Los virus aislados más frecuentemente fueron el VRS, entre 11 y 37% del total de casos estudiados; el adenovirus, entre 1 y 7%; los parainfluenza 1 y 3, entre 1 y 11%; y los influenza A y B, entre 1,4 y 4,3%.

Investigaciones similares a las descriptas son poco comunes en la Argentina. El primer estudio basado en las características clínicas, etiológicas y epidemiológicas de estas infecciones en niños fue llevado a cabo entre 1984 y 1988 en Buenos Aires (3). Los resultados demostraron la existencia de etiología viral en el 30% de 1003 niños hospitalizados, etiología bacteriana en el 10,9% e infecciones mixtas viral-bacteriana en el 3,3%. VRS fue el virus aislado más frecuentemente en lactantes asociado principalmente con bronquiolitis. El segundo virus más frecuente fue adenovirus.

Los datos que se poseen para personas adultas son escasos, aunque se considera que entre un 8 y un 15% de las neumonías son producidas por virus.

Como este trabajo de tesis se refiere a los virus Influenza, su tipo y importancia dentro de nuestro país presentaremos a continuación una descripción detallada de las características de esta familia de virus.

## **I.2- Virus influenza**

### **I.2.1- Generalidades**

El término “influenza” fue introducido por los italianos a principios del siglo XI debido a que se observaba que dicha enfermedad estaba “influenciada” tanto por las estrellas como por el clima frío. Posteriormente este término fue adoptado en Inglaterra durante una epidemia que ocurrió dos siglos después. El término que designa a esta enfermedad en nuestro idioma es gripe, si bien en este trabajo de tesis utilizaremos indistintamente los términos influenza o gripe.

Los primeros informes sobre la enfermedad producida por influenza incluyen una epidemia ocurrida en el año 412 AC, registrada por Hipócrates y Livy (4). Le atribuyen también a la gripe ser la causa probable de la pestilencia que devastó la ciudad de Atenas en 430 AC durante la guerra del Peloponeso; de originar una epidemia de infección respiratoria en las tropas de Carlomagno y varias epidemias de fiebre y tos desde la Edad Media hasta el 1500; ser la enfermedad que debilitó las armadas francesas e inglesas durante la Guerra de los Cien Años y la epidemia ocurrida en la corte de María Tudor en 1562. Sin embargo, la mayoría de estos eventos carecen de sustento científico y la discusión de los mismos es considerada como poco seria.

La primera descripción de una epidemia donde los síntomas fueron claramente causados por el virus influenza ocurrió en 1734 DC (5) y, a pesar de que varios informes sugerían la existencia de epidemias causadas por influenza durante los siglos 14 y 15, el siguiente informe convincente lo escribió Molineux recién en 1694.

En el siglo XX ocurrieron tres pandemias: la “influenza Española” en 1918 (subtipo H1N1), la “influenza Asiática” en 1957 (subtipo H2N2) y la “influenza de Hong Kong” en 1968 (subtipo H3N2). A pesar de que los virus pandémicos que circularon en 1957 y 1968 afectaron a un amplio segmento de la población, las tasas de fatalidad registradas no fueron excepcionales al compararlas con epidemias provocadas por cepas altamente patogénicas. La pandemia de 1918 provee el mejor ejemplo de un virus influenza humano altamente infeccioso; se estima que este virus



causó entre 40 y 50 millones de muertes en todo el mundo, siendo los adultos jóvenes los más afectados.

La gripe es el nombre dado a la enfermedad respiratoria aguda causada por los virus influenza A y B, esta enfermedad altamente contagiosa se caracteriza por sus apariciones en forma de epidemias anuales y con una periodicidad irregular y mucho más amplia en forma de pandemias. La infección gripal cursa con un amplio abanico de presentaciones clínicas que incluyen desde formas autolimitadas hasta cuadros respiratorios de vías altas y bajas con repercusión sistémica y a veces complicaciones en órganos vitales. Esta enfermedad puede surgir en cualquier parte del mundo y en cualquier momento del año, pero en los países de clima templado suele diseminarse mayoritariamente durante los meses de invierno.

El reconocimiento de la capacidad de cambio de las características antigénicas de este virus (se discutirá más adelante) llevó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a establecer en 1948 una Red de Vigilancia de Influenza global con el objeto de detectar los cambios en los virus causantes de brotes de influenza a lo largo del año en diferentes partes del mundo. Desde 1973, la OMS ha publicado recomendaciones formales para las composiciones de las vacunas de influenza basados en la información recolectada por dicha Red. Desde 1998, se llevan a cabo dos recomendaciones por año, en febrero y septiembre con el objeto de determinar la fórmula de la vacuna a utilizar durante la siguiente temporada invernal en los hemisferios norte y sur, respectivamente.

En el estudio del virus influenza se han llevado a cabo importantes avances médicos en un período relativamente corto. El virus influenza A fue identificado por primera vez por Wilson Smith, Christopher Andrewes y Patrick Laidlaw en 1933 (6) cuando lograron infectar hurones con lavados faríngeos humanos. De esta forma aislaron la cepa prototipo del virus influenza A humano. Más tarde se demostró, que el virus influenza A podía infectar también a ratones adultos y huevos embrionados. Los virus influenza B, a diferencia de los virus influenza A, fueron aislados recién en 1940 por Francis (7) y los virus influenza C en 1950 por Taylor (8). El cultivo de este virus en huevos embrionados de pollo en 1940 por Burnet (9) y el descubrimiento del fenómeno de hemaglutinación por Hirst en 1941 (10) condujeron al desarrollo de vacunas inactivadas y de métodos aplicables a la detección y cuantificación de anticuerpos tipo-específicos.

## I. 2.2- Taxonomía

El descubrimiento del virus influenza A en humanos, mediante la inoculación en hurones dio el nombre taxonómico original a la familia que durante años se denominó *Myxoviridae* por agrupar a virus con afinidad por los receptores de células epiteliales de las mucosas. El nombre de myxovirus (*myxos*: moco) deriva de su afinidad por la mucina, mucoproteína presente en las secreciones respiratorias, en el suero sanguíneo y en receptores existentes en la membrana de los hematíes y algunos tejidos epiteliales. Cuando más adelante se descubrieron los virus parainfluenza aislados a partir de muestras de cuadros respiratorios, que en ocasiones podían confundirse con algunas formas de gripe, el Comité Internacional Taxonómico de Virología (ICTV) decidió agrupar a los virus gripales en la familia *Orthomyxoviridae* (ortho=verdadero) y a los virus parainfluenza en otra familia denominada *Paramyxoviridae*. Posteriormente, la familia *Orthomyxoviridae* fue ubicada en el séptimo informe del Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) dentro del orden *Mononegavirales*. Desde el punto de vista taxonómico la familia *Orthomyxoviridae* incluye cuatro géneros denominados *virus Influenza A*, *Influenza B*, *Influenza C* y *Thogotovirus* (ver cuadro 2).

**Cuadro 2. Integrantes de la familia *Orthomyxoviridae* y sus huéspedes**

Géneros	Tipos de huéspedes
<i>Influenza A</i>	Aves acuáticas, aves de corral, cerdos, caballos, mamíferos acuáticos, visón, humanos.
<i>Influenza B</i>	Humanos.
<i>Influenza C</i>	Humanos, cerdos.
<i>Thogotovirus</i>	Garrapatas.

Existen diferencias significativas entre los distintos géneros de virus influenza a nivel de organización genética, estructura, rango de huésped y características clínicas y epidemiológicas. Sin embargo, estos tres géneros comparten algunas características que son fundamentales para su comportamiento biológico como ser: presencia de envoltura derivada del hospedador, glicoproteínas de envoltura que son

de gran importancia en la entrada y egreso del virus de las células y un genoma segmentado de ARN de polaridad negativa.

Los géneros *influenza A* e *influenza B* representan a los agentes más importantes a considerar dentro de la virología clínica humana. El género *influenza C*, en cambio, presenta características estructurales y biológicas algo diferentes y es de importancia mucho menor en patología humana que los anteriores. Finalmente, un cuarto género denominado *Thogotovirus* fue propuesto y aceptado para incluir en la misma familia e incluye otros virus que tienen seis o siete segmentos de ARN y son transmitidos por ácaros e infectan al hombre en forma ocasional.

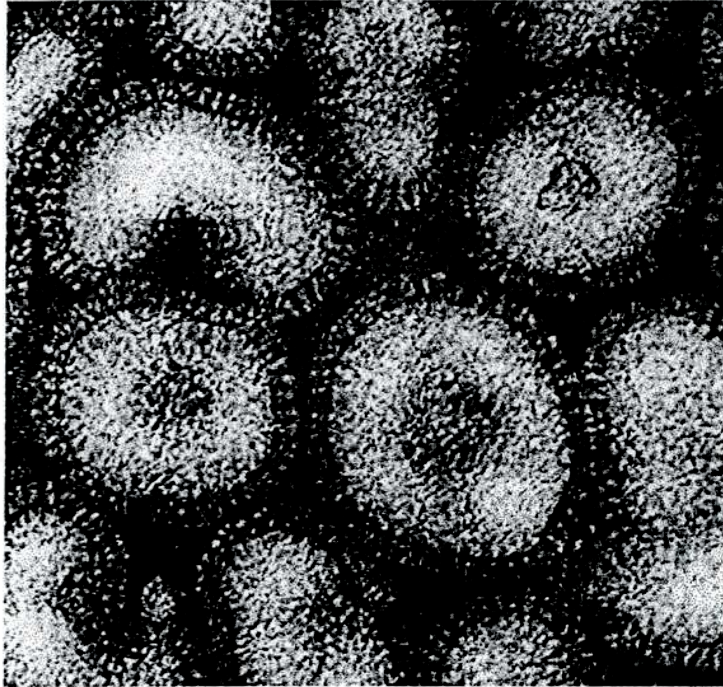
La nomenclatura estándar para los virus influenza incluye el tipo de influenza (A, B o C), lugar de aislamiento original, número de designación de la cepa en el laboratorio de origen y año del aislamiento. Por ejemplo, al virus influenza A aislado por Francis a partir de un paciente de Puerto Rico en el año 1934 se le da la designación de la cepa A/Puerto Rico/8/34.

### **I.2.3- Morfología y estructura**

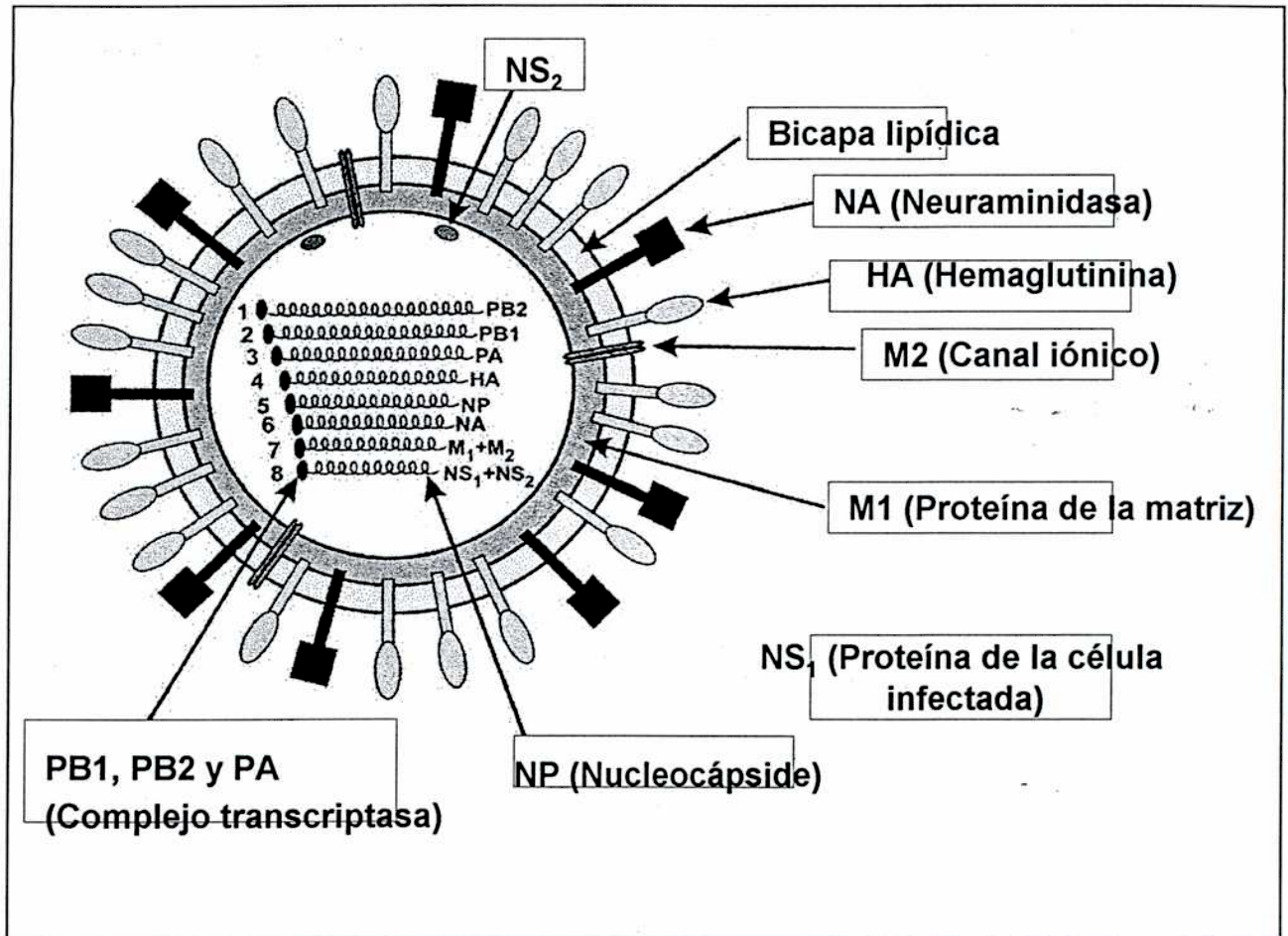
Las características morfológicas de todos los tipos de virus influenza, subtipos y cepas son similares. Estudios de microscopía electrónica estiman que el diámetro de estos virus oscila entre 80 y 120 nm y presentan a la partícula viral como virus envueltos cubiertos con proyecciones en su superficie o espículas, ver figura 1. Las partículas son esféricas pero también aparecen con formas filamentosas o alargadas. Este tipo de morfología predomina en las cepas aisladas más recientemente, mientras que la mayoría de las cepas adaptadas al laboratorio son partículas esféricas. Las formas filamentosas varían en longitud pero pueden medir hasta 40 nm.

### **I.2.4- Genoma viral y productos génicos**

Los virus influenza son virus envueltos cuyo genoma es ARN de polaridad negativa segmentado (ARN mensajero complementario). En la figura 2 se muestra un



**Figura 1:** Micrografía crioelectrónica del virus influenza B.  
Textbook of Influenza, Nicholson, K.; Webster, R. & Hay, A, 1998.

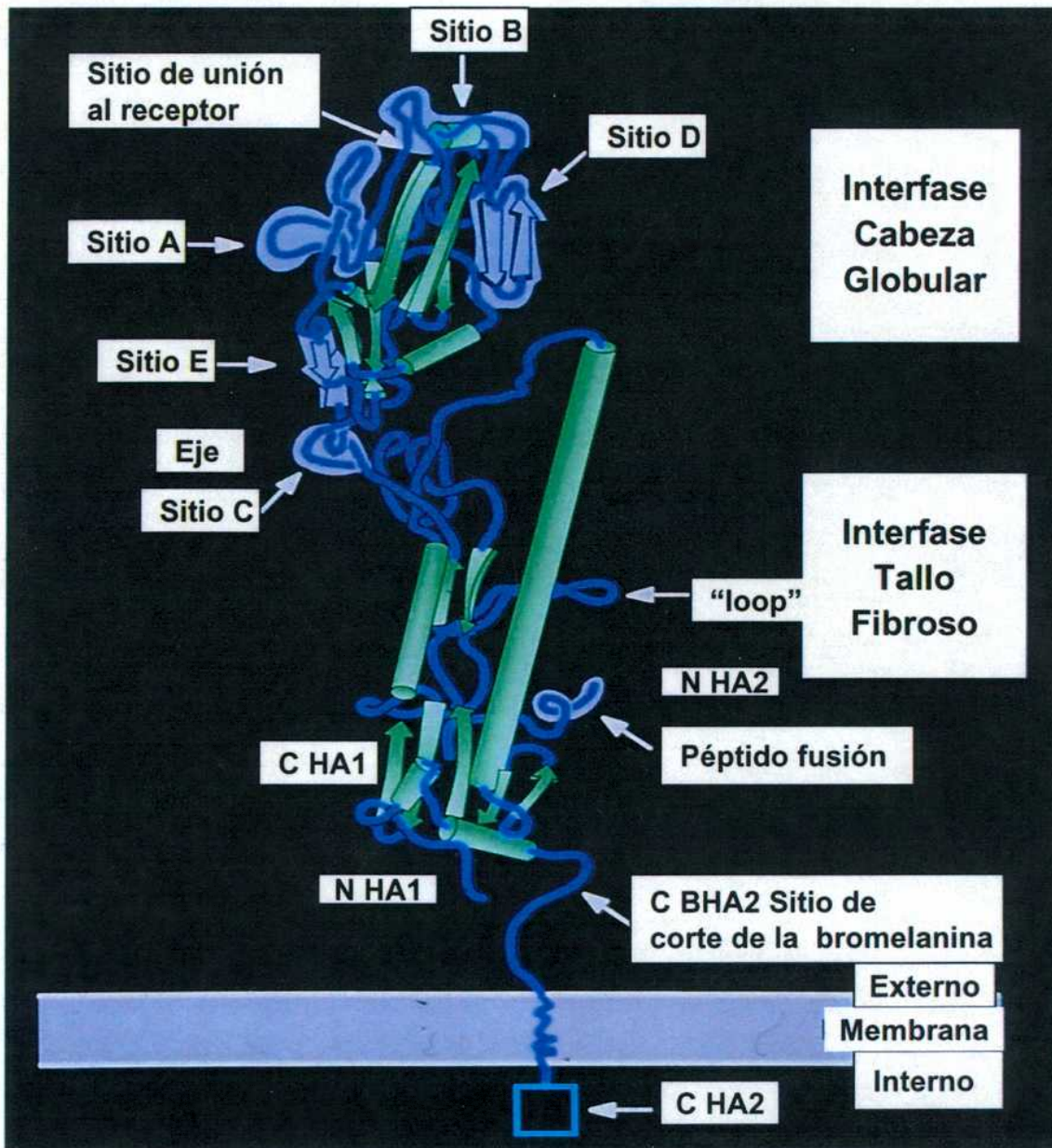


**Figura 2:** Diagrama esquemático de la estructura de la partícula del virus influenza A  
Fields, Virology, Volumen 1, 4<sup>o</sup> edición. Lippincott Williams & Wilkins, 2 001.

dibujo esquemático de la partícula viral. Embebidas en la membrana viral, se encuentran dos glicoproteínas de superficie: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), que constituyen el 40% y el 5% del total de las proteínas virales respectivamente.

Estructuralmente, la HA de los virus influenza es una proteína tetramérica cuyo peso molecular es de aproximadamente 220 KDa. por trímero. Esta proteína es sintetizada como un monómero ( $HA_0$ ) que es procesado post-traduccionamente por las proteasas presentes en la célula huésped para obtener dos componentes:  $HA_1$  y  $HA_2$ , los cuales permanecen unidos. Cada monómero a su vez, puede dividirse en tres dominios: 1) una porción grande, hidrofílica, citoplasmática, ubicada en la superficie externa del virus; 2) una porción pequeña, transmembrana, de 25 a 30 aminoácidos y 3) un dominio pequeño, hidrofóbico, ubicado en la cara interna de la membrana viral (11). La estructura tridimensional del dominio externo, citoplasmático, demuestra la existencia de dos regiones distintas: una cadena triple superenrollada con estructura de alfa-hélice que se extiende a partir de la membrana (compuesta principalmente por  $HA_2$ ) y una región globular de hojas plegadas-beta ( $HA_1$ ), que contiene los sitios antigénicos y el sitio de unión al receptor celular en el extremo de la molécula, el cual se activa a bajo pH dentro del endosoma durante la entrada del virus al interior de la célula, ver figura 3. Esta región globular está ubicada en el extremo de la molécula. La HA puede ser removida del virión intacto mediante sulfato de sodio, bromelaina o por quimotripsina

La NA consiste en un tetrámero de subunidades idénticas con forma de hongo donde se ubican, al igual que en la HA, los sitios antigénicos y el sitio con actividad destructora del receptor necesaria para la liberación del nuevo virus formado a partir de la superficie de las células infectadas. Hasta el presente, se han descrito en los virus influenza tipo A 15 HA antigénica y genéticamente diferentes (H1 a H15), al igual que al menos 9 NA (NA1 a NA9). Una tercer proteína integral de membrana, la proteína M2, también está presente en pequeñas cantidades en la envoltura viral. La misma consiste en un canal iónico tetramérico que, mediante la acidificación del interior del endosoma, permite la liberación de la nucleocápside (NC) al citoplasma celular luego de la fusión de la membrana del endosoma con la membrana citoplasmática.



**Figura 3:** Estructura del dominio extracelular de la hemaglutinina del virus influenza y su orientación con respecto a la membrana lipídica de la envoltura viral representada esquemáticamente.

Foto cedida por el Dr. Alan Hay, NIMR, Londres, UK

La membrana lipídica viral deriva de la membrana citoplasmática de las células infectadas durante el proceso de brotación. En el interior de la envoltura se encuentra la proteína matriz o proteína M1, la cual tapiza el interior de la membrana lipídica viral. La función de esta proteína es la de conferir estabilidad al virión. En el interior se ubican los ocho segmentos de ARN de los virus influenza A y B y siete segmentos de los virus influenza C que a su vez están “encapsidados” independientemente por la nucleoproteína viral (NP) formando la NC. Existen tres subunidades proteicas denominadas PB1, PB2 y PA que constituyen el complejo transcriptasa. Cada segmento de ARNv asociado a la NP está unido a un complejo transcriptasa (ver cuadro 3). Estas proteínas llamadas “internas” son importantes blancos para la reactividad cruzada mediada por linfocitos T citotóxicos virus-específicos. También existen dos proteínas no estructurales llamadas NS1 y NS2 que se encuentran en el interior de las células infectadas. Sin embargo, se ha descrito recientemente que la proteína NS2 se encuentra en pequeña cantidad formando parte de la partícula viral por lo tanto serían nueve las proteínas estructurales presentes en los virus A y B.

#### **I.2.5- Diferencias entre los géneros**

La mayoría de los segmentos codifican para una única proteína aunque hay excepciones. Como se comentó antes los genomas de los virus influenza A y B consisten de ocho segmentos mientras que los virus influenza C sólo contienen siete segmentos. Un segmento simple de ARN de los virus influenza codifica para una proteína de fusión hemaglutinina-esterasa (HEF), la cual posee tanto el sitio de unión al receptor como también la actividad de fusión de membranas de la HA y la actividad destructora del receptor de la NA, las cuales están codificadas por segmentos de genes separados en los virus influenza A y B.

La proteína M1 o de matriz está codificada en los virus A y B por la secuencia completa del fragmento siete, mientras que en los virus C, M1 es el resultado de un “splicing” en el segmento seis. La proteína M2 (canal iónico) del virus A es codificada por un segundo marco de lectura del segmento siete y tiene su equivalente



**Cuadro 3. Genoma del virus influenza A, sus proteínas y funciones**

Segmento de ARN	Proteína Codificada	Localización en el virión	Funciones
1	PB1	Interna	ARN polimerasa, síntesis de ARN complementario.
2	PB2	Interna	Endonucleasa cap-dependiente, se une al ARN celular con "cap" y lo corta para dar origen a los cebadores necesarios para la síntesis de ARN mensajero viral.
3	PA	Interna	Replicación del ARN viral.
4	HA	Externa	Adsorción y penetración a la célula. Fusión de membranas (célula-virus). Hemaglutinación de eritrocitos. Inducción de anticuerpos neutralizantes.
5	NA	Externa	Acción enzimática. Participa de la ruptura del ácido siálico de la superficie celular permitiendo su liberación a partir de la membrana. Previene la agregación. Induce anticuerpos inhibidores de la NA.
6	NP	Interna	"Encapsidación" del ARN, regulación de transcripción/replicación.
7	M1	Interna	Controla el transporte nuclear. Participa en el ensamblado y brotación viral.
	M2	Transmembrana	Actúa como canal iónico, regula el pH en el interior endosoma.
8	NS1	No estructural	Regula el transporte desde el núcleo del ARN mensajero.
	NS2	No estructural	Mutaciones en esta proteína resultan en un incremento de partículas defectivas-interferentes.

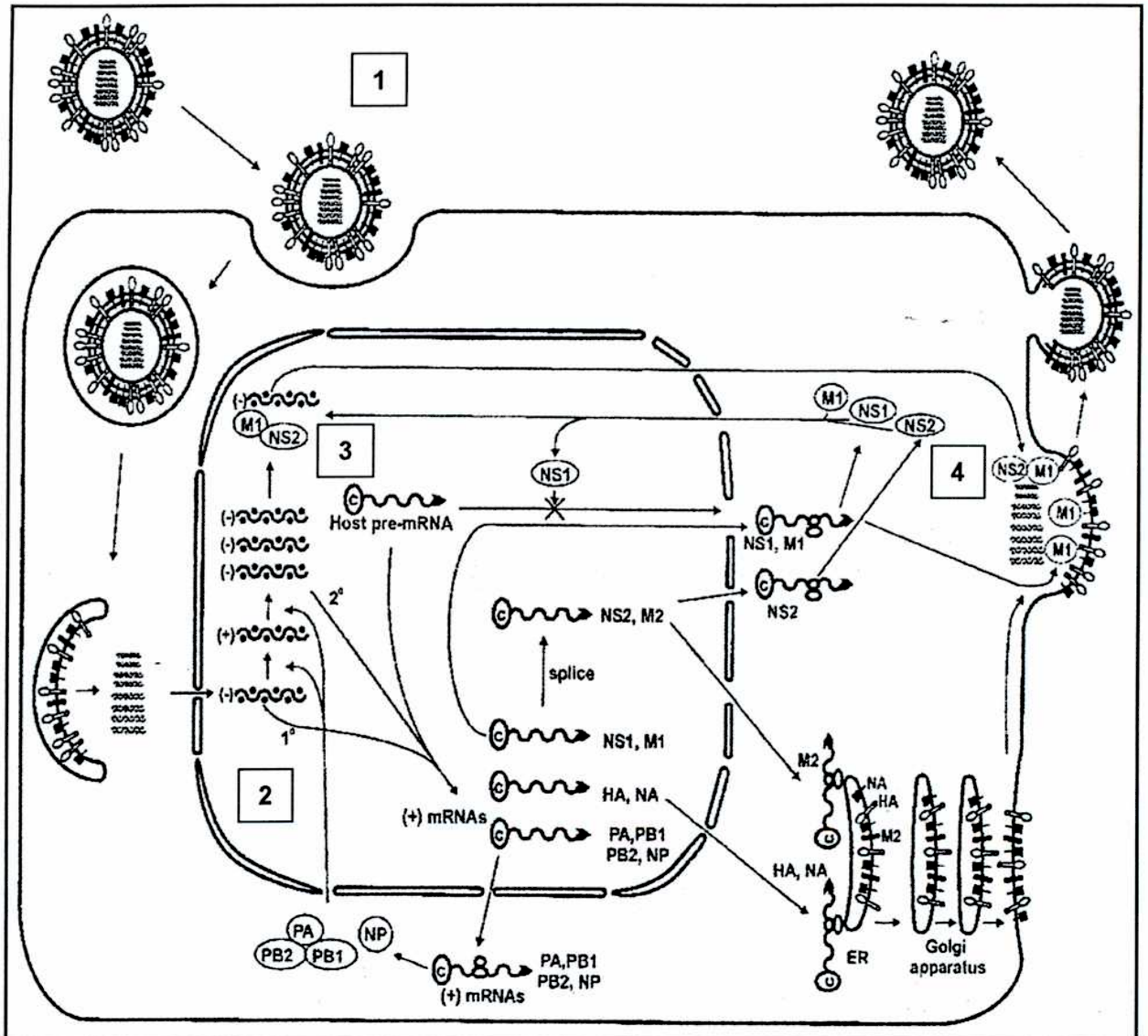
funcional en la proteína NB del virus B codificada en este virus por una región más corta del segmento genómico seis que codifica también la NA. En los virus C la proteína equivalente sería la CM2 codificada por el segmento seis, ya que este género solo posee siete segmentos de ARN. Como puede observarse el segmento siete de los virus B codifica para una proteína más pequeña (BM2) que no aparece en los virus A ni C, cuya función se desconoce. Finalmente las proteínas NS1 y NS2 están codificadas por el segmento ocho en los virus A y B y por el siete en los virus C.

Debido a las diferencias en el número de segmentos y a las equivalencias funcionales distintas de sus productos; las siglas de denominación bioquímica no se corresponden con la funcionalidad de la proteína. En resumen: en los virus gripales tipo A los ocho segmentos genómicos codifican por diez polipéptidos (estructurales y no estructurales) mientras que en los virus tipo B codifican por once polipéptidos. Los virus C con siete segmentos codifican por nueve polipéptidos.

#### **I.2.6- Ciclo de replicación**

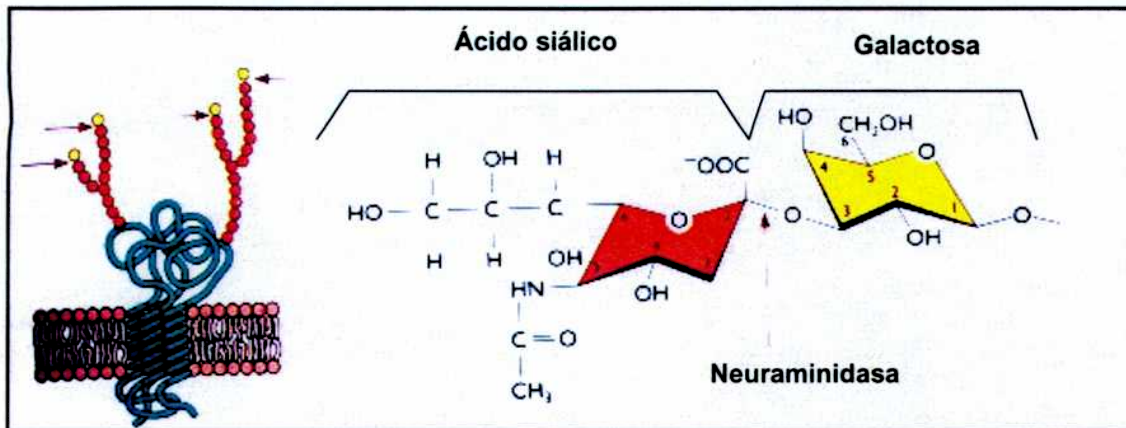
En la figura 4 se muestra el ciclo de replicación del virus influenza.

I)- Entrada del virus a la célula La fase inicial de la infección viral involucra varios pasos cuyo objetivo final es el traslado de las NC virales transcripcionalmente activas hacia el núcleo de las células infectadas para iniciar la expresión y replicación del genoma viral. En el paso de adsorción la glicoproteína más importante de estos virus, la HA de los virus A y B y la proteína HEF de los virus influenza C, se une al ácido siálico de los receptores glicoproteicos y glicolípidos ubicados sobre la superficie celular. La especificidad de pegado del receptor puede depender de la unión glicosídica entre el ácido siálico terminal y el penúltimo residuo de galactosa (ver figura 5). Por ejemplo, los virus tipo A humanos se unen preferentemente a residuos de ácido siálico unidos a galactosa por una unión  $\alpha$ 2-6 mientras que los virus aviares y los equinos se unen preferentemente a ácido siálico unidos por una unión  $\alpha$ 2-3. Seguido a la unión, el virus entra a la célula por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor. El pH ácido del endosoma (entre cinco y seis) activa el proceso que lleva al desnudamiento y entrada de la NC viral en el interior del citoplasma (ver figura 6) Esto gatilla un cambio estructural en la HA que induce la fusión entre la

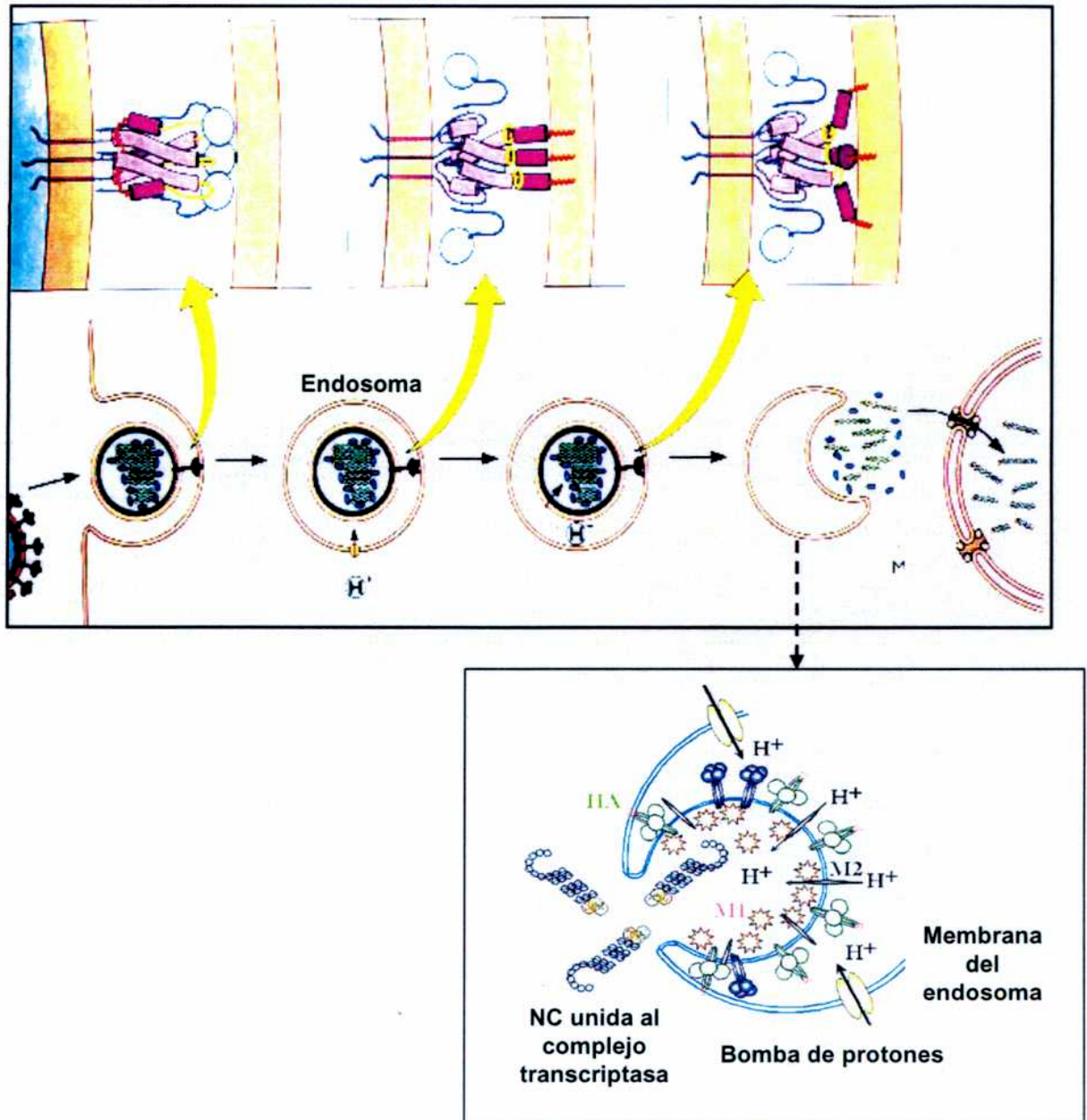


**Figura 4:** Diagrama esquemático del ciclo de vida del virus influenza. Etapa 1: entrada del virus a la célula, etapa 2: transcripción y replicación, etapa 3: regulación de la expresión de genes y etapa 4: transporte y ensamblaje de los componentes del virión.

Fields, Virology, Volumen 1, 4ª edición. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.



**Figura 5:** Receptor de ácido siálico para los virus influenza. El diagrama de la izquierda representa una glicoproteína transmembrana; las flechas señalan las unidades de ácido siálico a las cuales se unen los virus influenza. El diagrama de la derecha representa la estructura del ácido siálico terminal que es reconocida por la hemaglutinina viral.  
 Fields, Virology, Volumen 1, 4<sup>o</sup> edición. Lippincott Williams & Wilkins, 2 001.



**Figura 6:** Entrada del virus a la célula. El complejo virus-receptor es endocitado y la importación de los iones H<sup>+</sup> al endosoma acidifica su interior.  
 Fields, Virology, Volumen 1, 4<sup>o</sup> edición. Lippincott Williams & Wilkins, 2 001.

membrana del virus y la membrana del endosoma para liberar el “core” interno. Por otro lado, previo al evento de fusión, los  $H^+$  atraviesan el canal M2 para causar una disociación de la proteína M1 (matriz) de la NC viral, paso esencial para la posterior migración de las NC libres desde el citoplasma hacia el núcleo. La inhibición de estos eventos, tanto por incremento del pH del endosoma o bloqueando específicamente el canal M2 con la droga amantadina, previene la infección.

II)- Transcripción y replicación. La fase inicial de la transcripción (transcripción primaria) del genoma en ARN mensajeros (ARNm) es catalizada por la ARN polimerasa viral que se encuentra unida a las NC virales infectivas. El primer paso que tiene lugar es el corte de fragmentos de ARN con “cap” a partir del extremo 5' de ARN del núcleo celular. Estos fragmentos luego sirven como cebadores para la síntesis de los ARNm virales.

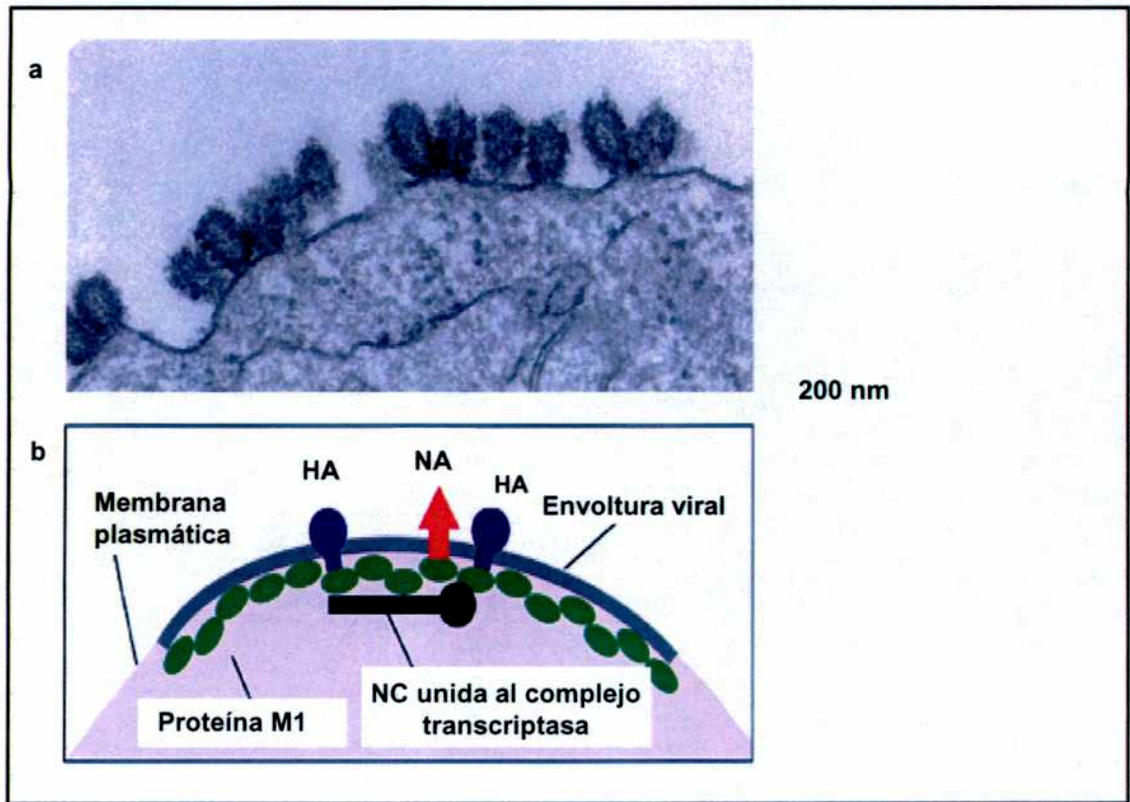
El complejo transcriptasa de los virus influenza A está compuesto de una polimerasa trimérica que comprende a las proteínas PB1, PB2 y PA, junto con la NP en asociación con el templado de ARN. Esta ARN polimerasa carece de actividad hasta que se une a la secuencia terminal 5' del ARN genómico. El pegado de la proteína PB1 a esta secuencia de ARN induce el pegado de la proteína PB2 al “cap” de los ARN celulares. Cuando la secuencia 3' terminal del ARN se une a un segundo aminoácido de la secuencia en la proteína PB1, la polimerasa adquiere la capacidad de cortar los ARN celulares con “cap” a una distancia de diez a trece nucleótidos a partir del “cap”. La ARN polimerasa puede entonces llevar a cabo la iniciación y elongación de los ARNm (12). La continua asociación de los extremos 5' de los templados de ARNv con la polimerasa parece ser la responsable de prevenir la elongación del transcripto hasta el final del templado; la transcripción termina en un tramo de 5 a 7 residuos de uridina ubicadas a 20 nucleótidos del extremo 5' y luego se agrega una cadena de poliA mediante la copia reiterada de una secuencia de oligo U. La síntesis de ARNm termina luego del agregado de 150 residuos de A al extremo 3' de estos ARNm. La polimerasa se une específicamente a una secuencia ubicada cerca de los extremos 5', inmediatamente después de la secuencia removida a partir de los ARN con “cap” de la célula huésped. Ese pegado bloquea el acceso de endonucleasas virales dependientes de “cap” a los ARNm virales. Los extremos 5' de los ARNm de

la célula huésped no están protegidos, por eso son cortados eficientemente por la endonucleasa viral.

III)- Regulación de la expresión de genes. La regulación de la expresión de los genes virales involucra la interacción de un conjunto de factores propios de la partícula viral y de la célula huésped y opera a varios niveles para permitir desde la síntesis selectiva de los ARNv hasta la regulación de la traducción de los ARNm. Se distinguen dos fases en la expresión de genes: temprana y tardía. La fase temprana le sigue a la transcripción primaria y representa el estado inicial de la replicación del ARNv y amplificación de la producción de ARNm. Esta se caracteriza por la síntesis preferencial de las proteínas NP y NS1 y es la consecuencia directa de la replicación selectiva de los moldes de ARNv a partir de los cuales se transcriben sus ARNm (13). Durante la fase tardía, se sintetizan los ARNv en cantidades equivalentes de acuerdo a lo requerido para constituir los genomas de la progenie viral y la transcripción preferencial de los ARNm está dirigida a la mayor producción de, por ejemplo, las proteínas HA y M1 y síntesis reducida de NS1.

IV)- Transporte y ensamble de los componentes del virión. El virus se ensambla en la membrana plasmática de las células infectadas mediante un proceso de brotación donde el “core” formado por el complejo M1-NC adquiere una envoltura derivada de las regiones de la membrana plasmática modificadas para contener casi exclusivamente proteínas de la membrana viral, como se observa en la figura 7.

Cada uno de los componentes del complejo replicación/transcripción, PB1, PB2, PA y NP, contiene una señal nucleofílica necesaria para el transporte a partir de su sitio de síntesis en el citoplasma hacia el núcleo donde se ensamblan para generar complejos funcionales y nucleocápsides destinadas a la formación ulterior de las partículas de la progenie viral. El complejo transcriptasa está asociado con el extremo terminal de los ARN virales unidos a la NP. Se desconoce en gran medida el mecanismo mediante el cual estas nucleocápsides son exportadas desde el núcleo. Aunque se demostró que la presencia de la proteína M1 en el núcleo es necesaria para la exportación de la NC asociada al complejo transcriptasa y la asociación de la M1 citoplasmática con las NC previenen el reingreso al mismo (14). La proteína NS2 que es incorporada en la partícula viral ha sido renombrada recientemente como “proteína de exportación nuclear”, ya que media la exportación de las nucleocápsides unidas al



**Figura 7:** a)- Ensamblaje y salida del virus influenza A, b)- Microscopía electrónica que muestra la brotación a partir de la membrana citoplasmática celular.  
Expert Reviews in Molecular Medicine 2001. Cambridge University Press.  
<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002496h.htm>



complejo transcriptasa actuando como un adaptador entre el complejo NC-M1 viral y núcleoporinas de la maquinaria de exportación nuclear.

Las proteínas integrales de membrana, HA, NA M2 y NB de los virus influenza A y B y las proteínas HEF y CM2 de los virus influenza C, se sintetizan en asociación con el retículo endoplásmico y se insertan en la membrana por un mecanismo dependiente de señal para el reconocimiento de la partícula. Durante el transporte a la superficie apical de las células epiteliales vía el aparato de Golgi, las proteínas se ensamblan para formar sus estructuras maduras multiméricas y se modifican posteriormente por la adición de cadenas que contienen carbohidratos y grupos acil lipídicos. La actividad de canal iónico de la proteína M2 no parece estar involucrada ya que la inhibición por amantadina no afecta directamente a este estado de la replicación (15). Sin embargo, se observó que: anticuerpos dirigidos hacia el extremo N-terminal del dominio externo de M2 reducen la producción de virus (16) y que, además cambios aminoacídicos tanto en el extremo C-terminal del dominio citoplasmático de M2 o M1 evitan el efecto de interacción con el anticuerpo (17), indicando que las interacciones entre M2 y M1 son importantes en el ensamblaje de la estructura viral así cómo interacciones indirectas estructura-función están involucradas en el desnudamiento durante la infección viral.

### **I.2.7- Variabilidad genética**

Una de las características más distintivas de los virus influenza es su alta tasa de variación antigénica. La alteración de su estructura antigénica conduce a la infección con variantes hacia las cuales la población puede tener resistencia baja o nula. La variación antigénica involucra principalmente a las dos glicoproteínas externas del virus, la HA y la NA, y esos *cambios antigénicos se denominan como deriva antigénica (drift) o cambio antigénico (shift)*, dependiendo de que la variación sea menor o mayor, respectivamente.

La deriva antigénica se refiere a cambios antigénicos menores que ocurren con frecuencia (cada año o cada dos años) en la HA del virus o en la NA o en ambas, dando origen así a variantes antigénicas diferentes dentro de cada tipo y subtipo viral. Este mecanismo se produce como consecuencia de mutaciones que ocasionan la acumulación gradual de cambios aminoacídicos en 1 o más de los 5 sitios antigénicos

mayores identificados en la molécula de HA (18). Debido a que los anticuerpos generados por exposición a cepas previas no neutralizan con eficiencia la variante antigénica, se produce una presión de selección serológica y la nueva variante reemplaza a la cepa previa convirtiéndose así en el virus predominante de la epidemia.

La comparación de las secuencias de los genes que codifican para la proteína HA de los virus influenza aislados demuestra diferencias en los patrones de evolución de las HA entre los virus influenza A, B y C. Por lo general, en humanos circula un único o pocos linajes de HA y la acumulación de mutaciones puntuales es lineal, de manera que cada cepa nueva reemplaza a la que circuló previamente. Sin embargo, de acuerdo a lo observado al comparar las secuencias de los genes HEF, en los virus influenza C co-circulan múltiples linajes. La evolución de los virus influenza B estaría entre estos dos últimos ejemplos, con pocos linajes de HA co-circulando aunque siempre más de uno (19).

La base molecular de la deriva antigénica ha sido determinada estudiando la secuencia de las proteínas y de los genes que codifican para la HA a partir de variantes naturales o de variantes antigénicas seleccionadas con anticuerpos monoclonales. El estudio más exhaustivo de este tipo de cambios se realizó con virus humanos pertenecientes al subtipo H3 (20, 21). Para ello, se secuenciaron y se compararon los genes que codifican para la HA de los virus aislados durante un período de diez años. Se observó una diferencia de 4,7% del total de nucleótidos de estos genes, resultando en una diferencia a nivel aminoacídico del 11%, lo cual representa un promedio de cambio de la proteína de un 1% anual. También se encontró, que la mayoría de estos cambios estaban concentrados en determinadas posiciones de la molécula, lo cual sugiere la presencia de regiones hipervariables en la proteína. De acuerdo a la posición de estos cambios, se pueden definir cinco sitios antigénicos (22). Un análisis similar de las HAs de los virus influenza A subtipo H1 e influenza B también demostró la presencia de sitios hipervariables en o cerca de la porción globular de la molécula (23). A pesar del alto grado de variabilidad observado en la molécula de la HA, existen regiones tanto en la porción HA<sub>1</sub> como en la porción HA<sub>2</sub> que son altamente conservadas. Dichas áreas se ubicarían en zonas de la molécula que son inaccesibles para la selección de anticuerpos o secuencias involucradas con la estructura y/o función de la HA.

Por otro lado, los cambios antigénicos mayores o “shift” antigénicos son cambios más abruptos que se producen en las proteínas de superficie de los virus influenza A. Estas modificaciones se generan como resultado del reemplazo de por lo menos el gen de la HA y/o el de la NA por otro proveniente de un virus influenza animal (por ejemplo: de las aves). Debido a que la población tiene poca o ninguna inmunidad frente a estas nuevas cepas, las mismas generan pandemias que se asocian con alta morbilidad y mortalidad. En el siglo XX, tres subtipos diferentes de virus influenza A fueron los responsables de causar pandemias en la población humana.

Los virus H1N1 (de origen aviar) aparecieron probablemente en el año 1918 y fueron los causantes de aproximadamente 20 millones de muertes en todo el mundo durante ese año (24). Estos virus continuaron circulando hasta 1957, momento en el que fueron reemplazados por los virus subtipo H2N2 (asiáticos). Las proteínas de estas cepas, HA y NA, fueron serológicamente diferentes a las de los virus subtipo H1N1. Los virus H2N2 fueron prevalentes hasta 1968, cuando otro cambio antigénico ocurrió con la introducción de las cepas H3N2 (Hong Kong), las cuales continuaron circulando hasta la fecha. En este caso sólo cambió la HA, la NA no sufrió modificaciones. La información recolectada hasta el momento sugiere que, con excepción de las cepas H1N1, el resto de las cepas pandémicas de este siglo se originaron a partir de la recombinación (reasociación) de genes provenientes de distintas cepas. Estudios basados en la secuenciación de los genes que codifican para las proteínas H1, H2 y H3 demostraron que es poco probable que estas moléculas se hayan originado una a partir de otra a través de la acumulación gradual de mutaciones puntuales; sin embargo, es posible que deriven de un progenitor común y de que compartan una estructura básica (25, 26). Todos ellos poseen un péptido simple hidrofóbico conservado, el sitio de corte ubicado entre las subunidades HA<sub>1</sub> y HA<sub>2</sub> y un dominio carboxi-terminal capaz de anclarse a la membrana. Sin embargo, las proteínas H1 y H2 poseen una diferencia del 58% en la composición aminoacídica de sus HA<sub>1</sub> mientras que, las proteínas H2 y H3 difieren en un 36% de sus aminoácidos en la misma región. Estas diferencias son bastante mayores a las que podrían atribuirse por deriva antigénica ocurrida durante un período de transición de 1 año.

Estudios de hibridación han demostrado que los virus humanos H2N2 poseen 4 genes (fragmentos de ARN número uno, cinco, siete y ocho) que proceden de una cepa humana H1N1 y los cuatro genes restantes, incluyendo aquellos que codifican

para la HA y NA, provienen de un virus H2N2 aviar (27). Una comparación similar de los genes a partir de los virus H2N2 y H3N2 mostró que los virus H3N2 surgieron luego de la recombinación de un virus aviar, el cual aportó el gen que codifica para la HA y el resto de los fragmentos de un virus H2N2 humano (28).

Estudios serológicos con sueros de personas adultas recolectados antes de la pandemia causada por los subtipos H3N2 en 1968 revelaron la presencia de anticuerpos dirigidos contra las cepas H3, sugiriendo que estos virus habían circulado previamente (29). A su vez, se detectaron anticuerpos que reaccionan con las cepas H2 en los sueros de personas nacidas antes de 1887 (30) Esta información sugiere que quizás recirculen un número limitado de hemaglutininas en virus capaces de infectar a la población humana.

### **I.2.8- Cuadro clínico**

La infección por influenza, en comparación con otras infecciones de las vías respiratorias como por ejemplo el resfrío común, es mucho más severa. A menudo, el comienzo de los síntomas es súbito y los mismos no están confinados a las vías respiratorias. Habitualmente, el paciente padece primero cefaleas, escalofríos y tos seca. Rápidamente, estos síntomas son seguidos por fiebre que habitualmente oscila entre los 38° C y los 40° C, pero puede elevarse hasta 41° C, especialmente en los niños. Los niños son propensos también a los síntomas gastrointestinales tales como vómitos y dolor abdominal (31). Se producen dolores corporales intensos, especialmente en las piernas, brazos y espalda. Estos síntomas sistémicos importantes permiten diferenciar a la infección causada por influenza de un resfrío común. Habitualmente la fiebre dura alrededor de tres días y en el momento que ésta declina, los síntomas respiratorios tales como el goteo nasal, los estornudos y la tos se hacen más prominentes debido a que, a medida que el virus multiplica, la capa de revestimiento de las vías respiratorias se torna más inflamada. Los síntomas respiratorios agudos duran entre cinco y siete días, pero la tos y la debilidad pueden persistir hasta dos semanas.

La infección causada por el virus influenza es moderadamente severa en los adultos sanos y en los niños, si bien la mayoría se recupera luego de una a dos semanas sin efectos aparentes de la enfermedad. Sin embargo, la gripe puede tener un

impacto grave en la gente con problemas de salud subyacentes y también en los ancianos y en estos grupos de personas es más probable que se requiera la internación hospitalaria. Dado que el virus influenza replica en las vías aéreas superiores e inferiores, la inflamación que produce en las mucosas respiratorias predispone a la infección secundaria por bacterias (32). Aproximadamente en el 12% de los niños (33) se produce otitis media, siendo el “croup” una complicación común en esta población de pacientes. La neumonía puede estar causada por el virus influenza en sí mismo, pero como las defensas naturales del organismo se han debilitado por la infección, también se puede producir por infecciones bacterianas secundarias. La neumonía es especialmente común en los niños y ancianos y tiene una tasa de mortalidad del 7 al 42%, dependiendo del organismo infectante (34). Las complicaciones menos comunes incluyen el síndrome de Reyé, el síndrome de Guillain-Barré, la encefalopatía, la miopatía y la miocarditis (35, 36).

#### **I.2.9- Patogénesis**

*Patogénesis celular.* La infección por virus influenza se adquiere por la transferencia de secreciones respiratorias conteniendo virus a una persona susceptible a partir de una persona infectada (37). Una serie de estudios indican que la dispersión del virus en partículas de aerosol pequeñas es el factor predominante en la transmisión persona a persona. Es probable que las partículas virales respiradas por la nariz o la boca se depositen e inicien la infección en las vías respiratorias si no son previamente neutralizadas por la acción de anticuerpos secretorios específicos (inmunoglobulina A), por mucoproteínas no específicas a las cuales quizás el virus se una o por acciones mecánicas del aparato mucociliar. Sin embargo, los virus influenza también pueden entrar en el organismo a través de las membranas mucosas de los ojos, de la nariz o de la boca. Por su parte, la célula huésped sufre un dramático paro de su síntesis proteica, el cual ocurre a varios niveles. La pérdida de proteínas celulares críticas contribuye probablemente a la muerte celular.

Además de los efectos que llevan a la necrosis, existen evidencias de que la infección celular por virus influenza A y B causa muerte celular por apoptosis (38). El mecanismo específico por el cual el virus influenza induce apoptosis se desconoce pero se cree que estaría relacionado con la inducción del antígeno Fas mediado por

ARN doble cadena durante la replicación viral (39). Sin embargo, la liberación de virus continúa durante varias horas antes de que se produzca la muerte celular. El virus libre tiene la capacidad de iniciar una nueva infección en células adyacentes o cercanas; por lo tanto, luego de pocos ciclos de replicación, un gran número de células en el tracto respiratorio liberan virus y luego mueren por causa de la replicación viral. La duración del período de incubación hasta el establecimiento de la enfermedad y la liberación de virus oscila entre las 18 y las 72 hs., dependiendo en parte del tamaño del inóculo (37, 40).

Infeción en el hombre. La presencia de virus es detectada por primera vez inmediatamente antes del establecimiento de la enfermedad (dentro de las 24 hs.), aumenta rápidamente hasta llegar a un máximo de 3 a 7 log<sub>10</sub> DICT<sub>50</sub>/ml, se mantiene elevada durante 24-48 hs. y luego decrece rápidamente a títulos bajos (37). En general, los virus influenza no son detectados luego de cinco a diez días de la liberación de virus. En niños pequeños y en pacientes inmunocomprometidos, la liberación de altos títulos de virus es más prolongada (41).

Estudios llevados a cabo en voluntarios infectados experimentalmente con influenza demostraron que la severidad de la enfermedad se correlaciona temporalmente con la cantidad de virus liberado; esto sugiere que el mecanismo más importante en la producción de la enfermedad es la muerte celular resultante de la replicación viral (37). La ocurrencia de enfermedad sistémica y fiebre sugiere la diseminación del virus mediada por el sistema sanguíneo, a pesar de que el virus infeccioso se ha detectado escasamente en sangre (42).

### **I.2.10- Diagnóstico**

Existe un número de diferentes pruebas de laboratorio disponibles para llevar a cabo el diagnóstico del virus influenza. Algunas sirven para detectar la presencia de antígenos virales, ácido nucleico viral, células infectadas o partículas virales infecciosas en secreciones respiratorias (métodos directos). Otras consisten en pruebas serológicas basadas en la detección de la respuesta inmunológica del huésped frente a la infección (métodos indirectos). La elección del método de diagnóstico a aplicar depende del tipo de información requerida. El uso de las técnicas de diagnóstico rápido como ser la detección de antígeno o inmunofluorescencia directa (IFD) es

mucho más apropiado en consultorios de atención primaria e instalaciones hospitalarias, donde la rapidez del diagnóstico es de suma importancia para decidir cuál será el tratamiento antiviral más adecuado que permita el control de la infección; mientras que la información antigénica no resulta ser relevante a tales fines. En estos casos, la sensibilidad y especificidad de las técnicas a utilizar debe ser alta para evitar reacciones negativas falsas.

El diagnóstico de laboratorio es el primer paso en el flujo de información que culmina con la reunión anual de la OMS donde se decide cuál será la fórmula vacunal más apropiada para utilizar el año próximo. Debido a esto, el Servicio de Virosis Respiratorias del Instituto Malbrán, desde 1996 encabeza la organización de una Red Nacional de Laboratorios distribuidos prácticamente en todo el país, que actualmente cuenta con veinticinco integrantes y que continúa creciendo año tras año. Estos laboratorios llevan a cabo la detección de virus respiratorios (VRS, adenovirus, influenza y parainfluenza) a partir de secreciones respiratorias y remiten al Centro Nacional de Referencia aquellas muestras con diagnóstico positivo para el virus influenza para continuar con el estudio de la misma. Dichos centros requieren de una batería de pruebas que permiten la caracterización antigénica detallada de los aislamientos crecidos tanto en huevos embrionados como en cultivos celulares. La caracterización de las cepas de virus influenza circulantes provee información acerca de las variantes epidémicas para asegurarse así la mayor coincidencia entre las cepas circulantes y vacunales.

El éxito del diagnóstico virológico depende en gran medida de la calidad de la muestra, de las condiciones del envío y del almacenamiento de la muestra antes de procesarla en el laboratorio.

**Tipo de espécimen clínico.** En los mamíferos, los virus influenza replican primero en las células epiteliales columnares del tracto respiratorio. Por lo tanto, el aspirado nasofaríngeo (ANF) es la muestra clínica de elección para la detección de antígeno y aislamiento debido a que contiene un gran número de células epiteliales infectadas (43). También se pueden utilizar hisopados nasales (HN), hisopados faríngeos (HF), hisopados nasales y faríngeos combinados (HNF) y otras.

**Transporte y conservación.** La infectividad de los virus envueltos en general es poco estable a temperatura ambiente, sin embargo el virus de influenza posee una

estabilidad moderada al compararla con otros patógenos virales respiratorios como ser el VRS. Las muestras tomadas para el aislamiento viral deberán refrigerarse inmediatamente después de su obtención (pero no congelar) y deberán inocularse lo antes posible en células de cultivo o en huevos embrionados. De no poder inocularse en las primeras 72 hs. es conveniente congelarlas a  $-70^{\circ}$  C. El transporte de las muestras se deberá llevar a cabo en un medio adecuado para virus, entre ellos se incluyen: solución salina de Hanks, medio de cultivo para células, caldo triptosa fosfato, etc. El medio de transporte elegido deberá contener proteínas para estabilizar las partículas virales como ser: albúmina de suero bovino, gelatina o glicerol a una concentración final de 1%. No es conveniente utilizar suero fetal como fuente de proteína. El agregado de antibióticos y antimicóticos a una concentración final de 1% ayuda a prevenir contaminaciones bacterianas y no afecta al aislamiento.

**Métodos directos:** *Aislamiento viral.* La técnica de referencia para el diagnóstico de laboratorio es el aislamiento del virus influenza. Estos virus son capaces de replicar en una variedad de cultivos celulares primarios, diploides y continuos, a pesar de que la mayoría de las líneas celulares presentan baja susceptibilidad a la infección por virus influenza (44).

Los cultivos primarios de riñón de mono (PMK) son muy usados en los laboratorios de diagnóstico para el aislamiento de virus influenza humanos A y B; a pesar de que existen algunos problemas asociados con la disponibilidad y el uso de estas células. Las células epiteliales mamíferas proveen del sistema más sensible de cultivos celulares para la propagación *in vitro* del mayor número de cepas de virus influenza A, B y C descritas hasta el momento. Por ejemplo, las células de riñón de mono verde africano (VERO) son totalmente susceptibles para los virus influenza A y B (45). Las de mayor uso son las células de riñón de perro Madin-Darby (MDCK), una línea celular continua polarizada. Para la propagación de virus influenza en esta línea celular, el medio nutritivo debe contener tripsina debido a que se requiere del agregado de una enzima proteolítica externa para que se produzca el corte post-traducción de la glicoproteína HA, necesario para la replicación viral. La presencia de virus es detectada mediante la observación de efecto citopático (ECP) y el mismo debe ser confirmado mediante otras técnicas como ser hemoadsorción, hemaglutinación y/o inmunomarcación. Estas técnicas de cultivo celular son utilizadas por la mayoría de los laboratorios de diagnóstico y Centros de Referencia



Nacionales. El uso de huevos embrionados para el aislamiento viral es menos común que el de los cultivos celulares, sin embargo se sigue utilizando en laboratorios de referencia y es el método de elección para llevar a cabo el diagnóstico de cepas aviarias. La producción de virus a partir de la inoculación de aislamientos de influenza en la cavidad alantoidea del huevo es mayor al compararla con monocapas de células susceptibles (incluyendo a las células MDCK) si se calcula por unidad de volumen (por ejemplo, unidades formadoras de placa o unidades hemaglutinantes), pero equivalente si se calcula tomando como base cada célula. En parte, debido a esta razón, las vacunas de virus influenza continúan siendo producidas a partir de virus cultivados en huevos. La centrifugación de las muestras clínicas directamente sobre las células crecidas en viales pequeños y posterior detección de la producción de antígeno viral mediante la técnica de inmunofluorescencia (IF) o ELISA puede llevar el tiempo necesario para determinar la presencia de virus a uno o dos días.

*Detección de antígenos virales.* Los antígenos pueden detectarse directamente en las células descamadas nasales o nasofaríngeas por ELISA o por IF. En el último caso, las células obtenidas en las muestras clínicas respiratorias son lavadas varias veces con un tampón de fosfatos pH 7,2, resuspendidas y colocadas sobre portaobjetos para poder observarlas al microscopio. Después de fijar las células con acetona, se enfrenta el preparado con anticuerpos específicos disponibles en el comercio. En general, se usan anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas del virus influenza que se expresan en abundancia y que son más conservadas que las glicoproteínas virales (ej: NP o M1). La sensibilidad de las técnicas de IFD e indirecta (IFI) sería aproximadamente la misma, aunque, teóricamente, la IFI debería permitir una amplificación de la señal. Al comparar con el aislamiento de virus influenza, la IF posee una sensibilidad de 50-90%, dependiendo del tipo de muestra y del reactivo utilizados.

Con respecto a las técnicas de ELISA, la más rápida es capaz de dar un resultado en menos de 1 hora, con una sensibilidad y especificidad comparable a la que se obtiene con los cultivos celulares, trabajando en condiciones óptimas. Entre los equipos comerciales se encuentran el filtro inmunoensayo (Directigen flu A) (46) y ensayo de microtitulación en placa (Enzygnost A y B) (47) entre otros.

Además de las técnicas de IF y ELISA, en los últimos años se han descrito distintas técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), que permiten la detección rápida del ARN viral a partir de muestras clínicas (48).

**Métodos indirectos.** Las pruebas serológicas que comparan el suero de la fase aguda con el suero de la fase convalescente del paciente, si bien no son útiles cuando se requiere de información rápida para tomar decisiones clínicas, sirven cuando otros procedimientos fallan o para documentar casos en los que la sospecha clínica ha sido tardía. Para el diagnóstico serológico, se utilizan en general las técnicas de inhibición de la hemaglutinación (IHA) y fijación de complemento (FC). Para ello, deben ser remitidas al laboratorio muestras de sueros pareados, las cuales consisten en un suero de la fase aguda y un suero de la fase convalescente obtenido diez a veinte días luego de la toma del primer suero. El aumento de dos diluciones en el título obtenido es considerado de valor diagnóstico para la infección (49). La técnica de FC permite el diagnóstico de tipo (A y B) y adolece de adecuada sensibilidad sobre todo para las seroconversiones. En cambio, la técnica de IHA es subtipo específica y no se utiliza habitualmente en el diagnóstico hospitalario sin embargo es muy útil en estudios seroepidemiológicos y de respuesta a la vacunación.

Se han desarrollado otras técnicas de ELISA más sensibles que la FC, basadas en el antígeno de NP y otros antígenos internos tipo específicos que permiten detectar la producción de IgM e IgA específicas frente a virus A y B.

La reacción de neutralización (RN) y la inmunodifusión radial tienen un empleo más restringido. Esta última se usa más como método directo semicuantitativo de estandarización de la concentración de HA de las vacunas.

**Diagnóstico epidemiológico.** El diagnóstico puede llevarse a cabo también en base a fundamentos epidemiológicos. Esto significa que, cuando la presencia de virus influenza es confirmada en una región o comunidad por el departamento de salud local, las personas que padecen fiebre, mialgias, y tos probablemente estén infectados con influenza. Es más, varios estudios han demostrado que la precisión del diagnóstico clínico para establecer que una epidemia se debe a influenza alcanza un 85% (50). Sin embargo, este no sería el caso en establecimientos institucionales, en las cuales la infección por VRS se puede confundir con influenza (51).

### **I.2.11- Situación epidemiológica**

Los virus influenza ocupan un nivel de importancia dentro de las enfermedades respiratorias a nivel mundial debido a que representan un problema médico, epidemiológico y económico sustancial. Los brotes causados por este virus se traducen en millones de días de trabajo perdidos, cientos de miles de internaciones hospitalarias, decenas de miles de muertes y millones de pesos en costo de atención de la salud.

La epidemiología de los virus influenza humanos refleja las características peculiares del genoma viral (ARN simple cadena segmentado) y la diversidad de su rango de huésped. Dos tipos diferentes, llamados virus influenza A y B, son los responsables de las epidemias anuales recurrentes. Como vimos antes estos dos tipos se distinguen antigénicamente y no presentan inmunidad cruzada como tampoco se observa recombinación genética intertípica entre ellos. Estos virus co-circulan y pueden predominar en una temporada de influenza particular, ya que a una incidencia incrementada de influenza B frecuentemente le sigue un máximo de actividad de influenza A o a la inversa. Mientras que los virus influenza B sólo infectan a los humanos y a algunos animales marinos, los virus influenza A son esencialmente aviares que periódicamente se transmiten a otras especies, incluyendo mamíferos. Por otro lado, los virus influenza A comprenden una amplia variedad de subtipos antigénicos distintos, con diferentes combinaciones de los 15 subtipos de HA y 9 de NA, que replican en forma asintomática en el intestino de las aves acuáticas, particularmente patos, las cuales constituyen un amplio reservorio de virus potencialmente pandémicos (52). Se sabe que sólo algunos subtipos se han establecido en la población humana, tres de ellos desde 1933. Si embargo, en los últimos años se han detectado casos esporádicos de introducción de virus aviares directamente en la población humana, como las infecciones recientes causadas por virus influenza A subtipos H5N1 y H9N2 ocurridos en Hong Kong en 1997 y China en 1999 respectivamente (53, 54). En 1999 no se registraron casos fatales mientras que en 1997 el número de personas afectadas logró limitarse a un grupo reducido (6 de 18 personas infectadas fallecieron) luego del sacrificio de las aves de corral provenientes de criaderos que abastecían un mercado local de aves vivas que probablemente haya sido la fuente de infección.

La característica sobresaliente de los virus influenza es su capacidad de rápida evolución y los resultantes cambios antigénicos en las glicoproteínas de superficie de los virus humanos circulantes permiten a los virus influenza A causar epidemias anuales y las consecuencias médicas pueden ser serias, particularmente para los niños más pequeños y los ancianos. Con menor frecuencia, se incorporan HA y NA provenientes de virus animales lo que da origen a cepas con nuevas glicoproteínas de superficie contra las cuales la población no tiene anticuerpos. Esta variación es el origen de las pandemias.

Debido a que todos los subtipos de virus influenza A se encuentran en reservorios de aves acuáticas y silvestres, se hace imposible su erradicación. Por ello la prevención y control son las únicas metas realistas. Por lo tanto, si los humanos, los cerdos y las aves acuáticas son los principales vectores asociados en la transferencia interespecies de este virus y en la aparición de nuevas pandemias, la vigilancia del virus influenza es considerada de gran importancia en estas especies. En la mayoría de los países del mundo la gripe tiene un comportamiento estacional, con un predominio de su actividad durante los meses de invierno. En los países tropicales, existe una actividad endémica del virus influenza, con un incremento durante las estaciones lluviosas (55, 56, 57). Se desconoce dónde y cómo el virus influenza A persiste entre brote y brote. Se estima que se mantendría sobre la base de la transmisión persona a persona en grupos de poblaciones con un bajo nivel de transmisión interepidémica. Alternativamente cepas humanas pueden persistir en reservorios animales.

Algunas características epidemiológicas importantes de los virus influenza A son las siguientes (55):

- Las cepas circulantes sufren cambios antigénicos menores (*drift*)
- También sufren cambios antigénicos mayores (*shift*).
- Presentan estacionalidad
- Aparición de nuevas cepas/subtipos y desaparición de los viejos.
- Baja tasa de transmisión fuera de temporada.
- Comienzo abrupto de las epidemias.
- Culminación rápida de las epidemias a pesar de la abundancia de personas susceptibles que no se infectan.
- Distribución mundial, en habitantes de todas las latitudes y longitudes, en todos los climas, de acuerdo a información recolectada a lo largo de la historia.

El virus influenza B generalmente causa brotes menos severos y extensos que el virus influenza A. Estos brotes ocurren en poblaciones escolares y militares y con menor frecuencia entre ancianos. La principal complicación es el Síndrome de Reyé. Por su parte, el virus influenza C ha sido asociado con enfermedad en el ser humano en contadas oportunidades, aunque se presume que, por la alta prevalencia de anticuerpos en la población, la incidencia de infección asintomática es bastante común.

Las características epidemiológicas de los virus influenza A y B parecen ser similares; ambos causarían exceso de morbilidad y mortalidad (58, 59), sin embargo, los virus influenza B no son capaces de producir pandemias debido a que presentan mayor estabilidad antigénica. Las epidemias de la comunidad causadas por influenza B presentan tasas de ataque que en general son menores a las que causan los virus influenza A. Sin embargo, los brotes de influenza B en una población cerrada tienden a producir mayores tasas de ataque en los adultos (hasta un 80%), las cuales son comparables con aquellas producidas por influenza A (60, 61). Influenza B también produce tasas de ataque considerablemente altas entre los niños en comparación con los adultos (62).

En los Estados Unidos, Europa y Japón, durante el invierno, la infección por influenza se disemina con rapidez a través de la población, infectando a un estimado de 100 millones de personas. Habitualmente, los brotes de influenza son de corta duración (varias semanas) y varían anualmente en intensidad y entre los diferentes tipos de virus. En un año promedio, 1 de cada 10 adultos se enferma de influenza, pero las tasas de ataque anual informadas a partir de los datos clínicos excede el 30% en la población pediátrica. La morbilidad se concentra en niños en edad escolar y en adultos sanos, pero las tasas de mortalidad más elevadas se producen en individuos mayores de 65 años de edad, produciéndose 10 000 a 40 000 muertes relacionadas con influenza durante la estación invernal en los Estados Unidos solamente (63). Es también trascendente la morbi-mortalidad por el virus especialmente en grupos de alto riesgo como los enfermos pulmonares crónicos y cardiopatas; el riesgo también es alto en los inmunodeprimidos y en aquellos pacientes con enfermedades renales y/o metabólicas. La infección con el virus influenza produce 25 millones de consultas al médico cada año, millones de días de trabajo perdidos y cientos de miles de

internaciones hospitalarias (64). La carga económica anual asociada con influenza constituye un costo social enorme, estimado en 12 billones de dólares por año en los Estados Unidos solamente (65).

Las pandemias por el virus influenza se producen de manera impredecible aproximadamente cada 10 a 40 años y afectan hasta el 50% de la comunidad. El brote reciente de la nueva cepa de influenza subtipo H5N1 en Hong Kong ilustra la amenaza continua de una nueva pandemia.

La información que se obtiene a partir de las actividades de vigilancia regional e internacional integradas ayudan a controlar y diagnosticar la actividad de influenza. Las pruebas diagnósticas rápidas respaldan las actividades de control y pueden ser especialmente útiles como herramienta diagnóstica fuera de un brote de influenza.

#### **I.2.12- Reservorios**

Los reservorios naturales de los virus influenza A son los patos y las aves acuáticas del mundo (66, 67). Los virus influenza B son patógenos humanos cuyos posibles reservorios naturales se desconocen; sin embargo, recientemente se han aislado también a partir de focas (68). Por su parte, los virus influenza C han sido aislados a partir de humanos y de cerdos.

Los virus influenza A han sido aislados a partir de criaderos de patos en Rusia (69), China (70, 71), Japón (72), Europa (73, 74), América del Norte (75) y Australia (76). Tanto las aves acuáticas como las aves domésticas están infectadas y la información disponible demuestra que diferentes especies de patos son susceptibles. Todavía no se conoce con exactitud la totalidad de las especies de aves acuáticas que pueden actuar como reservorios de los virus influenza, aunque quizás sea posible incluir todos los órdenes de aves acuáticas. Todos los miembros de los órdenes *Procellariiformes* (petreles y albatros), *Pelecaniformes* (cormoranes), *Anseriformes* (cisnes, gansos, patos), *Galliformes* (pavos, codornices), *Ciconiiformes* (garzas, ibis), *Gruiformes* (aramides, gallaretas) y *Charadriiformes* (gaviotas, gaviotines contienen familias a partir de las cuales los virus influenza fueron aislados. Los virus influenza también han sido aislados irregularmente a partir de un número limitado de *Passeriformes* (mirlos), pero no han sido encontrados en *Columbiformes* (palomas), *Psittaciformes* (loros) u otros órdenes de aves.

En los patos salvajes, los virus influenza colonizan las células intestinales, sin causar enfermedad, excretándose en altas concentraciones por las heces (hasta  $10^{8.7}$  DI50% en huevo/gr) (77). Han sido aislados en lagos, lo que indica que las aves acuáticas tienen una manera muy eficiente de transmitir virus contaminando las fuentes humanas de agua. Debido a que una gran cantidad de patos jóvenes susceptibles emigran por el mundo, muchos pájaros son infectados por la presencia del virus en el agua.

La amplia vigilancia llevada a cabo en humanos y animales ha revelado un único subtipo adicional de virus influenza A en los últimos 10 años, la H15 (78) sugiriendo así que quizás exista un número finito de distintos virus influenza A en la naturaleza. Cada subtipo de HA de los virus influenza A se pueden encontrar en las aves, tres subtipos en humanos (H1, H2 y H3), dos en cerdos (H1 y H3) y dos en caballos (H3 y H7). Además, se han registrado infecciones esporádicas en mamíferos marinos (focas, ballenas) perros, gatos, bóvidos y monos; así como casos en murciélagos, visones y renos probablemente al entrar en el ciclo ecológico de las aves salvajes.

Entre los quince subtipos de virus influenza A, sólo dos de ellos (H5 y H7) tienen la capacidad potencial de convertirse en subtipos altamente patogénicos en especies aviarias domésticas incluyendo pollos y pavos. La adquisición de la virulencia está asociada con mutaciones e inserciones de aminoácidos básicos en el sitio de corte de la HA (79, 80). La naturaleza avirulenta de la infección aviar se presume que es el resultado de la adaptación del virus durante muchos siglos, asegurando su perpetuación. El análisis filogenético basado en los cambios aminoacídicos muestra que los virus aviarios, tienen un perfil evolutivo bajo, es decir una fase estacionaria sin evidencia de evolución neta en los últimos 60 años.

Los estudios en la NP y otros anclajes genéticos en especies aviarias muestran subtipos diferentes de la gripe en Eurasia y las Américas, indicando que los pájaros migratorios que se mueven entre estos continentes tienen poco o ningún papel en la transmisión de la enfermedad, mientras que los pájaros que migran de norte a sur y viceversa, parecen desempeñar un papel dominante en el proceso de continuación de la evolución viral.

Los virus humanos y de cerdos tienen " un lazo genético de hermandad" que muestra que se desarrollaron a partir de un origen común. El antepasado del virus humano y el de los cerdos parece haber sido un virus aviar intacto (81, 82, 83).

Desde el reservorio animal principal en las aves acuáticas se producen transmisiones esporádicas a huéspedes intermediarios, animales salvajes o domésticos (cerdos, caballos, aves de corral) (84) en los que a veces pueden ocurrir infecciones dobles que darán lugar a recombinaciones genéticas. El virus en estos huéspedes sufre de forma rápida y progresiva una serie de mutaciones acumulativas tanto en los genes de los antígenos superficiales como internos, que adaptan mejor al virus para multiplicarse en huéspedes mamíferos. Entre los mamíferos, el ganado porcino ocupa un lugar destacado por la posibilidad de infecciones persistentes por determinados subtipos y por constituir en ocasiones el vaso o probeta de mezclado de recombinación genética que ayuda a franquear la barrera de especie hasta la infección en humanos ya que el cerdo es susceptible a la infección por cepas humanas y aviares (85). De esta manera, se puede generar un virus que posee proteínas de superficie contra las cuales no existen anticuerpos neutralizantes en la población humana. Este nuevo virus puede entonces diseminarse fácilmente, con el potencial de causar pandemias a nivel mundial. Esto ocurrió en 1957 y 1968. En 1957, los genes que codifican para las proteínas HA, NA y PB1 fueron reemplazados por los mismos genes de origen aviar. En 1968, el gen de la HA y probablemente el de PB1, fueron nuevamente reemplazados por genes de origen aviar (86). Para que ocurra un reordenamiento genético y un cambio antigénico, un huésped debe estar infectado simultáneamente por un virus aviar y un virus humano. Debido a que los virus influenza aviares no se diseminan en la población humana, es poco probable que las reasociaciones genéticas ocurran directamente en los humanos. Los cerdos, sin embargo, son los únicos susceptibles a la infección tanto por los virus aviares como por los virus humanos y han sido designados como huéspedes intermediarios para las reasociaciones genéticas (85, 87). Dado este potencial, la realidad de que los cerdos vivan tan cercanamente a los granjeros en el sudeste asiático, a veces inclusive compartiendo las mismas casas y fuentes de agua, quizás explique por qué las pandemias ocurridas recientemente se originaron en esta parte del mundo. Además, los cerdos y los patos se encuentran en contacto directo en los campos donde se cultiva el arroz. Dicho hecho, sumado a la práctica especial de pesca de granja en



Asia, podrían favorecer al contacto entre distintas especies y la posibilidad de una infección mixta en cerdos (85, 88, 89). Además de la posibilidad de utilizar un huésped intermediario, los virus influenza A pueden pasar directamente desde las aves al hombre quien sufrirá la infección viral por un nuevo tipo de virus. Esto ocurrirá como un caso esporádico o como un brote de transmisión interespecie si hay varios casos en un corto espacio de tiempo como sucedió en el brote de gripe A/Hong Kong/156/97 (H5N1). En esa ocasión, 18 personas resultaron infectadas como consecuencia de la transmisión de un virus de origen aviar a la población humana. El primer caso se registró en un niño de tres años de edad en mayo de 1997 en Hong Kong, quien falleció unos días después de su admisión hospitalaria. Precedentemente en la ciudad ocurrió un brote de influenza en pollos del cual se aisló una cepa influenza A (H5N1) (A/Chicken/Hong Kong/97), que presentó una letalidad del 100%. El análisis retrospectivo de los casos humanos mostró que las edades de los pacientes estuvieron entre 1 y 60 años, con mayor frecuencia en adultos jóvenes. La letalidad registrada en la población humana fue del 30% (90). Si el nuevo subtipo fuera capaz de transmitirse de persona a persona (transmisión humana) tendríamos una cepa con potencial pandémico introducida en humanos (salto de especie). Por otro lado, en marzo de 1999, se aislaron virus influenza subtipo H9N2 a partir de aspirados nasofaríngeos provenientes de dos niños de cuatro y trece años de edad hospitalizados en Hong Kong que presentaban un cuadro febril leve. Previo a este episodio, se sabía que los virus influenza subtipo H9N2 circulaban entre pollos y otras especies animales de los mercados de aves vivas. Sin embargo, las infecciones de los pollos con los virus H9N2 no estaban asociadas con una morbi-mortalidad severa como se había observado con los pollos infectados con la cepa H5N1. Desde su aparición, se informaron en China un total de siete casos en humanos de infección por H9N2 y al igual que en 1997, las infecciones humanas ocurridas en 1999 quizás se hayan transmitido directamente desde las aves hacia los humanos, pero la enfermedad asociada a las infecciones por H9N2 fue más leve.

La transmisión interespecies de los virus influenza A es un hecho comprobado, pero la adaptación al huésped es un escalón decisivo para continuar la difusión intraespecie de los virus que hacen el salto de especie.

### **I.2.13- Prevención y Control**

La profilaxis de exposición a la gripe es poco eficaz. Como en todas las infecciones víricas de transmisión aérea directa resulta muy difícil evitar el contagio y la difusión de la infección. El tratamiento de la gripe es principalmente sintomático: disminuir la fiebre, adecuado reposo, alimentación e hidratación. Es conveniente emplear acetaminofeno (paracetamol) en vez de salicilatos, por la asociación de éstos con el síndrome de Reyé. Es preferible no administrar antitusivos; para la congestión nasal, la fenilefrina u oxymetazolina son apropiadas. El uso de antibióticos está recomendado únicamente para prevenir infecciones bacterianas secundarias en pacientes de alto riesgo. En este sentido los métodos rápidos de diagnóstico de influenza han demostrado tener un impacto positivo en el uso de antibióticos ya que permiten discernir en forma precoz si el cuadro clínico corresponde a esta enfermedad.

#### **I.2.13 a)- Antivirales**

Las drogas anti-influenza, amantadina y rimantadina, pueden ser utilizadas en la prevención de la infección por el virus influenza. Ambos antivirales inhiben la replicación viral a través de la inactivación del canal iónico de la proteína M2, pero sólo son efectivos para los virus influenza tipo A. Existen más datos en cuanto a su utilidad como agentes preventivos de la enfermedad en los niños, que en relación a sus beneficios terapéuticos. La amantadina debe administrarse en dosis de 5 mg/kg/día cada 12 hs. en niños de uno a nueve años, tanto para tratamiento como para profilaxis. En niños mayores, la dosis es de 100 mg cada 12 hs. en ambos casos. Las dosis de rimantadina para tratamiento en niños no está establecida ya que no ha sido aprobada para esta indicación por la "Food and Drug Administration (FDA)" de Estados Unidos, si bien algunos expertos la consideran útil. En la profilaxis se utilizan las mismas dosis que para la amantadina. El tratamiento conduce a una reducción en la severidad de la infección y acorta la duración de los síntomas si la droga es administrada dentro de las primeras 24-48 hs. luego del comienzo de los síntomas. Estas drogas requieren ser administradas cuidadosamente y causan numerosos efectos colaterales; las mismas no están recomendadas para uso general sino que se utilizan

sólo en casos específicos como ser: para personas de riesgo que no hayan recibido previamente la vacuna , en el caso de un brote de influenza para aquellos en los cuales la vacuna está contraindicada, como parte de la estrategia para el control de brotes en comunidades cerradas y para viajeros a zonas de epidemia que no puedan ser vacunados a tiempo (91).

En la Argentina, la utilización de terapias antivirales para el virus influenza es prácticamente nula. A pesar de ello, estudios previos llevados a cabo en otros países del mundo describen la posibilidad de aislar cepas resistentes a partir de pacientes que no habían recibido amantadina o rimantadina previamente (92).

Con el objeto de disminuir la toxicidad y ampliar el espectro hacia el virus influenza B, se han desarrollado nuevos antivirales. Esta nueva generación de drogas se conoce como inhibidores competitivos de la NA. La NA viral es una enzima que actúa liberando ácido siálico de proteínas receptoras del virus en la superficie celular. Sin la acción de la NA, los viriones no pueden ser liberados y se interrumpe el ciclo. Por lo tanto, éste es un sitio atractivo para la terapia antiviral. Los inhibidores de la NA, zanamivir y oseltamivir, se asemejan en su estructura a los ácidos siálicos y actúan inhibiendo el sitio activo de la enzima. Ambos han demostrado su eficacia en el tratamiento y la prevención de la infección en adultos y mayores de trece años. El zanamivir es de administración inhalatoria debido a que posee una pobre disponibilidad oral y el oseltamivir se administra en forma de cápsulas orales cada 12 horas. Ambas drogas son efectivas *in vitro* contra el virus influenza A, incluida la mayoría de sus subtipos y contra el virus influenza B (93). Su implementación ayuda a reducir la duración de la enfermedad, la severidad de los síntomas y la posibilidad de desarrollar enfermedades secundarias como neumonía y otitis. El zanamivir está aprobado para ser usado en el tratamiento de enfermedades agudas sin complicaciones causadas por el virus influenza en personas mayores de doce años (94). Esta droga no puede ser utilizada en niños menores de doce años. Por su parte, el oseltamivir está aprobado para el tratamiento de enfermedades agudas sin complicaciones causadas por el virus influenza en adultos y adolescentes menores de dieciocho años que han tenido síntomas por un período no mayor a dos días (95). Hasta el momento, ninguna de estas drogas a sido aprobada para profilaxis; sin embargo, publicaciones recientes demuestran que ambas poseen una efectividad

similar (zanamivir: 84%, oseltamivir: 82%) para prevenir la infección por influenza confirmada por laboratorio.

Si bien la amantadina y la rimantadina, y recientemente los inhibidores de NA, han demostrado efectividad en la prevención de la enfermedad, la medida más útil desde el punto de vista costo-efectividad sigue siendo la vacuna antigripal.

### **I.2.13 b)- Vacunas**

La vacuna antigripal se encuentra disponible desde hace más de tres décadas. Actualmente, se utiliza una vacuna inactivada compuesta por antígenos de dos subtipos del virus influenza A (H1N1 y H3N2) y del virus B. Las formas disponibles incluyen vacunas con virus inactivado completo, partículas del virus o subviriones y antígenos purificados de la superficie del virión, todas para administración intramuscular en el deltoides. Actualmente la reactogenicidad de estas formulaciones es mucho menor que la observada en las preparaciones iniciales de la vacuna; asimismo, las preparadas tanto con los productos disgregados del virus que se obtienen luego del tratamiento con detergentes como aquellas que contienen sólo las subunidades HA/NA son menos reactogénicas aún que las vacunas con el virus completo y conservan su inmunogenicidad (96).

Luego de la vacunación se desarrollan dos tipos de respuesta inmune, la celular y la humoral. A los 7 días de aplicada la vacuna, ya se observan anticuerpos protectores y una respuesta celular mediada por los linfocitos T citotóxicos. La inmunidad adquirida mediante la vacuna inactivada persiste durante 10 a 12 meses. Los niños menores de nueve años que nunca han recibido la vacuna deben ser vacunados con dos dosis separadas por 1 mes de diferencia, para alcanzar un nivel de anticuerpos adecuado.

En regiones de clima templado, se debe aplicar una dosis de vacuna anualmente durante el otoño. En la infancia, la vacuna puede aplicarse desde los 6 meses de vida.

Las recomendaciones actuales para la aplicación de la vacuna antigripal, están dirigidas especialmente a dos grupos: las personas que tienen mayor riesgo de padecer las complicaciones de influenza y las que pueden transmitir la enfermedad a personas de alto riesgo, como ser los convivientes con personas de riesgo y los trabajadores de

la salud. Existe un tercer grupo que incluye a todo aquella persona que desee evitar la enfermedad (97).

La población más expuesta a las complicaciones de la gripe está formada por los mayores de 65 años y los menores de 65 con enfermedades crónicas; también por los niños y adolescentes que reciben aspirina en forma crónica y las mujeres que cursan su segundo o tercer trimestre de embarazo durante la época de gripe.

Cada año la composición de la vacuna se basa en aquellas cepas de influenza que se espera aparezcan el invierno siguiente. Cuando la vacuna y las cepas de la epidemia están bien apareadas, las altas tasas de vacunación en los geriátricos y en otras unidades de cuidados crónicos inducen a una importante inmunidad y pueden reducir el riesgo de brotes. Además, la vacunación puede reducir las tasas de internación y muerte debido a influenza y sus complicaciones (98). La gran variabilidad antigénica de la proteína HA viral y la limitada respuesta inmunológica (99) luego de la vacunación requieren de la reformulación anual de la vacuna y la revacunación anual.

Las vacunas tienen una eficacia variable (70% a 90% en los adultos con una edad menor a 60 años), que depende de la precisión de la paridad con las cepas virales circulantes, así como de la edad y susceptibilidad a la infección del sujeto vacunado (100). La eficacia es más baja particularmente en los niños pequeños y en los ancianos, dos poblaciones que tienen un riesgo incrementado de complicaciones. Por otro lado, la vacuna antigripal previene entre el 30% y el 70% de las internaciones por neumonía e influenza de los ancianos que no viven en geriátricos (101). Para las personas que conviven en comunidades cerradas como los hogares de ancianos o centros de cuidados prolongados, la efectividad en las internaciones por neumonía es del 50 al 60% y asciende al 80% para la prevención de las muertes.

Numerosos estudios han demostrado la ausencia de efectos adversos severos relacionados con la vacuna antigripal. Las reacciones adversas más frecuentes relacionadas con la vacuna antigripal son las locales (eritema, tumefacción y dolor) que se resuelven en 48 hs. Las reacciones sistémicas (fiebre, mialgias y decaimiento) son poco frecuentes y comienzan entre 6 y 12 hs. luego de la vacunación.

Las contraindicaciones de la vacuna antigripal son escasas y comprenden a las personas con alergia grave a las proteínas del huevo (puesto que la misma se fabrica en embriones de pollo), a las personas con alergia al timerosal (que es utilizado en

algunas formulaciones como conservante) y a aquellas con antecedentes de síndrome de Guillain-Barré. Una contraindicación relativa es la presencia de un cuadro febril, el que debe estar resuelto antes de la vacunación para no enmascarar otras etiologías.

Si bien la vacuna inactivada actualmente disponible es efectiva y segura, se están investigando también otras vacunas que permitan mejorar su eficacia y obtener inmunidad prolongada en personas con alto riesgo y en niños. Algunas líneas de desarrollo incluyen el uso de adyuvantes y manejo del ADN para mejorar la respuesta inmunológica. Los resultados más importantes se han logrado recientemente con la vacuna intranasal con virus vivos atenuados, que desarrolla inmunidad local en mucosas y también sistémica. La aceptación de la misma fue buena, con una inmunogenicidad en niños del 61% al 96% y una eficacia de aproximadamente 93% para influenza A (H3N2) y B (102).

#### **I.2.14- Vigilancia epidemiológica**

La vigilancia epidemiológica del virus influenza en cada país o región permite:

- a) determinar cuándo, dónde y cuál virus influenza está circulando;
- b) definir la magnitud y el impacto de la actividad de influenza;
- c) detectar eventos inusuales relacionados con el virus (ej.: infecciones por nuevos virus de influenza, síndromes pocos frecuentes, epidemias severas, etc);
- d) proveer información básica para establecer las mejores estrategias de prevención y control de la gripe.

Existen dos tipos de vigilancia: la epidemiológica y la virológica. La vigilancia epidemiológica nos ofrece la posibilidad de conocer la magnitud y el impacto de la epidemia o la pandemia. Para estimar la extensión de la actividad gripal se utiliza una amplia variedad de índices. El principal marcador de incidencia se basa en el número de pacientes con cuadros gripales que acuden a las consultas en relación con el número de consultas por todas las causas. Otros índices que pueden emplearse son el ausentismo escolar o laboral, las tasas de venta de fármacos que combaten síntomas gripales, o la hospitalización por infecciones respiratorias agudas. El impacto de las epidemias de virus influenza sobre la mortalidad es estimado de un modo retrospectivo y se evalúa como el exceso de mortalidad asociado a la gripe y a las neumonías. Por otra parte, la vigilancia virológica, que se realiza mediante el diagnóstico de laboratorio de los casos sospechosos, permite descubrir la presencia de

variaciones antigénicas menores o mayores además del diagnóstico etiológico, ya que otras enfermedades respiratorias causadas por otros virus se presentan con la misma sintomatología. Existen muchos sistemas nacionales de vigilancia, sin embargo, la mayoría de ellos apuntan principalmente a la detección de los casos humanos y sólo algunos integran los sistemas de vigilancia de influenza animal lo cuales permiten contar con un conocimiento más amplio de la ecología, evolución y mecanismos que contribuyen a la emergencia de virus influenza A virulentos.

En líneas generales, podemos distinguir tres tipos de laboratorios encargados de la *vigilancia gripal*:

**Primer nivel:** Se encuentran los laboratorios de diagnóstico que detectan el virus influenza tipo A o tipo B. Este diagnóstico es generalmente rápido, por IFD o IFI sobre las secreciones del paciente, buscando antígenos virales en las células de descamación del tracto respiratorio.

**Segundo nivel:** Se hallan los laboratorios nacionales de referencia, encargados de confirmar los resultados de los laboratorios de primer nivel, llevándose a cabo, además, el aislamiento, la subtipificación y la caracterización antigénica del virus, lo que permite saber si dentro del tipo A se trata del subtipo con H3N2 o H1N1, que son los dos subtipos de virus A que co-circulan en la actualidad a nivel mundial. El virus B no posee subtipos, por lo tanto se lleva a cabo sólo la caracterización antigénica.

Como se dijo anteriormente, la OMS ha establecido una Red Mundial de Vigilancia de Influenza desde 1947, compuesta por 110 laboratorios en 83 países (103). En la Argentina, los Centros Nacionales de Referencia son el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr. Carlos Malbrán en la ciudad de Buenos Aires, el Instituto Nacional de Epidemiología “J. Jara” en la ciudad de Mar del Plata y el Instituto Viroológico de Córdoba “Dr. J. Vanella” en Córdoba.

**Tercer nivel:** Centros de Referencia Internacionales, que funcionan en cuatro países: Atlanta (Estados Unidos), Londres (Reino Unido), Melbourne (Australia), Tokio (Japón). En dichos Centros se complementa la caracterización antigénica de las cepas realizada previamente por los centros nacionales, así como la secuenciación, lo que permite evaluar las mutaciones que ha sufrido el virus a nivel de su información genética. Se establecen lo que se denominan cepas de referencia para la temporada, y se analiza si hubo variaciones importantes en los virus que marquen una diferencia

antigénica y obtener árboles filogenéticos de relaciones entre las cepas que circularon a nivel mundial.

Dado que los fabricantes necesitan al menos seis meses para preparar una vacuna nueva, la OMS se reúne cada año (generalmente en febrero) para recomendar las cepas de influenza a ser incluidas en la vacuna durante el invierno del hemisferio norte. Hasta 1998, la vacuna recomendada para el hemisferio norte era usada para el invierno del hemisferio sur medio año después. Estudios realizados por Regnery y col. y Savy y col. (104, 105) han revelado que, en ocho de diez inviernos estudiados, la vacuna recomendada para el hemisferio norte no coincidió con las cepas que circularon durante el siguiente invierno del hemisferio sur. Por este motivo, desde 1998, la OMS celebra una segunda reunión anual (en septiembre o a principios de octubre), para recomendar las cepas de vacuna antigripal para el hemisferio sur.

Debido a diferencias en los patrones de circulación del virus en zonas tropicales y subtropicales, la decisión sobre el mejor tiempo para la vacunación en estas áreas es más complicada y debe ser hecha caso por caso.

#### **I.2.15- Situación en la Argentina**

Como se mencionó previamente, en nuestro país existe una Red Nacional de Laboratorios de Influenza y Virus Respiratorios, ver figura 8. Dentro de los objetivos a alcanzar por esta Red se encuentran detectar la circulación de influenza y otros virus respiratorios en la población en función de los meses del año, por región geográfica y grupos de edad. Además de la Red Nacional, en el año 1998 se puso en marcha el sistema de médicos centinelas que, utilizando la definición de caso de influenza, complementan con sus aportes a la vigilancia nacional. Como cabecera de Red, el Servicio de Virus Respiratorios del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr. Carlos Malbrán lleva a cabo la caracterización de los virus detectados en los laboratorios de la Red, el monitoreo de la concordancia entre las cepas circulantes y las vacunales, así como la coordinación de la información sobre otros virus respiratorios. Debido a la rápida capacidad de cambio del virus influenza, este Centro Nacional de Influenza se encuentra en alerta continuo para detectar variantes e identificar virus nuevos. Toda la información producida se comunica rápidamente a los participantes de la Red Nacional, a las autoridades nacionales e internacionales, y



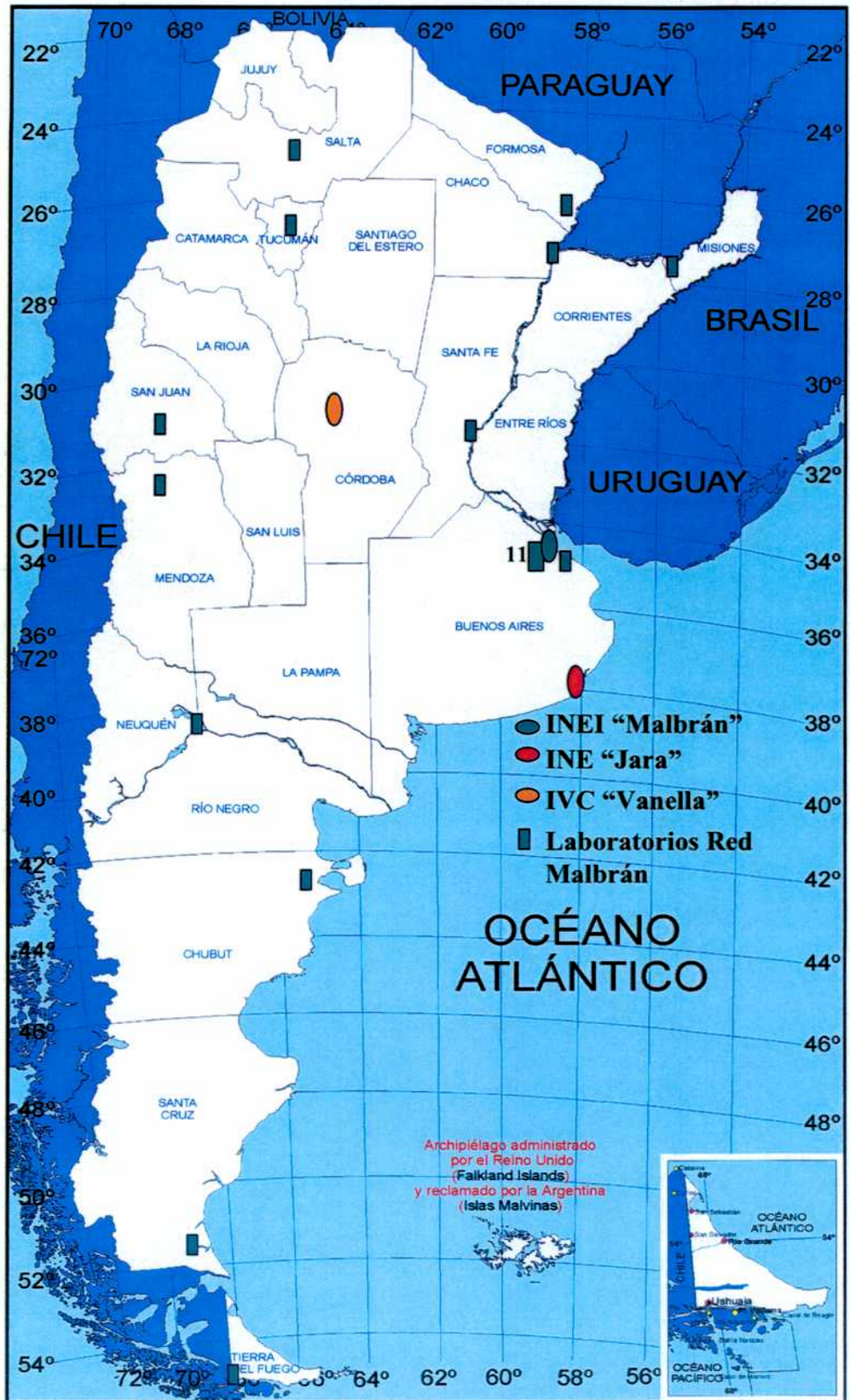


Figura 8: Red Nacional de Laboratorios de Influenza y Virus Respiratorios coordinada por el Servicio de Virosis Respiratorias, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

se difunde a la población médica general en una publicación anual, el boletín GROG, y en una página en internet actualizada semanalmente: [www.grog-argentina.org/index.asp](http://www.grog-argentina.org/index.asp). Además, los resultados obtenidos también se ingresan semanalmente en la página de la red FluNet ([rhone.b3e.jussieu.fr/flunet/www/](http://rhone.b3e.jussieu.fr/flunet/www/)).

En nuestro país existen también instituciones que actualmente están trabajando en virus influenza animal como ser la Universidad de La Plata y el SENASA que junto con el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr. Carlos Malbrán están llevando a cabo el estudio de virus de origen aviar y porcino. La intención en un futuro cercano es poder contar con una Red de Vigilancia de virus influenza animal que ayude, entre otras cosas, a complementar la información obtenida a partir de la población humana.



## **II. OBJETIVOS**

El contenido de esta tesis se ha desarrollado de acuerdo con los siguientes objetivos:

**III.1-** Analizar la prevalencia del virus influenza con respecto a los otros virus respiratorios estudiados que circularon en la población humana entre 1995 y 1999 y correlacionar el número de síndromes tipo influenza notificados al SINAVE con los datos de mortalidad compilados por la misma institución para los niños menores de 5 años durante ese mismo período.

**III.2-** Aplicar nuevas metodologías destinadas a conocer la variabilidad de los virus influenza circulantes en la población de nuestro país.

**III.3-** Comparar las características antigénicas y genómicas de los virus influenza circulantes en la población humana de nuestro país durante los años 1995-2002 con sus correspondientes componentes vacunales.

**III.4-** Realizar un estudio de resistencia antiviral a la rimantadina entre cepas de influenza A aisladas en nuestro país y en el Paraguay en el período 1997 – 2000.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **III.1- Virus**

Las cepas de referencia utilizadas se presentan en el cuadro 4.

#### **III.2- Células**

Se utilizó la línea celular MDCK (células de riñón de perro) (ATCC CCL 34), obtenida de *Influenza Branch, Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, Georgia, Estados Unidos.

#### **III.3- Medios de cultivo**

**III.3.1-** Se usó como medio de crecimiento para las células MEM Eagle con base salina de Earle conteniendo aminoácidos no esenciales y suplementado con 7% de suero fetal bovino (GIBCO) y 1% de solución de Hepes 1 M (SIGMA).

**III.3.2-** El medio de mantenimiento utilizado fue igual al descrito en el ítem anterior pero con una concentración de 2% de suero fetal.

**III.3.3-** Las infecciones se realizaron con un medio similar al anterior reemplazando el suero fetal por 1% de solución de tripsina al 0,25%.

#### **III.4- Anticuerpos monoclonales**

Para realizar las reacciones de inmunofluorescencia, se utilizaron los siguientes reactivos: a)- anticuerpos monoclonales para influenza tipo-específicos dirigidos contra la nucleoproteína viral, los cuales forman parte del equipo de reactivos distribuido por la OMS a los Centros Nacionales de Influenza b) suero anti-inmunoglobulina de ratón obtenido en cabra y marcado con isotiocianato de fluoresceína (Dako A/S, Glostrup, Dinamarca); c) anticuerpos monoclonales tipo-específicos marcados con fluoresceína para IFD (IMAGEN, Dako).

**Cuadro 4. Cepas de referencia para los distintos años en base a los estudios de circulación mundial (OMS)**

<b>Año</b>	<b>Influenza A H3N2</b>	<b>Influenza A H1N1</b>	<b>Influenza B</b>
<b>1 995</b>	A/Johannesburg/33/94 A/Shangdong/9/93		B/Panamá/45/90 B/Beijing/184/93
<b>1 996</b>	A/Johannesburg/33/94 A/Nanchang/933/95 A/Wuhan/395/95		
<b>1 997</b>	A/Nanchang/933/95 A/Sydney/5/97	A/Texas/36/91 A/Taiwan/1/86 A/Bayern/7/95	B/Panamá/45/90 B/Beijing/184/93
<b>1 998</b>	A/Wuhan/395/95 A/Nanchang/933/95 A/Sydney/5/97 A/Johannesburg/29/98 A/Victoria/318/98 A/Finlandia/620/99		
<b>1 999</b>	A/Nanchang/933/95 A/Sydney/5/97	A/Bayern/7/95 A/Beijing/262/95	B/Beijing/184/93 B/Beijing/243/96
<b>2 000</b>	B/Beijing/184/93 A/Moscow/10/00 A/Panamá/2007/99	A/New Caledonia/20/99	B/Beijing/184/93 B/Yamanashi/166/98
<b>2 001</b>	A/Sydney/5/97 A/Panamá/2007/99	A/New Caledonia/20/99 A/Bayern/7/95	B/Yamanashi/166/98 B/Beijing/243/96 B/Johannesburg/5/99
<b>2 002</b>	A/Panamá/2007/99	A/New Caledonia/20/99	B/Yamanashi/166/98 B/Sichuán/379/99 B/Victoria/504/00 B/Hong Kong/22/01 B/Hong Kong/330/01 B/Hong Kong/1351/02

Las cepas de referencia utilizadas fueron cedidas por los Centros Internacionales de la OMS: CDC (Atlanta, EEUU), Londres (Reino Unido) y Melbourne (Australia).

### III.5- Titulación de virus por hemaglutinación (Ha)

Se utilizaron glóbulos rojos (GR) de pavo o de cobayo recogidos en solución de Alsever la cual actúa como anticoagulante y conservante. El tipo de microplaca (pocillos en "V" o en "U") se escogió dependiendo de la clase de GR a utilizar (ver cuadro 5). Los GR fueron lavados tres veces con PBS pH 7,2 por centrifugación durante 10 minutos a 1 500 rpm y a 4 °C. Luego se preparó la dilución apropiada de trabajo de acuerdo al tipo de GR.

La reacción de Ha se llevó a cabo colocando 50 µl de PBS pH 7,2 en todos los pocillos de una hilera de la microplaca. Luego se agregó 50 µl de sobrenadante de cultivo en el primer pocillo de la misma hilera. A continuación se realizaron diluciones seriadas al medio partiendo de la primera 1/2. En cada ensayo fue necesario incluir una fila correspondiente a un control de células sin infectar y otra de control de GR a la cual sólo se le agregó 50 µl de una suspensión de GR en PBS. Luego de agitar la placa suavemente, se incubó durante 30-60 minutos (ver cuadro 5) a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo se llevó a cabo la lectura de la placa. El título hemaglutinante se definió como la inversa de la máxima dilución donde se observó aglutinación.

**Cuadro 5. Condiciones de la reacción de Ha para diferentes tipos de GR**

	<b>Pavo</b>	<b>Cobayo</b>
<b>Concentración de GR</b>	0,5%	0,75%
<b>Microplaca</b>	V	U
<b>Tiempo de incubación a 25° C</b>	30 minutos	1 hora
<b>Apariencia del control de GR</b>	Botón	Halo



### **III.6- Aislamiento viral**

#### **III.6.1- Procesamiento de las muestras clínicas**

Las muestras clínicas fueron almacenadas a 4° C hasta el momento de ser procesadas, salvo cuando se conocía que no era posible procesarlas dentro de las 72 hs., en ese caso fueron almacenadas a – 70° C o en su defecto en nitrógeno líquido.

##### **III.6.1 a)- Procesamiento a partir de hisopados nasofaríngeos**

El propósito de la técnica es lavar las células epiteliales intactas y depositarlas sobre un portaobjetos. Para ello, se agitó el hisopo junto con su medio de transporte en un Vortex y se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5-2 ml. Luego se centrifugó la muestra a 1 200 rpm durante 10 minutos a 4° C. Se separó el sobrenadante que se recolectó en un tubo estéril y se conservó a 4° C para intento de aislamiento viral en cultivo de células. El sedimento de células se lavó luego con PBS pH 7,2 y se repitió el paso de centrifugación anterior. Luego de descartar el sobrenadante, se resuspendió el sedimento celular en 50-100 µl de PBS pH 7,2, dependiendo de la cantidad de células presentes. Luego, se homogeneizó de manera de obtener una suspensión opalescente y se colocó 10-20 µl de esta suspensión sobre portaobjetos para procesar por IF. Se dejó secar al aire y fijó con acetona (Merck) a –20° C durante 10 minutos.

##### **III.6.1 b)- Procesamiento a partir de aspirados nasofaríngeos**

Esta muestra puede llegar al laboratorio en un tubo conteniendo medio de transporte o en la sonda que se utilizó para su toma. En el último caso, la sonda se lavó con 2 ml de medio de transporte y se vació su contenido en un tubo cónico. Con la ayuda de una pipeta Pasteur o de transferencia, se disgregó el moco aspirándolo varias veces junto con el medio de transporte para desprender las células del mismo. Los pasos de lavado y centrifugación siguientes se realizaron de acuerdo a los descrito en el ítem anterior. Luego

de descartar el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió en 0,5-1 ml de PBS pH 7,2, dependiendo de la cantidad de células presentes. Por último, se homogeneizó hasta obtener una suspensión opalescente y se colocó 10-20  $\mu$ l de esta suspensión sobre un portaobjeto, se dejó secar al aire y fijó con acetona (Merck) a  $-20^{\circ}$  C durante 10 minutos. Oportunamente se procesó el preparado por IF.

### **III.6.2- Detección de antígeno de NP viral por IFI**

En cada pocillo del portaobjetos se agregó 10-20  $\mu$ l de la dilución de trabajo del anticuerpo monoclonal a utilizar. Luego de incubar 30 minutos a  $37^{\circ}$  C en cámara húmeda, se realizaron tres lavados con PBS pH 7,6 de 10 minutos cada uno. Se dejó secar al aire y se colocó sobre cada pocillo 10-20  $\mu$ l (lo necesario para cubrirlo) del conjugado anti-inmunoglobulina de ratón diluido en Azul de Evans según título determinado previamente. Se repitió la incubación y los 3 lavados en idénticas condiciones. Se dejó secar al aire y se montó con glicerina tamponada a pH 8,4. La lectura de la reacción se llevó a cabo en un microscopio de luz UV (Olympus BX40) con objetivo 40 X y ocular 10 X.

A partir de las muestras con diagnóstico positivo para el virus influenza por IFI, se llevó a cabo el intento de aislamiento viral en cultivos celulares. A los sobrenadantes correspondientes se los trató con una mezcla antibiótica-antimicótica en una concentración final de 0,5-1%. Se dejó actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Alternativamente, los sobrenadantes se filtraron usando una membrana de acetato de celulosa con tamaño de poro 0,22 micrones.

### **III.6.3- Infección de cultivos celulares**

Se utilizaron monocapas de células MDCK de 24 hs. crecidas en microplacas (Nunc o similar). Previo a la infección, se llevó a cabo el lavado de la monocapa utilizando 1 ml de PBS pH 7,2 estéril o bien medio de infección para eliminar los restos de suero fetal bovino que pudieran interferir con la tripsina. Se descartó el lavado e infectó la monocapa usando 200  $\mu$ l del sobrenadante de la muestra clínica previamente tratada o filtrada utilizando para ello dos pocillos por muestra. Se dejó adsorber el virus a  $35,5^{\circ}$  C durante 1 hora. Al cabo de ese tiempo se agregó 1 ml de

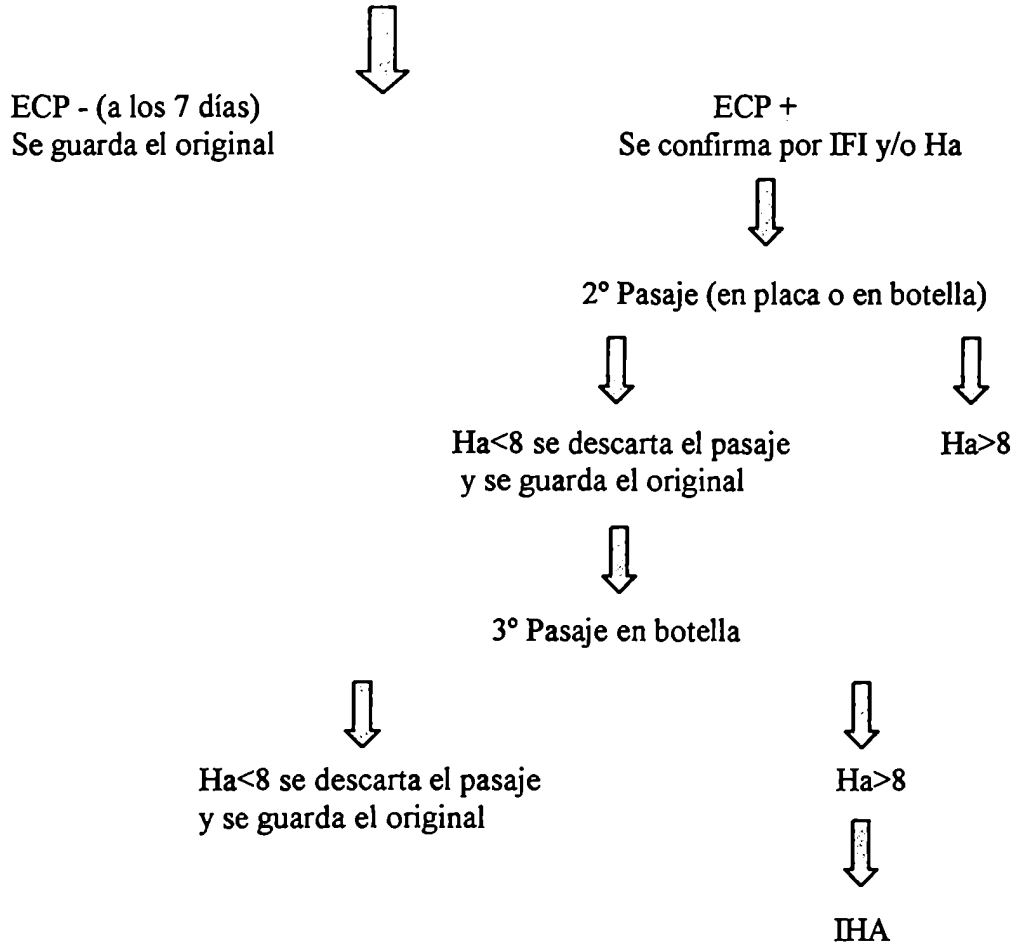
medio de mantenimiento previamente descrito y se incubó en estufa con atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Se observó al microscopio invertido (Olympus CK2) diariamente para ver la aparición de ECP consistente en redondeamiento celular y desprendimiento. La cosecha que consiste en el sobrenadante de cultivo junto con las células desprendidas en suspensión se llevó a cabo inmediatamente después de la aparición del ECP. En el caso de no observarse ECP, el cultivo se cosechó aproximadamente a los 7 días post-infección y se mantuvo a 4° C hasta su amplificación.

#### **III.6.4- Amplificación del stock viral**

Para amplificar el stock, se utilizaron monocapas de células MDCK de 24 hs. en botellas de plástico (Corning) de 25 cm<sup>2</sup> en presencia de medio de crecimiento. Antes de infectar, la monocapa se lavó como se describió previamente pero con un volumen de 3 ml. Se descartó el líquido de lavado y se inoculó la monocapa con 1 ml del stock viral. Luego de 1 hora de adsorción en estufa con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 35,5° C, sin retirar el inóculo, se agregó 6 ml de medio de mantenimiento. Los cultivos se observaron diariamente para visualizar el ECP, el sobrenadante se cosechó y conservó a 4° C hasta titular el virus por Ha. Para ello, previamente a su fraccionamiento y congelación se agregó albúmina al 0,4% (concentración final). En el esquema de trabajo I se muestra el esquema de trabajo utilizado para la infección de los cultivos celulares y la amplificación del stock viral.

### Esquema de trabajo I

Diagnóstico Flu +: tratamiento de la muestra con 1% ATB



### III.7- Técnica de IHA

Con el objeto de subtipificar y caracterizar antigénicamente los stocks virales generados se utilizó la técnica de IHA. Los sueros de referencia utilizados se muestran en el cuadro 6.

**Cuadro 6. Sueros de referencia utilizados en la reacción de IHA**

Año	Sueros de oveja utilizados	Sueros de hurón utilizados
1 995	Suero de referencia H3N2 (OMS 1 995) Suero de referencia H1N1 " " B/Panamá/45/90	A/Johannesburg/33/94 (H3N2) A/Shangdong/9/93 (H3N2) B/Beijing/184/93 B/Panamá/45/90
1 996	Suero de referencia H3N2 (OMS 1 996) Suero de referencia H1N1 " " B/Beijing/184/93	A/Johannesburg/33/94 (H3N2) A/Wuhan/359/95 (H3N2) A/Nanchang/933/95 (H3N2)
1 997	Suero de referencia H3N2 (OMS 1 997) Suero de referencia H1N1 " " B/Beijing/184/93	A/Nanchang/933/95 (H3N2) A/Sydney/5/97 (H3N2) A/Bayern/7/95 (H1N1) A/Singapore/6/86 (H1N1) A/Texas/36/91 (H1N1) A/Taiwan/6/86 (H1N1) B/Beijing/184/93 B/Panamá/45/90
1 998	Suero de referencia H3N2 (OMS 1 998) Suero de referencia H1N1 " " B/Beijing/184/93	A/Wuhan/359/95 (H3N2) A/Nanchang/933/95 (H3N2) A/Sydney/5/97 (H3N2) A/Johannesburg/29/98 (H3N2) A/Victoria/318/98 (H3N2) A/Finlandia/620/99 (H3N2)
1 999	Suero de referencia H3N2 (OMS 1 999) Suero de referencia H1N1 " " B/Beijing/184/93	A/Sydney/5/97 (H3N2) A/Bayern/7/95 (H1N1) A/Beijing/262/96 (H1N1) B/Beijing/184/93
2 000	Suero de referencia H3N2 (OMS 2 000) Suero de referencia H1N1 " " B/Beijing/184/93	A/Sydney/5/97 (H3N2) A/Moscow/10/99 (H3N2) A/New Caledonia/20/99 (H1N1) B/Beijing/184/93 B/Yamanashi/166/98
2 001	A/Panamá/2007/99 (H3N2) A/Bayern/7/95 (H1N1) A/New Caledonia/20/99 (H1N1) B/Yamanashi/166/98 B/Johannesburg/5/99	A/Panamá/2007/99 (H3N2) A/New Caledonia/20/99 (H1N1) B/Yamanashi/166/98 B/Sichuán/379/99
2 002	A/Panamá/2007/99 (H3N2) A/New Caledonia/20/99 (H1N1) B/Hong Kong/330/01	A/Panamá/2007/99 (H3N2) A/New Caledonia/20/99 (H1N1) B/Yamanashi/166/98 B/Victoria/504/00 B/Hong Kong/330/01 B/Hong Kong/1351/02

Los sueros utilizados fueron cedidos por los Centros Internacionales de la OMS: CDC (Atlanta, Estados Unidos), Londres (Reino Unido) y Melbourne (Australia) o bien formaban parte del equipo de diagnóstico distribuido por la OMS.

### **III.7.1- Tratamiento de los sueros**

Previamente a realizar la técnica de la IHA, los sueros utilizados que figuran en el cuadro 6 fueron tratados para eliminar posibles inhibidores inespecíficos que podrían estar presentes. Dicho tratamiento consistió en reconstituir la enzima destructora de receptor (RDE) con 25 ml de solución fisiológica (SF). Se mezclaron tres volúmenes de RDE con 1 volumen de suero y se incubó toda la noche en baño a 37° C. Para inactivar la RDE remanente, el suero se colocó durante 1 hora en baño de agua a 56° C. Luego se agregó 6 volúmenes de SF en relación al volumen original de suero. La dilución final de suero utilizada fue 1/10.

### **III.7.2- Calibración del stock viral**

Primeramente, se realizó la titulación de los antígenos de referencia y de los aislamientos de acuerdo a la técnica de Ha previamente descrita. Cada antígeno control debió ser estandarizado de manera de contener 4 unidades de Ha/25 µl, o bien 8 unidades de Ha/50 µl. Para ello, dependiendo del título obtenido en la Ha, se llevaron a cabo diluciones de los correspondientes antígenos en PBS pH 7,2.

Se consideró que los antígenos que contenían 8 UHa se corresponden con un título de Ha= 8. Las suspensiones virales con títulos mayores a 8 debieron ser ajustadas llevando a cabo una nueva hemaglutinación confirmatoria realizando una nueva dilución y utilizando las diluciones de antígeno antes preparadas. Se repitieron tantas titulaciones como fueron necesarias hasta que se obtuvieron 8 unidades hemaglutinantes para cada antígeno.

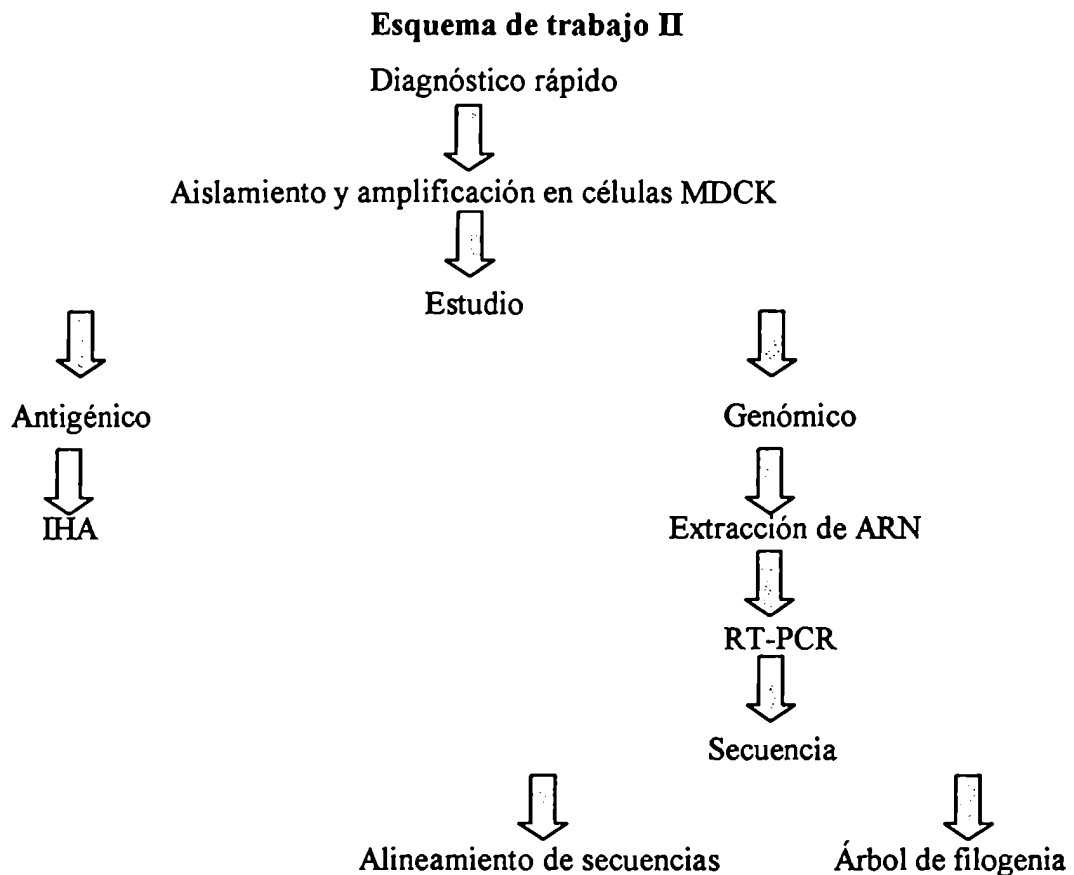
### **III.7.3- IHA**

Para realizar esta reacción se colocaron 50 µl de PBS pH 7,2 desde el pocillo 2 hasta el pocillo 12 de una placa de 96 pocillos, utilizando una fila para cada antígeno. Luego de agregar en el pocillo 1, 100 µl de la dilución 1/10 del suero, se realizaron diluciones al medio. Cada antígeno fue probado con los sueros correspondientes: para los stocks virales tipo A se utilizaron los sueros pertenecientes al subtipo H1 y H3, mientras que para los stocks virales tipo B se utilizaron los sueros

para B. Luego se colocaron en todos los pocillos 50  $\mu$ l de la dilución de antígeno que contenía 8 UHa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se agregó 50  $\mu$ l de la suspensión de GR a todos los pocillos. Se utilizó como control de GR una línea que contenía 50  $\mu$ l de PBS más 50  $\mu$ l de la suspensión de GR.

Si un aislamiento reaccionaba con un antisuero de referencia a un título igual al que reaccionaba con el virus homólogo de referencia ( $\pm$  dos diluciones) se considera cercanamente relacionado a ese virus de referencia.

Seguidamente se muestra el esquema de trabajo II que conduce al aislamiento y caracterización antigénica como se muestra en la rama izquierda del diagrama.



El criterio para llevar a cabo el análisis genómico de los virus influenza aislados, cuyo flujo se muestra en la rama derecha del diagrama, fue el siguiente: con el objeto de tomar una muestra representativa del total de los virus influenza aislados, se seleccionaron sólo algunos de los virus que habían sido previamente caracterizados antigénicamente en base al momento y a la ubicación geográfica en la que se obtuvo el aislamiento. Para ello, la extracción de ARN se realizó a partir de stocks virales con título hemaglutinante mayor o igual a 8.

### III. 8- Análisis genómico

La idea original de la técnica de PCR que actualmente se utiliza en todo el mundo surgió en la primavera de 1983 a partir del Dr. Kary Mullis (106). Esta técnica está basada en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN que está flanqueado por dos oligonucleótidos que hibridan cadenas opuestas de la secuencia blanco y su orientación permite que la síntesis de ADN por la ADN polimerasa tenga lugar entre la ubicación de los mismos, duplicando la cantidad del segmento en cuestión. Más aún, dado que los productos de extensión son también complementarios y capaces de unirse con los oligonucleótidos, cada ciclo sucesivo duplica la cantidad sintetizada en el paso previo. Ello implica la acumulación exponencial del fragmento de interés (secuencia blanco) en el orden de aproximadamente  $2^n$ , donde n es el número de ciclos. Si el genoma a amplificar es ARN, como es el caso del virus influenza, es menester un paso previo de amplificación en sí misma que consiste en la transcripción reversa (RT) a ADN complementario mediante la utilización de enzimas termolábiles o termoestables, dependiendo de la técnica.

Para llevar a cabo la caracterización genómica de algunas cepas de virus influenza A y B aisladas durante el período 1995-2002, se utilizó la técnica de RT-PCR con oligonucleótidos específicos que permiten amplificar la porción HA1 de la HA y el gen completo que codifica para la NA viral. Para ello, se realizó la extracción de ARN genómico a partir de los sobrenadantes resultantes de la amplificación de cada una de las cepas amplificadas en cultivos celulares. La experiencia previa demuestra que es conveniente llevar a cabo la extracción de ARN, la RT y la PCR el mismo día, debido a la poca estabilidad del ARN genómico obtenido luego del primer paso de extracción.

#### Los oligonucleótidos utilizados fueron:

- Oligonucleótidos (Invitrogen o similar) para amplificar la porción HA1 de la HA:  
H3A1F1: complementario al extremo 3' del ARN y ADNc (iniciador) que codifica para la porción HA<sub>1</sub> de la proteína HA de los virus influenza A (H3N2):  
5'- ATG AAG ACT ATC ATT GCT TTG AGC-3'



H1A1F1: iniciador para influenza A (H1N1):

5'- CAA CCA AAA TGA AAG CAA AAC TAC-3'

BHA1F1: iniciador para influenza B:

5'- AAT ATC CAC AAA ATG AAG GCA ATA-3'

H3A1R1: complementario al extremo 5' del ADNc (terminador) que codifica para la porción HA<sub>1</sub> de la proteína HA de los virus influenza A (H3N2):

5'- GTC TAT CAT TCC CTC CCA ACC ATT -3'

H1A1R1: terminador para influenza A (H1N1):

5'- CAA TGA AAC CGG CAA TGG CTC CAA -3'

BHA1R2: terminador para influenza B:

5'- ATC ATT CCT TCC CAT CCT CCT TCC -3'

- Oligonucleótidos para amplificar NA completa:

H3N2F1: iniciador para influenza A (H3N2):

5'- AGC AAA AGC AGG AGT GAA AAT GAA-3'

H1N1F1: iniciador para influenza A (H1N1):

5'- AGC AAA AGC AGG AGT TTA AAA TGA-3'

BNAF1: iniciador para influenza B:

5'- AGC AGA AGC AGA GCA TAT TCT TAG-3'

H3N2R1: terminador para influenza A (H3N2):

5'- TTC TAA AAT TGC GAA AGC TTA TAT -3'

H1N1R1: terminador para influenza A (H1N1):

5'- GTA GAA ACA AGG AGT TTT TTC AAC -3'

BNAR1: terminador para influenza B:

5'- CAG AAA CAA TTA AGT CCA GTA AGG -3'

- Oligonucleótidos para amplificar un segmento de la porción HA<sub>1</sub> de la HA mediante la técnica de RT-PCR semi anidada:

oligo 1: iniciador para influenza A (H1N1):

5'- CAA CCA AAA TGA AAG CAA AAC TAC-3'. Posición: - 60

oligo 2: iniciador para influenza A (H1N1):

5'- CCC TGA GAA TGG AAC ATG TTA CCC -3'. Posición: 254-277.

oligo 6: terminador para influenza A (H1N1):

5'- CTC CGT CAG CCA TAG CAA ATT TTT -3'. Posición: 461-438.

oligo 7: iniciador para influenza A (H3N2):

5'- ATG AAG ACT ATC ATT GCT TTG AGC -3'. Posición: - 48.

oligo 8: iniciador para influenza A (H3N2):

5'- ACT GAT AGA TGC TCT ATT GGG AGA -3'. Posición: 197-220.

oligo 12: terminador para influenza A (H3N2):

5'- TGT TAA CAG ATC CTC TTT TGC AAG -3'. Posición: 438-415.

### III.8.1- Extracción de ARN total

Se llevó a cabo mediante la utilización de dos métodos: a)- Fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) pH 5,2, para los stocks virales obtenidos a partir de muestras recolectadas en el período 1995-1999 y b)- El método de Casas et al. (107) para los stocks virales obtenidos a partir de muestras recolectadas desde el año 2000 en adelante. A este último método se le hicieron algunas modificaciones.

### III.8.2- Síntesis de ADNc

#### III.8.2 a)- Para obtener el ADNc de la porción HA1 de la proteína HA

Se utilizó la siguiente mezcla de reacción (Vol final:20 µl):

	(µl)
* Buffer AMV 5X (Promega)	4
* H <sub>2</sub> O	7
* dNTPs de una sol. 20 mM (Promega)	1
* Oligonucleótido: H3A1F1 o H1A1F1 o BHA1F1 (100 µg/µl)	1
* Inhibidor de ARNsas 40 U/µl(Promega)	1
* Enzima retrotranscriptasa AMV 10 U/µl (Promega)	1
Volumen total:	<hr/> 15

### III.8.2 b)- Para obtener el ADNc de la NA

Se utilizó la siguiente mezcla de reacción (Vol final:20 µl):

	(µl)
* Buffer AMV 5X	4
* H <sub>2</sub> O	7
* dNTPs de una sol. 20 mM	1
* Oligonucleótido: H3N2F1 o H1N1F1o BNAF1 (100 µg/µl)	1
* Inhibidor de ARNsas 40 U/µl	1
* Enzima retrotranscriptasa AMV 10 U/µl	1
Volumen total:	<hr/> 15

A la mezcla de reacción se le agregó 5 µl de ARN viral o 5 µl de H<sub>2</sub>O en los tubos correspondientes a los controles negativos.

### III.8.3- Amplificación mediante PCR

#### III.8.3 a)- Para la amplificación de la porción HA1 de la proteína HA

Mezcla de reacción (Vol final 50 µl):

	(µl)
* H <sub>2</sub> O	33,5
* MgCl <sub>2</sub> (Promega o similar)	3
* Buffer TAQ (Promega o similar)	5
* dNTPs de una sol. 20mM (Promega)	1
* Oligonucleótido H3A1F1 o H1A1F1o BHA1F1 (100 µg/µl)	1
* Oligonucleótido H3A1R1 o H1A1R1o BHA1R2 (100 µg/µl)	1
* Polimerasa TAQ 5 U/µl	0,5
Volumen total:	<hr/> 45

A la mezcla de reacción se le agrega 5 µl de ADNc o 5 µl del tubo de reacción del control negativo.

### III.8.3 b)- Para la amplificación de la NA

Mezcla de reacción (Vol final 50 µl):

	(µl)
* H <sub>2</sub> O	33,5
* MgCl <sub>2</sub>	3
* Buffer TAQ	5
* dNTPs de una sol. 20mM	1
* Oligonucleótido H3N1F1 o H1N1F1o BNAF1 (100 µg/µl)	1
* Oligonucleótido H3N2R1 o H1N1R1o BNAR1 (100 µg/µl)	1
* Polimerasa TAQ 5 U/µl	0,5
Volumen total:	<hr/> 45

A la mezcla de reacción se le agrega 5 µl de ADNc o 5 µl del tubo de reacción de control negativo.

### III.8.4- Programación del termociclador (Biometra personal cycler, vers.3.26)

#### Síntesis de ADNc:

\* 1 hora a 42° C.

\* 10 minutos a 95° C.

#### PCR:

\* 95° C    2 minutos            1 ciclo

\* 95° C    15 segundos }  
\* 50° C    15 segundos } 34 ciclos  
\* 72° C    2 minutos    }

\* 72° C    10 minutos            1 ciclo

\* Mantener a 4° C.

### **III.8.5- Visualización de los productos de PCR**

Para observar la aparición de las bandas correspondientes a los productos obtenidos luego de llevar a cabo la reacción de PCR, se realizó un gel horizontal de agarosa (BioRad) al 1% en buffer TAE en presencia de bromuro de etidio (5 µl a partir de una solución 100 mg/ml marca Sigma) en una cuba horizontal de electroforesis (BioRad) conteniendo buffer TAE. En cada una de las calles se sembró la mezcla conteniendo 3 µl de buffer de corrida (Promega) y 5 µl del producto de PCR. En la primera calle se sembró la mezcla de 3 µl de buffer de corrida y 2,3 µl de marcador de peso molecular (100 pb, Promega). Se utilizó una fuente de poder (BioRad) y se llevó a cabo la corrida a 80 voltios durante 40 minutos aproximadamente. Luego el gel de agarosa se observó al transiluminador de luz UV.

El tamaño esperado de cada uno de los productos fue el siguiente:

Porción HA<sub>1</sub> de la HA del virus influenza A (H3N2): 1 043 nt.

Porción HA<sub>1</sub> de la HA del virus influenza A (H1N1): 1 011 nt.

Porción HA<sub>1</sub> de la HA del virus influenza B: 852 nt.

NA del virus influenza A (H3N2): 1 424 nt.

NA del virus influenza A (H1N1): 1 411 nt.

NA del virus influenza B: 1 442 nt.

### **III.8.6- Técnica de RT-PCR semi-anidada**

Esta técnica descrita por Zhang y Evans en 1991 (108) permite subtipificar las cepas de virus influenza A en H1 y H3 a partir de la muestra clínica original. Se aplicó únicamente en algunos casos en los cuales o bien no se logró recuperar la cepa viral en cultivos celulares o bien no se logró obtener un título de HA apropiado para llevar a cabo la caracterización antigénica por IHA.

Para llevar a cabo esta técnica, se realizó la extracción de ARN utilizando el método Casas et al. descrito previamente.

### III.8.6 a)- Síntesis de ADNc:

Mezcla de reacción (Vol final:20  $\mu$ l):

	( $\mu$ l)
* Buffer AMV 5X	4
* H <sub>2</sub> O	7
* dNTPs de una sol. 20 mM	1
* Oligonucleótido: oligo 1 u oligo 7 (100 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1
* Inhibidor de ARNsas 40 U/ $\mu$ l	1
* Enzima retrotranscriptasa AMV 10 U/ $\mu$ l	1
Volumen total:	<hr/> 15

A la mezcla de reacción se le agregó 5  $\mu$ l de ARN viral o 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O en el tubo correspondiente al control negativo.

### III.8.6 b)- Amplificación por PCR

Primera ronda de PCR:

Mezcla de reacción (Vol final 50  $\mu$ l):

	( $\mu$ l)
* H <sub>2</sub> O	33,5
* MgCl <sub>2</sub>	3
* Buffer TAQ	5
* dNTPs de una sol. 20mM	1
* Oligonucleótido: oligo 1 u oligo 7 (100 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1
* Oligonucleótido: oligo 6 u oligo 12 (100 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1
* Polimerasa TAQ 5 U/ $\mu$ l	0,5
Volumen total	<hr/> 45

A la mezcla de reacción se le agregaron 5  $\mu$ l de ADNc o 5  $\mu$ l del tubo de reacción del control negativo.

Segunda ronda de PCR:

Mezcla de reacción (Vol final 50 µl):

	(µl)
* H <sub>2</sub> O	33,5
* MgCl <sub>2</sub>	3
* Buffer TAQ	5
* dNTPs de una sol. 20mM	1
* Oligonucleótido: oligo 2 u oligo 8 (100 µg/µl)	1
* Oligonucleótido: oligo 6 u oligo 12 (100 µg/µl)	1
* Polimerasa TAQ 5 U/µl	0,5
Volumen total:	<hr/> 45

A la mezcla de reacción se le agregaron 5 µl del producto obtenido a partir de la primera ronda de PCR o 5 µl del tubo de reacción del control negativo.

### III.8.6 c)- Programa del termociclador

Primera ronda de PCR:

* 95° C	2 minutos	1 ciclo
* 95° C	15 segundos	} 35 ciclos
* 50° C	15 segundos	
* 72° C	2 minutos	
* 72° C	10 minutos	1 ciclo

\* Mantener a 4 ° C

Segunda ronda de PCR:

* 95° C	2 minutos	1 ciclo
* 95° C	15 segundos	} 30 ciclos
* 50° C	15 segundos	
* 72° C	2 minutos	
* 72° C	10 minutos	1 ciclo

\* Mantener a 4 ° C

**III.8.6 d)- Visualización de los productos de la PCR**

Los productos de PCR se visualizaron como se describió previamente en el punto III.8.5.

El tamaño esperado de cada uno de los segmentos fue el siguiente:

Porción HA<sub>1</sub> de la HA del virus influenza A (H1N1) producto de la primera ronda de PCR: 502 nt.

Porción HA<sub>1</sub> de la HA del virus influenza A (H1N1) producto de la segunda ronda de PCR: 207 nt.

Porción HA<sub>1</sub> de la HA del virus influenza A (H3N2) producto de la primera ronda de PCR: 486 nt.

Porción HA<sub>1</sub> de la HA del virus influenza A (H3N2) producto de la segunda ronda de PCR: 241 nt.

**III.8.7- Purificación de las bandas correspondientes a los productos de PCR de la porción HA<sub>1</sub> y NA**

Las bandas correspondientes a los productos de PCR esperados fueron purificadas para su posterior secuenciación mediante la utilización del equipo comercial: "US Bioclean<sup>®</sup> MP" (United States Biochemical). Se sembró la mezcla conteniendo la totalidad del producto de PCR y 10 µl de buffer de corrida en un gel de agarosa "low melting" (GIBCO BRL) al 1% en buffer TAE en presencia de bromuro



de etidio. Para ello, se utilizaron dos calles por muestra, dejando una calle libre entre muestra y muestra para evitar contaminaciones. Al gel de agarosa se le aplicó una corriente de no más de 80 voltios el tiempo suficiente para que las bandas pudieran separarse claramente, lo que ocurre, en general, entre los 40 y los 50 minutos aproximadamente. Una vez concluida la corrida electroforética, se cortó con un bisturí la porción de agarosa conteniendo la banda de interés y se colocó en un tubo de 1,5 ml. Al tubo conteniendo la porción de agarosa con la banda de interés se le agregaron 800  $\mu$ l de una solución de yoduro de sodio 6 M. Luego se incubó en baño de agua a 56° C durante 1-2 minutos y se agregó 10  $\mu$ l de resina (“Gassmilk”) en cada tubo. Se mezcló invirtiendo el tubo e incubando en hielo durante 15 minutos. Luego se centrifugó a 13 000 rpm durante 30 minutos a 4° C. Se eliminó el sobrenadante cuidando de no tocar la resina y se agregó 500  $\mu$ l de buffer de lavado. Se centrifugó nuevamente a 13 000 rpm durante 30 segundos y se descartó el sobrenadante. Este paso de lavado se repitió dos veces. Posteriormente se colocaron 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O en cada tubo y se resuspendió la resina mezclando con Vortex. Se incubó en baño de agua a 56° C durante 5 minutos y finalmente se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 minuto y se recogió el sobrenadante en otro tubo. Para mejorar el rendimiento de la purificación se agregó nuevamente 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O en cada tubo conteniendo la resina, se resuspendió la resina mezclando con Vortex y se incubó en baño de agua a 56° C durante 5 minutos. Se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 minuto y se recogió este segundo sobrenadante en el mismo tubo donde se recogió la primera elución.

### **III.8.7-a) Gel de agarosa para confirmar la calidad de la purificación**

Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TAE en presencia de bromuro de etidio. Se sembraron los productos de la PCR purificados (5  $\mu$ l) y marcador de PM (3  $\mu$ l) junto con buffer de corrida (3  $\mu$ l). La corrida electroforética se llevó a cabo en buffer TAE a 80 voltios durante 30 minutos aproximadamente. Luego de transcurrido ese tiempo, el gel se observó al transiluminador de luz UV. En esta ocasión sólo se deberían observar los productos de PCR libres de contaminantes como ser: restos de oligonucleótidos y otras bandas de peso molecular no deseado.

### III.8.8- Secuenciación

#### III.8.8 a)- Para la porción HA1 de la HA:

Mezcla de reacción (Vl. final: 10 µl):

	(µl)
* Oligonucleótido H3A1F1 o H1A1F1o BHA1F1 (100 µg/µl)	0,5
* H <sub>2</sub> O	3
* Reactivo de secuencia "Big Dye" (Perkin Elmer)	4
* ADN en estudio	2,5

Repetir esta reacción utilizando el oligonucleótido H3A1R1 o H1A1R1o BHA1R2.

#### III.8.8 b)- Para la NA:

Mezcla de reacción (Vl. final: 10 µl):

	(µl)
* Oligonucleótido H3N1F1 o H1N1F1o BNAF1 (100 µg/µl)	0,5
* H <sub>2</sub> O	3
* Reactivo de secuencia "Big Dye"	4
* ADN en estudio	2,5

Repetir esta reacción utilizando el oligonucleótido H3N2R1 o H1N1R1 o BNAR1.

#### III.8.8 c)- Programa del termociclador utilizado para la reacción de secuencia

\* 96° C 2 minutos                      1 ciclo

\* 96° C 30 segundos }  
\* 50° C 15 segundos } 24 ciclos  
\* 60° C 4 minutos }

\* Mantener a 4° C

### **III.8.8 d)- Precipitación de los productos obtenidos en la reacción de secuenciación**

En tubos de 500 µl se colocaron 2 µl de acetato de sodio 3M pH 4,6 y 50 µl de etanol puro (96%). En los mismos tubos se agregaron 10 µl de los productos de la reacción de secuencia de cada muestra . Se incubó en hielo durante 15 minutos y luego se centrifugó a 14 000 rpm durante 25 minutos a 4° C. Se sacó el sobrenadante con cuidado y el precipitado resultante se lavó con 250 µl de etanol 70%. Se centrifugó nuevamente a 14 000 rpm durante 5 minutos a 4° C. El precipitado final se secó en el cuarto estufa para eliminar los restos de etanol.

### **III.8.8 e)- Secuencia en gel de acrilamida**

Condiciones de armado del gel de secuencia:

* Urea (Amresco)	18 gr.
* Acrilamida PAGE-Plus concentrado (Amresco)	6,6 ml
* TEMED (Sigma)	25 µl
* Persulfato de amonio 10% (Amresco)	250 µl
* Resina de lecho mixto (Sigma)	0,5 gr
* H <sub>2</sub> O hasta 50 ml	

En cada calle se sembraron 2,2 µl de la mezcla conteniendo el ADN en estudio y el buffer de siembra. La corrida electroforética se llevó a cabo en un secuenciador ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER (Perkin-Elmer, Biosystems) durante un período aproximado de 9 horas a 2 400 Voltios. Los aislamientos obtenidos durante el período 1 995-1 999 fueron secuenciados por la tesista durante una pasantía llevada a cabo en el Centro Colaborador de la OMS de Londres, Inglaterra; mientras que para el resto de los aislamientos, el ADN obtenido luego de la reacción de secuencia fue enviado al Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala-Chabén” para su secuenciación automática.

### **III.8.8 f)- Análisis filogenético de los resultados**

Una vez finalizado el proceso de electroforesis, la obtención de la información final de las secuencias correspondientes a la porción HA<sub>1</sub> de la HA y a la NA a partir del gel se realizó utilizando el programa 377 DATA COLLECTION. Las secuencias finales (a partir de las secuencias con sentido positivo y con sentido negativo) se obtuvieron utilizando el programa de edición Chromas Ver. 1.56 y el paquete “Wisconsin Sequence Analysis” versión 8 (109). Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas se realizaron utilizando el programa ClustalX (110). La edición de los alineamientos y la traducción a aminoácidos se realizó mediante el programa MEGA versión 2.1 (111). Para determinar la confianza del árbol obtenido a partir del análisis filogenético, los datos se remuestrearon (“bootstrap”) por lo menos 100 veces utilizando el programa SeqBoot. El cálculo de distancias y la obtención de los árboles filogenéticos se realizó utilizando los programas DNAdist (112) y Neighbor (113). Finalmente, se determinó el árbol consenso utilizando el programa Consense y el mismo fue visualizado por medio del programa Treeview (114). Los programas DNAdist, SeqBoot, Consense y Neighbor están incluidos en el paquete PHYLIP versión 3.57. Si bien se ha observado en otros trabajos (115) que la topología del árbol de filogenia es la misma cuando se utilizan tanto los programas de máxima probabilidad (PHYLIP versión 3.57) como de máxima parsimonia (PAUP versión 4.0), las secuencias correspondientes a algunas cepas virales aisladas entre los años 1995 y 1999 fueron analizadas también utilizando el programa PAUP versión 4.0 usando el método de Farris.

### **III.8.9 g)- Números de acceso a la base de datos**

Las secuencias nucleotídicas de las cepas argentinas correspondientes a la porción HA<sub>1</sub> del gen que codifica para la HA de los virus influenza A que circularon en 1998 se encuentran dentro de la base de datos “GenBank”, bajo los siguientes números de acceso: AF533712 al AF533729.

Las secuencias nucleotídicas de las cepas argentinas correspondientes al gen que codifica para la NA de los virus influenza A que circularon en 1998, poseen los siguientes números de acceso: AF533730 al AF533750.

Las secuencias nucleotídicas de las cepas argentinas correspondientes al gen que codifica para la NA de los virus influenza A que circularon durante los años 1 995, 1 996, 1997 y 1 999, presentan los siguientes números de acceso: AF533989 al AF534002.

Las secuencias nucleotídicas de las cepas argentinas correspondientes a la porción HA<sub>1</sub> del gen que codifica para la HA de los virus influenza B que circularon durante los años 1 995, 1 997, 1 999 y 2 000, poseen los siguientes números de acceso: AF534003 al AF534012.

Las secuencias nucleotídicas de las cepas argentinas correspondientes a la porción HA<sub>1</sub> del gen que codifica para la HA de los virus influenza A que circularon durante los años 1 995, 1 996, 1 997, 1 999, 2 000 y 2 001, presentan los siguientes números de acceso: AF534013 al AF54060.

Otras secuencias argentinas utilizadas en este trabajo de tesis se encuentran disponibles en el Servicio de Virosis Respiratorias, INEI-ANLIS “Carlos G. Malbrán”.

### **III.9- Análisis de resistencia antiviral**

Debido a que no existen estudios previos de resistencia antiviral de las cepas de virus influenza A que circulan en nuestro país y en la región y dada la disponibilidad de las mismas en el Centro de Referencia, se decidió incluir en este trabajo de tesis el estudio preliminar de 12 cepas de virus influenza A aisladas durante el período 1 997-2 000, las cuales habían sido caracterizadas en los estudios antigénicos y genómicos descritos anteriormente.

Debido a que se conocen cuales son los aminoácidos responsables de la resistencia se utilizó en primer lugar la técnica del polimorfismo del tamaño de fragmentos de ADN por restricción enzimática (RFLPs) que permite detectar variantes genómicas y luego los resultados obtenidos se confirmaron probando en un sistema in-vitro la sensibilidad a la rimantadina de la cepa así detectada en relación con una cepa de referencia susceptible.

### **III.9.1- Detección de genomas mutantes**

Los reactivos usados fueron:

- Kit: QIAamp Viral RNA (QIAGEN).

- Enzimas de restricción:

Aci I (5,000 U/ml) (Biolabs)

Ita I (10 U/μl) (Roche)

Mwo I (5,000 U/ml) (Biolabs)

Ssp I (40 U/μl) (Boehringer Mannheim)

- Oligonucleótidos para amplificar la proteína M2:

F 683: iniciador que codifica para la proteína M2 de los virus influenza A:

5'- GGG ACT CAT CCT AGC TCC AGT GCT GGT CTA AA -3'

R 837: terminador que codifica para la proteína M2 de los virus influenza A:

5'-CGA TCA AGA ATC CAC AAT ATC AAG TGC AAG ATC CCA ATA ATA-3'

- Kit: One Step RT-PCR (QIAGEN).

#### **III.9.1 a)- Extracción de ARN viral**

A partir del sobrenadante de cultivos celulares con título hemaglutinante igual o mayor a 8 se llevó a cabo la extracción de ARN viral utilizando el kit QIAamp Viral RNA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **III.9.1 b)- Amplificación parcial de la proteína M2 mediante la técnica de RT-PCR**

Luego de la extracción de ARN viral se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar una porción de la proteína viral M2. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un solo paso utilizando el Kit One Step RT-PCR (QIAGEN).

Mezcla de reacción (Vol final:50 µl):

	(µl)
* Buffer 5X	10
* dNTPs	2
* Oligonucleótido F683 (0,1 µg/µl)	1
* Oligonucleótido R837 (0,1 µg/µl)	1
* Inhibidor de ARNsas 40 U/µl	0,25
* Mezcla de enzimas	2
Volumen total:	<hr/> 15

A esta mezcla de reacción se le agrega 3 µl de ARN o 3 µl de H<sub>2</sub>O al tubo correspondiente al control negativo.

### III.9.1 c)- Técnica de RFLP

A partir de los productos de PCR obtenidos se llevó a cabo la digestión de los mismos de acuerdo al protocolo descrito en la bibliografía (116). Para ello, se utilizaron 4 enzimas de restricción que permiten caracterizar cada una de las posiciones aminoacídicas presentes en la proteína M2 que al modificarse le confieren al virión la capacidad de resistir a la droga antiviral. En el cuadro 7 se detallan las enzimas utilizadas y los sitios de restricción de cada una de ellas.

**Cuadro 7. Stios de restricción de las enzimas utilizadas en la técnica de RFLPs**

Enzima de restricción	Posición en la proteína M2	Aminoácido	Sensibilidad a la rimantadina	Fragmentos de restricción
<b>Aci I</b>	26	Leucina	Sensible	133, 52
		Fenilalanina	Resistente	155
<b>Mwo I</b>	27	Valina	Sensible	155
		Alanina	Resistencia	116, 39
<b>Ita I</b>	30	Alanina	Sensible	116, 39
		Valina/Treonina	Resistencia	155
<b>Ssp I</b>	31	Serina	Sensible	155
		Asparagina	Resistencia	124, 31

Se agregaron entre 2-5 U de cada una de las enzimas de restricción en presencia de sus respectivos buffers a 10 µl de cada uno de los productos de la PCR y esta mezcla se incubó a 37° C durante 2 horas las enzimas Aci I, Ita I y Ssp I, mientras que la mezcla conteniendo la enzima Mwo I se incubó a 60° C durante 2 horas. Los productos de la digestión se visualizaron en un gel de agarosa al 1,7% en "buffer" TAE en presencia de bromuro de etidio (5 µl a partir de una solución 100 mg/ml) en una cuba horizontal de electroforesis conteniendo buffer TAE. En cada una de las calles se sembró la mezcla conteniendo 10 µl de buffer de corrida y la totalidad del volumen disponible luego de la digestión. En la primera calle se sembró la mezcla de 3 µl de buffer de corrida y 2,3 µl de marcador de peso molecular (Bench Top φX174 DNA/Hae III, Promega). Se llevó a cabo la corrida en una fuente de poder a 110 voltios durante 2 horas aproximadamente. Luego el gel de agarosa se observó al transiluminador de luz UV.

#### **III.9.1 d)- Confirmación del cambio aminoacídico mediante la secuenciación parcial de la proteína M2**

Luego de la digestión con las enzimas Aci I y Ssp I si se detectan variantes genómicas con cambios aminoacídicos que puedan conferirles la propiedad de ser probablemente no sensibles, estos resultados deben ser confirmados mediante la secuenciación de una porción de la proteína M2 que contenga dichos cambios. Para la misma se realizó nuevamente la técnica de RT-PCR descrita en el ítem 9.1.b a partir del ARN extraído previamente. Luego se secuenció el producto de PCR llevando a cabo la misma metodología empleada en el 8.8 utilizando para ello los oligonucleótidos F683 y R837 que se habían empleado para amplificar la proteína M2 en la técnica de RT-PCR descrita en el ítem 9.2 de esta sección. Finalmente, se comparó la secuencia aminoacídica de la cepa probablemente no sensible con la secuencia de la cepa de referencia resistente a la rimantadina A/Leningrado/57 (H1N1) mediante un alineamiento realizado utilizando el programa MEGA versión 2.1.



### **III.9.2- Estudio de sensibilidad a la rimantadina *in vitro***

Con el objeto de conocer la CI50 de la rimantadina para la cepa probablemente resistente y poder comparar su valor con el obtenido para una cepa de referencia, se llevó a cabo en primer lugar el estudio de citotoxicidad de la rimantadina en placas de cultivo con monocapas de células MDCK. Luego, se procedió a titular tanto la cepa en estudio (A/Córdoba/V185/98 (H3N2)) como la cepa de referencia sensible a la rimantadina (A/Texas/36/91 (H1N1)) mediante la técnica de plaqueo en presencia de la droga.

#### **III.9.2 a)- Ensayo de citotoxicidad**

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron monocapas de células MDCK en una placa de cultivo de 24 pocillos. Previo al agregado de la droga, se realizaron dos lavados de la monocapa utilizando 0,5 ml de PBS pH 7,2 estéril. Posteriormente, cada pocillo se cubrió por duplicado con 500 µl de diluciones seriadas al medio partiendo de una concentración de 16 µgr/ml hasta 0,03 µgr/ml de rimantadina en medio de mantenimiento MEM Eagle con base salina de Earle, con aminoácidos no esenciales, sin suero suplementado con Hepes 20 mM, tripsina 2 µgr/ml y DEAE-Dextran 300 µgr/ml (SIGMA). Además, se cubrieron dos pocillos control con 500 µl de medio de mantenimiento sin droga. Esta placa se incubó en estufa con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 33,5° C durante 72 hs.

#### **III.9.2 b)- Titulación mediante la técnica de plaqueo**

Se inoculó una placa de 24 pocillos con células MDCK con 100 µl por duplicado tanto de la cepa Texas como la cepa Córdoba sin diluir y en diluciones 1:2, 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup> en PBS pH 7,2. Previo a la infección, se llevaron a cabo dos lavados de la monocapa utilizando 0,5 ml de PBS pH 7,2 estéril. Se dejó adsorber el virus a temperatura ambiente durante 1 hora. Al cabo de ese tiempo se retiró el inóculo y se agregó en cada pocillo 500 µl de una mezcla constituida por partes iguales de agarosa 1% y medio de mantenimiento MEM 2X suplementado con tripsina 4 µgr/ml y DEAE-Dextran 600 µgr/ml. La placa

se incubó en estufa con atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 33,5° C durante 72 hs. Transcurrido ese tiempo, se agregó en cada pocillo 500 µl de formol 10% (SIGMA) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos aproximadamente. Se retiró el formol y se lavó la placa con H<sub>2</sub>O para eliminar los restos de agarosa. Luego de secar la placa, se agregó 500 µl aproximadamente de cristal violeta 1% en etanol 10% en H<sub>2</sub>O y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se retiró el exceso de cristal violeta y se lavó la monocapa con H<sub>2</sub>O. Luego de dejar secar la placa a temperatura ambiente, se llevó a cabo el conteo de placas y se calculó la UFP/ml de ambas cepas utilizando esta fórmula:

$$\text{UFP/ml} = \frac{\bar{X}}{\text{Volumen x Dilución}}$$

Siendo  $\bar{X}$  el número promedio de placas.

### III.9.2 c)- Cálculo de la CI<sub>50</sub>

En este caso se decidió utilizar, de acuerdo a lo observado en el ensayo de citotoxicidad, cinco concentraciones finales de droga: 8 µgr/ml, 2 µgr/ml, 0,5 µgr/ml, 0,125 µgr/ml y 0,03 µgr/ml realizadas en el mismo medio de mantenimiento descrito en el ítem III.9.2 a). Por otro lado, se utilizaron como inóculo diluciones de la cepa patrón y la cepa en estudio determinadas sobre la base de los resultados obtenidos en el ítem III.9.2 b). Por lo tanto, se inocularon 100 µl de las diluciones 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-2,3</sup> en PBS pH 7,2 del virus en estudio y diluciones 10<sup>-1,3</sup> y 10<sup>-2</sup> del virus patrón. A su vez, cada inóculo contenía una concentración final de droga similar a la concentración de droga presente en el medio de mantenimiento. Previo a la infección, se llevaron a cabo dos lavados de la monocapa utilizando 0,5 ml de PBS pH 7,2 estéril. Luego, se agregó en cada pocillo por duplicado 100 µl de las diluciones correspondientes a la cepa patrón y de estudio preparadas previamente. Se dejó adsorber el virus a temperatura ambiente durante 1 hora. Al cabo de ese tiempo se retiró el inóculo y se agregó en cada pocillo 500 µl de una mezcla constituida por partes iguales de agarosa 1% y medio de mantenimiento

conteniendo las distintas diluciones de la droga mencionadas previamente. Finalmente, se siguieron los pasos de incubación, fijación y coloración descritos en el ítem III.9.2 b).



## IV. RESULTADOS

### IV.1- Morbilidad y mortalidad en la Argentina en el período 1995-1999

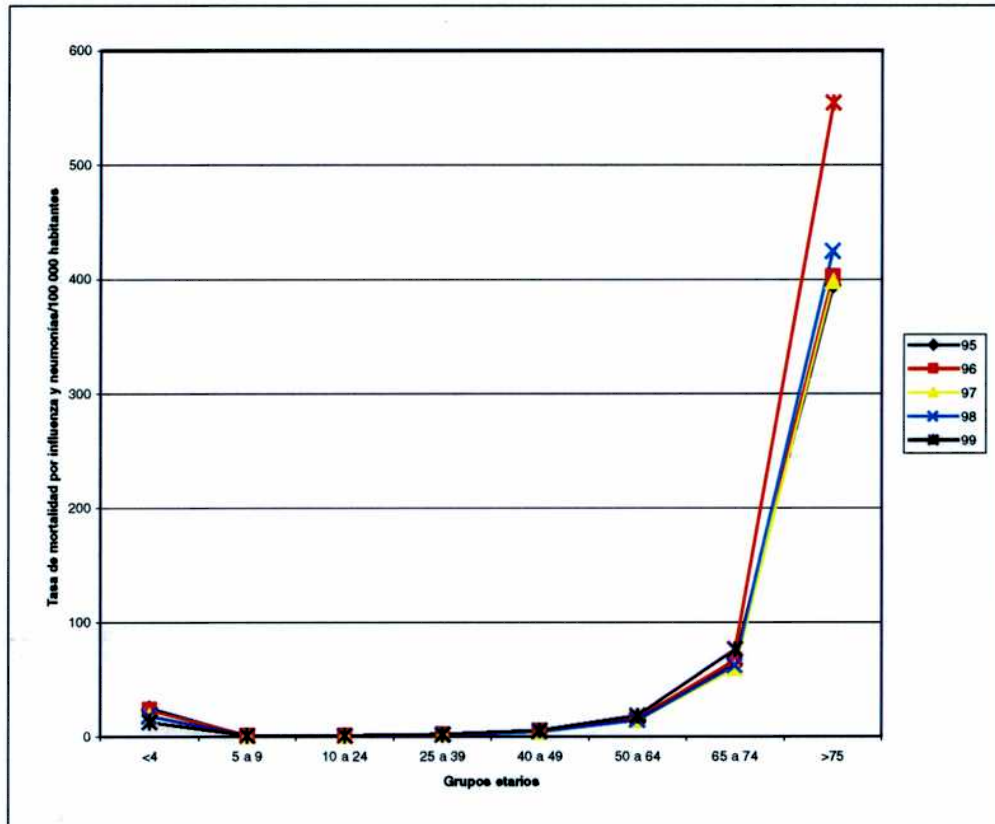
#### IV.1.1- Registro de tasa de mortalidad

La situación epidemiológica de nuestro país en relación al virus influenza fue analizada en primer lugar considerando la tasa de mortalidad por influenza y neumonías a nivel país para diferentes grupos etarios definidos en base a la susceptibilidad que presentan frente a la infección por influenza para el período comprendido entre los años 1995-1999. Estos datos resultaron del análisis de las notificaciones de las muertes causadas por el virus influenza y las neumonías para el total de la población de nuestro país recolectados por el SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica) durante el período de estudio antes mencionado. En la figura 9 se puede observar que los grupos etarios de riesgo los constituyen los niños menores de cinco años y los adultos mayores de 50 años, en consonancia con datos existentes en otros países (117, 118). A partir de los 50 y hasta los 65 años, la mortalidad aumenta en relación directa pero luego de los 75 años la progresión es logarítmica alcanzando una tasa de mortalidad promedio de 43,5‰.

Cuando se comparan los datos correspondientes a los distintos años, no se observan diferencias significativas en el patrón de susceptibilidad entre 1995, 1996, 1997 y 1998, pero sí se distingue un aumento significativo de la mortalidad en el año 1999 ( $P < 0,0001$ ) para el grupo de riesgo correspondiente a los adultos mayores de 75 años, ya que el porcentaje de muertes por influenza y neumonías respecto del total de la población comprendida dentro de este grupo etario aumenta del 0,42 % en 1998 al 0,55% en 1999.

La comparación del número de muertes por influenza y neumonías para mayores de 75 entre los años 1998 y 1999 se llevó a cabo de la siguiente manera:

	1998	1999
<b>Muertos por Flu y neumonías</b>	5.843	7.632
<b>No muertos</b>	1.370.061	1.368.272



**Figura 9:** Tasa de mortalidad anual por influenza y neumonías para diferentes grupos etarios en el período 1 995-1 999

Como resultado del cálculo estadístico Chi-cuadrado (con la corrección de Yates)= 238,42 con 1 grado de libertad se obtuvo un valor de  $P < 0,0001$ , el cual se considera extremadamente significativo. Existe también asociación significativa entre filas y columnas.

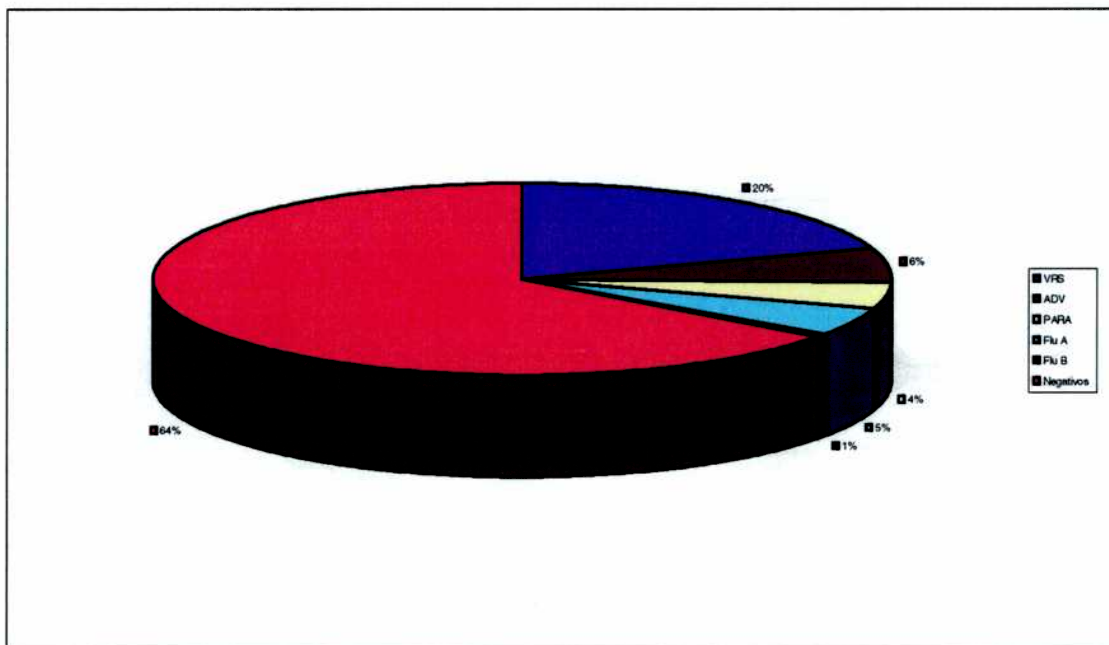
#### **IV.1.2- Aislamiento de virus respiratorios en el grupo etario de los niños menores de cinco años de edad durante el período 1 995-1 999**

El análisis de los virus involucrados en los síndromes respiratorios se realizó en el grupo de niños menores de cinco años debido a que, durante el período de estudio antes mencionado, en el Servicio de Virosis Respiratorias el diagnóstico de virus respiratorios sólo se realizaba a partir de muestras provenientes de niños internados por infección respiratoria aguda baja (IRAB). Para ello, se llevó a cabo la identificación de los siguientes virus respiratorios: VRS (virus respiratorio sincicial), adenovirus (ADV), parainfluenza (PARA), influenza (Flu A) e influenza (Flu B). Los resultados obtenidos a lo largo de los 5 años se muestran en los cuadros 8 y 9 y en la figura 10.

**Cuadro 8. Porcentaje de positividad obtenido a partir de muestras provenientes de niños internados con IRAB, período 1 995-1 999**

<b>Año</b>	<b>Nº de Muestras</b>	<b>Nº de Positivas</b>	<b>Nº de Negativas</b>	<b>Nº de Indeterminadas</b>	<b>% de Positividad</b>
<b>1 995</b>	268	80	186	2	29,55
<b>1 996</b>	708	249	454	6	35,17
<b>1 997</b>	320	111	208	1	34,69
<b>1 998</b>	784	297	471	20	37,88
<b>1 999</b>	234	69	157	38	29,49
<b>Totales</b>	<b>2314</b>	<b>806</b>	<b>1476</b>	<b>67</b>	<b>34,83</b>

En el cuadro 8, se consignó el número de muestras recibidas (2314), el número de positivas (806), negativas (1476) e indeterminadas (38) para el período. Estos datos muestran que el porcentaje de positividad de las muestras estudiadas estuvo



**Figura 10:** Porcentajes relativos de aislamientos de virus respiratorios detectados sobre el total de muestras clínicas realizadas, período 1 995-1 999.



comprendido entre el 29,49% y 37,88%. Con el objeto de evaluar la reproducibilidad global de los datos, se llevó a cabo el análisis de chi-cuadrado para independencia con 4 grados de libertad a partir del porcentaje de positividad para todos los virus respiratorios detectados durante el período 1 995-1 999. El valor de P obtenido fue de 0,0638 ( $P > 0,05$ ), por lo tanto, se considera que no existen diferencias significativas entre los valores estudiados. A partir de este resultado es posible afirmar que el sistema de recolección de datos posee reproducibilidad global. Dada esta característica, se pudo determinar la participación del virus influenza dentro de las virosis respiratorias presentes en la población de riesgo estudiada.

**Cuadro 9. Detección de virus respiratorios en muestras de pacientes menores de cinco años, período 1 995-1 999**

<b>Año</b>	<b>Nº de muestras</b>	<b>VRS +</b>	<b>ADV +</b>	<b>PARA +</b>	<b>Flu A +</b>	<b>Flu B +</b>	<b>Negativos</b>
<b>1 995</b>	268	40	8	18	13	1	186
<b>1 996</b>	708	153	58	26	11	1	454
<b>1 997</b>	320	53	22	12	20	4	208
<b>1 998</b>	784	175	39	334	47	2	471
<b>1 999</b>	234	30	5	10	17	7	157
<b>Totales</b>	<b>2314</b>	<b>451</b>	<b>132</b>	<b>100</b>	<b>108</b>	<b>15</b>	<b>1476</b>

El cuadro 9 muestra que el porcentaje de aislamientos positivos varió entre el 30-40% para los distintos años. Dentro de las muestras positivas, el virus que se aisló con mayor frecuencia durante todo el período fue el VRS seguido por el ADV, Flu A y Flu B. Si bien esta frecuencia es la que podría esperarse en líneas generales, el virus que ocupó el segundo lugar fue variando según el año de estudio. Así, el ADV fue el segundo virus más importante durante las temporadas 1 996 y 1 997 mientras que en 1 998 y 1 999 el virus que circuló en segundo lugar fue influenza A. El virus parainfluenza ocupó el segundo lugar luego de VRS sólo en 1 995 en tanto que el virus influenza B se aisló en menor proporción con respecto al resto de los virus respiratorios estudiados en casi todo el período con excepción de 1 999, año en el que circuló en tercer lugar. La figura 10 diseñada en base a el número de muestras

negativas y el número de muestras positivas para cada uno de los virus estudiados muestra el predominio de los virus respiratorios detectados en el total de muestras analizadas durante el período 1 995-1 999. De acuerdo con estos resultados se puede estimar que aproximadamente el 6 % (influenza A 5% e influenza B 1%) de los casos declarados como IRAB son debidos a la infección por el virus influenza.

#### **IV.2- Indicadores de períodos epidémicos**

Se entiende por epidemia a la aparición de casos de una enfermedad en evidente exceso de lo esperado (119). Los virus influenza causan epidemias que ocurren preferentemente durante el invierno en los países de clima templado y frecuentemente se asocian a un aumento de las tasas de hospitalización y mortalidad.

El diseño de corredores o canales endémicos consiste en representar gráficamente la incidencia actual de la enfermedad sobre la incidencia histórica y, de esta forma, detectar tempranamente cifras anormalmente altas (o bajas) de casos de enfermedad en estudio. En el método de medianas y cuartiles se generan 4 zonas: una debajo del cuartil inferior o también llamada zona de éxito, una entre el cuartil inferior y la mediana o zona de seguridad, una entre la mediana y el cuartil superior o tercer cuartil llamada zona de alerta y una por encima del superior o zona epidémica.

##### **IV.2.1- Morbilidad por síndrome gripal tipo influenza, 1 995-2 001**

Varios autores han tratado de identificar indicadores sustitutos de la mortalidad que puedan obtenerse más tempranamente durante la estación invernal como ser la notificación semanal del número de casos de enfermedad tipo influenza, el registro de ausentismo escolar y laboral, el número de aislamientos víricos, etc. Estos datos permiten predecir la gravedad de una posible epidemia y proporcionar a la comunidad una forma de alerta temprana orientada a implantar medidas profilácticas y organizar los servicios de salud (120). Dado que estos datos no han sido discutidos a nivel nacional, nos pareció importante incluir en este trabajo de tesis el análisis de la morbilidad atribuible a influenza en nuestro país durante el período 1 991-2 001. En la figura 11 se presentaron los cálculos de la mediana y tercer cuartil llevados a cabo teniendo en cuenta el número de notificaciones de síndrome tipo influenza

recolectadas para cada mes durante el período 1 995-2 001 (el cual incluye el período de nuestros estudios), además de los tipos y subtipos de virus influenza que circularon cada temporada. Estos datos fueron recolectados por el SINAVE para la población total del país durante el período antes mencionado. Así, los valores obtenidos para cada mes se ordenaron de menor a mayor y en base al nuevo listado se determinaron los valores correspondientes a la mediana y al tercer cuartil respectivamente. De acuerdo al gráfico, a partir del año 1 995 todas las notificaciones registradas se ubicaron por encima de la mediana calculada para cada período y superaron lo esperado únicamente en 1 996, en la segunda mitad del año 1 997 y en 1 999, por lo que se consideran períodos epidémicos. La descripción de los tipos y subtipos virales que circularon cada año se realizará en el ítem 5.2.

#### **IV.2.2- Mortalidad por influenza y neumonías, 1 990-1 999**

Un índice útil para cuantificar el impacto del virus influenza es la medición del efecto que tiene esta enfermedad sobre la mortalidad registrada en las estadísticas vitales locales y nacionales. Con el fin de establecer si durante los períodos epidémicos se registró un exceso de muertes causada por el virus influenza, se llevó a cabo un corredor endémico de la mortalidad. Para ello, se utilizaron los datos del número de muertes por influenza y neumonías compilados por el SINAVE para la población total del país y se realizaron los cálculos de mediana y tercer cuartil durante los períodos 1 990-1 994 y 1 995-1 999 los cuales se muestran en las figuras 12 y 13, respectivamente. Ambos períodos fueron analizados por separado debido a diferencias en la notificación. Los cálculos de mediana y tercer cuartil se llevaron a cabo aplicando la misma metodología que se describió previamente en el estudio de la morbilidad. En ambas figuras se observa un exceso de muertes por influenza y neumonías únicamente durante los años 1 995 y 1 999, mientras que en el resto de los años estudiados las notificaciones coinciden o se ubican por debajo del tercer cuartil. Al comparar estos datos con las curvas de morbilidad se ve que el brote epidémico del año 1 999 coinciden con un exceso de muertes registrado en el mismo período, mientras que en 1 996 y en la segunda mitad de 1 997 no se registró un exceso de muertes a pesar de ser períodos epidémicos .

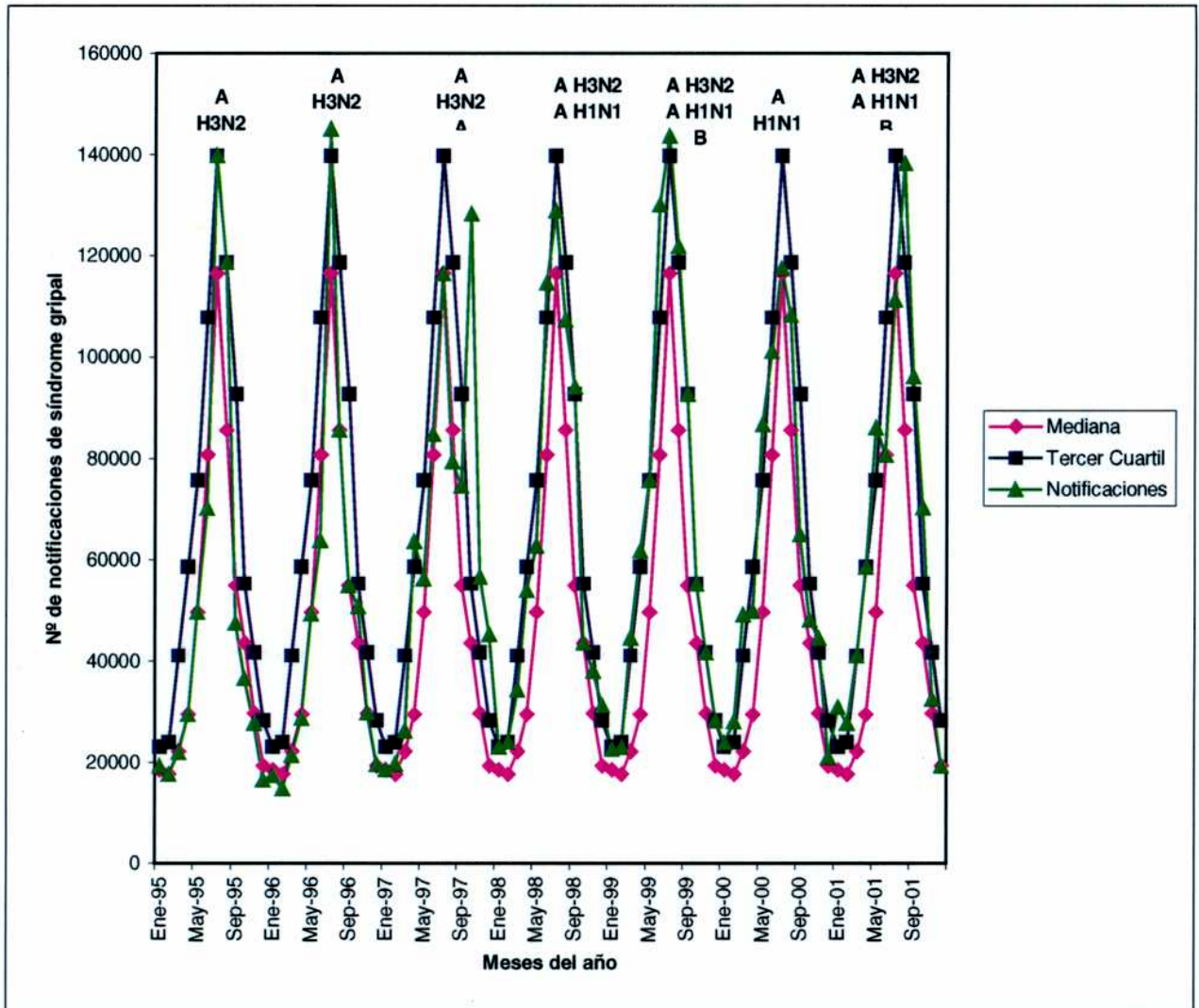
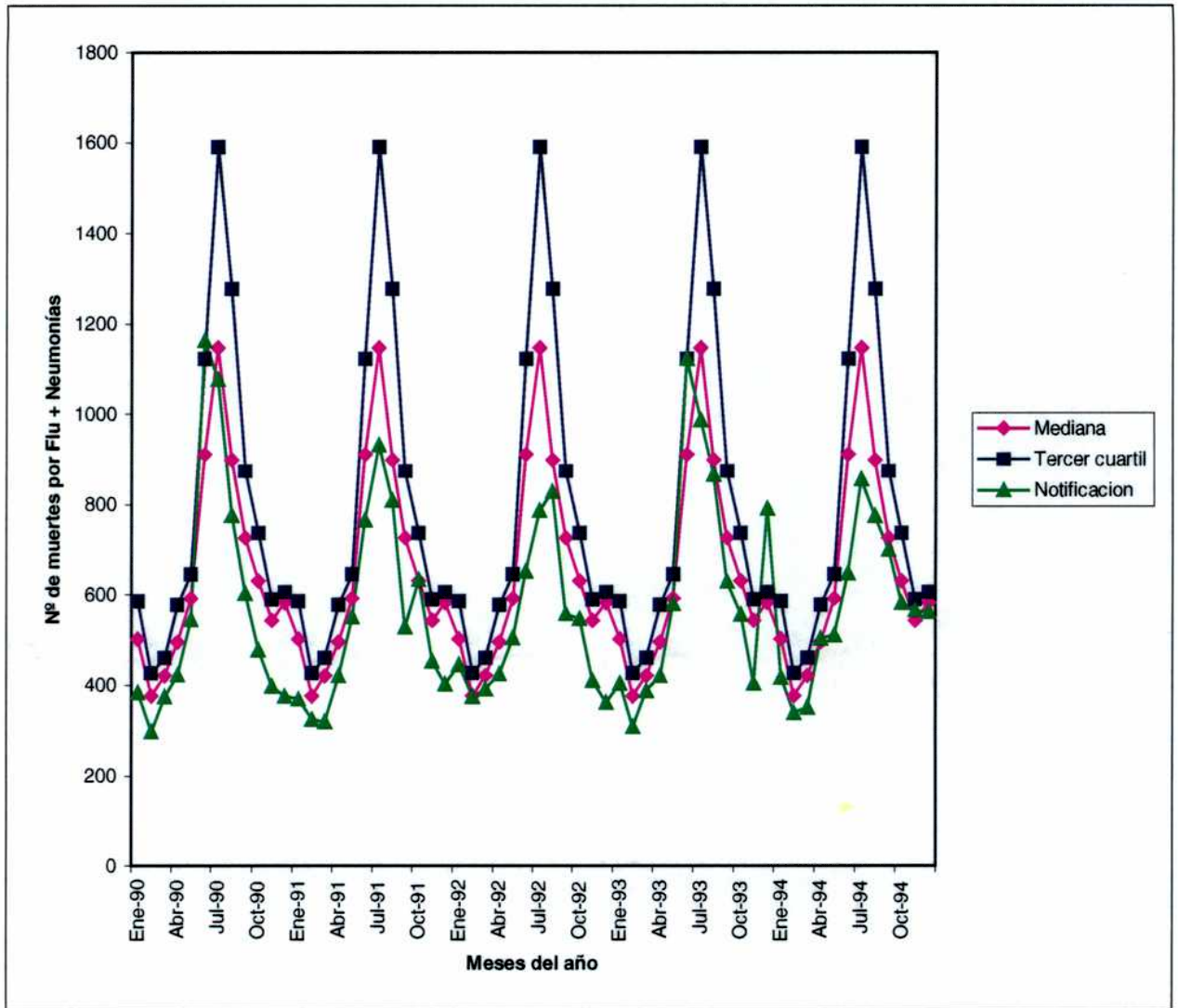
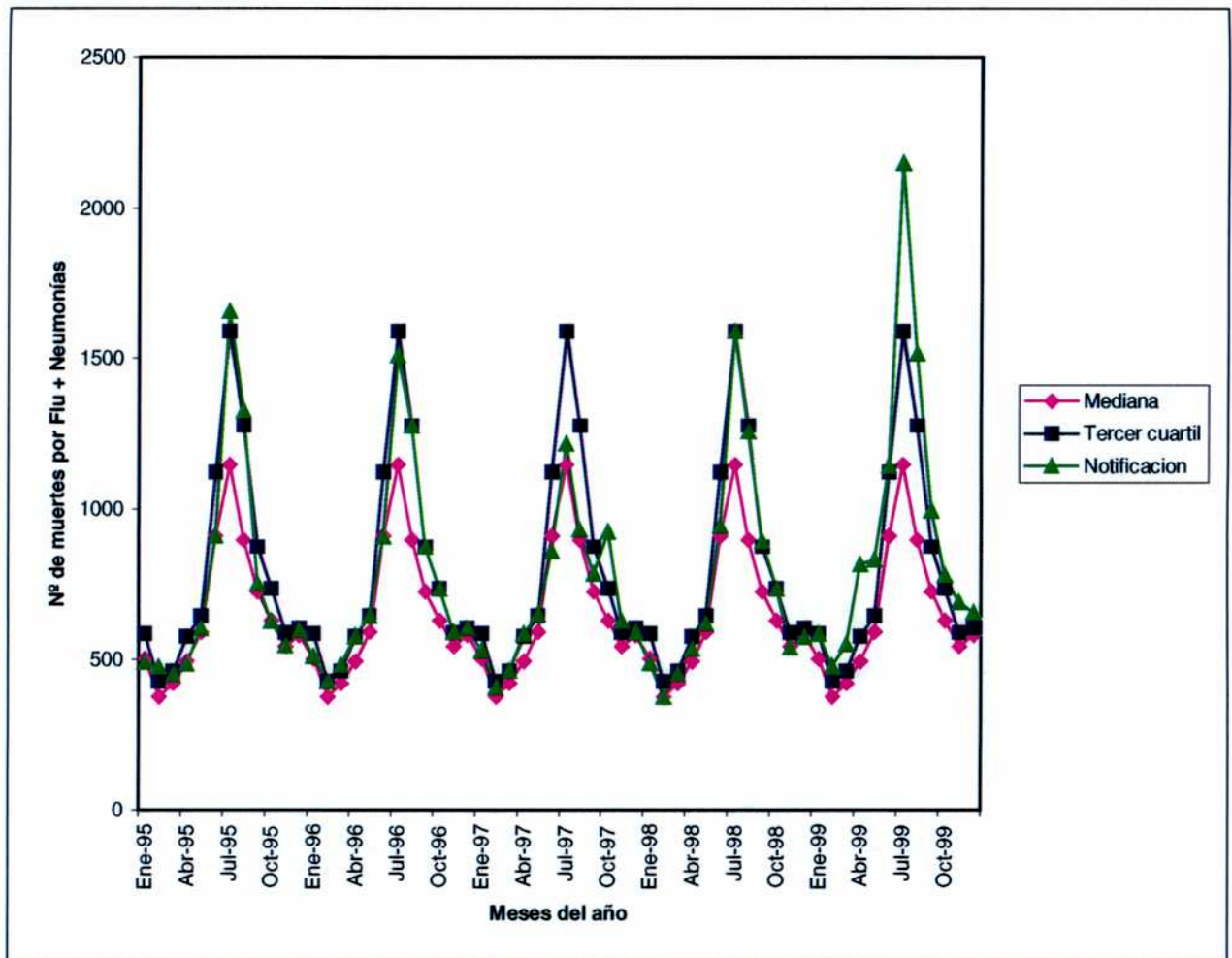


Figura 11: Número de notificaciones de síndrome tipo influenza, período 1995-2 001.



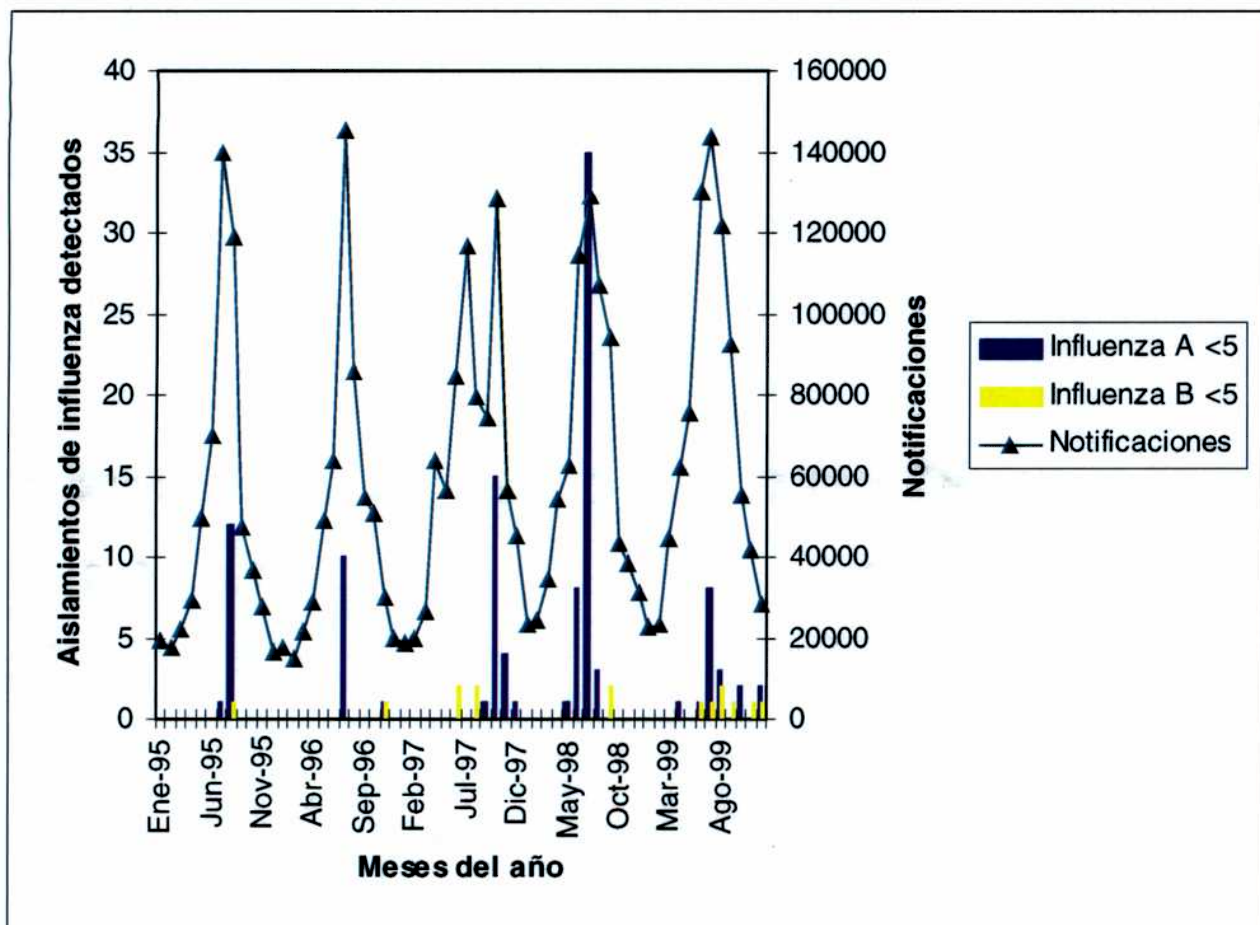
**Figura 12:** Número de muertes por influenza y neumonías en niños menores de cinco años, período 1 990- 1 994.



**Figura 13:** Número de muertes por influenza y neumonías en niños menores de cinco años, período 1 995- 1 999.

#### **IV.3- Relación entre las notificaciones al SINAVE del número de síndromes tipo influenza de la población total del país y el número de aislamientos de influenza detectados en niños menores de cinco años (años 1 995, 1 996, 1 997, 1 998 y 1 999)**

El trabajo de vigilancia epidemiológica del virus influenza a nivel nacional desarrollado en nuestro laboratorio nos permitió contar con información referida al número de aislamientos positivos de virus influenza A y B obtenidos a partir de muestras de pacientes menores de cinco años de edad durante un período de 5 años (ver parte 1.2 de resultados). Estos datos de aislamiento de virus influenza se correlacionaron con el número de notificaciones por síndrome tipo influenza para la población en general. Este gráfico se representó en las figura 14. Si analizamos la relación de notificaciones de síndrome tipo influenza con los de aislamientos positivos para los virus influenza A y B, podemos observar una coincidencia absoluta entre el máximo de las notificaciones y el número máximo de los aislamientos, especialmente de virus influenza A. En los años 1 995, 1 996, 1 998 y 1 999 se registró un único pico máximo de notificaciones que estuvo comprendido entre los meses de mayo y septiembre mientras que el mayor número de aislamientos de virus influenza A ocurrió en el mes de julio. Por su parte, los virus influenza B fueron menos preponderantes que los virus influenza A y su circulación se extendió entre los meses de junio y diciembre, dependiendo del año de estudio, coincidiendo además con la circulación de los virus influenza A. Un comportamiento diferente se detectó en 1 997. Durante ese año, la curva correspondiente a las notificaciones de síndrome tipo influenza es de tipo bimodal, con un pico en el mes de julio causado por el virus influenza B y otro pico en el mes de noviembre causado por el virus influenza A, siendo el segundo más marcado que el primero. Estos datos, sumados a lo observado en las figuras 11 y 13, indican que las notificaciones de síndrome tipo influenza generadas por la circulación de los virus influenza B se ubicaron dentro de lo esperado para esa etapa del año, mientras que los virus influenza A aislados durante la primavera dieron origen a una epidemia de gravedad considerable. La importancia de esta epidemia radica en la aparición de una nueva cepa de virus influenza A, como se detallará a continuación en el ítem 5.2 de resultados.



**Figura 14:** Relación entre las notificaciones al SINAVE de síndrome tipo influenza y el número de aislamientos positivos de virus influenza en niños menores de 5 años, período 1 995-1 999.



Finalmente, cabe resaltar que en el año 1 998 el número de aislamientos de virus influenza A se duplicó respecto al año 1 997.

Por lo tanto, es posible concluir que los máximos de la curva de morbilidad registrados durante el período 1 995-1 999 coincidieron con la detección viral de laboratorio y que los virus influenza A circularon en mayor proporción respecto de los virus influenza B para cada año durante todo el período de estudio.

#### **IV.4- Origen de las cepas de virus influenza utilizadas para su posterior estudio antigénico y genómico**

La caracterización antigénica y genómica de las cepas de virus influenza que circularon en nuestro país y en otros países del Cono Sur durante el período de estudio se llevó a cabo, por un lado, a partir de muestras clínicas con diagnóstico positivo para el virus influenza y, por otro lado, a partir de sobrenadantes de cultivos celulares en los cuales se había logrado amplificar la cepa viral. El número de muestras con diagnóstico positivo para el virus influenza y el número de cepas virales estudiadas durante el período de tiempo 1 995-2 002 se muestran en los cuadros 10 y 11, respectivamente.

**Cuadro 10. Número de muestras analizadas con diagnóstico positivo para el virus influenza**

<b>País</b>	<b>Nº total de muestras</b>	<b>Período</b>	<b>Nº de muestras Flu A + por IF</b>	<b>Nº de muestras Flu B + por IF</b>
<b>Argentina</b>	8054	1 995-2 002	2218	351
<b>Uruguay</b>	60	2 000	4	0
<b>Totales</b>	<b>8114</b>		<b>2222</b>	<b>351</b>

Se puede observar en el cuadro 10 que el número de aislamientos positivos tanto para Flu A como para Flu B en comparación al número total de muestras procesadas resultó relativamente bajo. Esto se debe a la heterogeneidad de las muestras recibidas provenientes de distintos orígenes tales como: pacientes pediátricos internados con IRAB, pacientes pediátricos y adultos ambulatorios y grupos semi-cerrados como obreros fabriles, personal de la Fuerzas Armadas y otros que no siempre respetaron

los protocolos de conservación de las muestras clínicas previo a su envío al laboratorio.

A principios del año 2 001 se estudiaron, además, muestras clínicas que no poseían diagnóstico virológico tomadas a partir de pacientes entre 2 y 63 años de edad las que habían sido recolectadas durante todo el año 2 000 en el policlínico El Arbolito-La Teja de la ciudad de Montevideo, Uruguay.

**Cuadro 11. Número de cepas de virus influenza estudiadas**

<b>País</b>	<b>Nº total de cepas</b>	<b>Período</b>	<b>Nº de muestras Flu A + por IF</b>	<b>Nº de muestras Flu B + por IF</b>
<b>Brasil</b>	77	2 001-2 002	25	48
<b>Paraguay</b>	56	1 999-2 001	26	6
<b>Totales</b>	<b>133</b>		<b>51</b>	<b>54</b>

Las cepas de virus influenza provenientes de Brasil fueron recuperadas en cultivos celulares por el laboratorio Fleury de San Pablo a partir de muestras clínicas tomadas de pacientes de 6 a 36 meses de edad que previamente habían recibido la vacuna antigripal. Por otra parte, el Centro Nacional de Referencia de Asunción, Paraguay, envió algunas cepas de virus influenza a nuestro laboratorio durante los años 1 999, 2 000 y 2 001 para su posterior análisis.

#### **IV.5- Cepas predominantes**

##### **IV.5.1- Número de subtipificaciones, cepas virales recuperadas en cultivo y caracterizaciones antigénicas de las cepas de virus influenza argentinas, período 1 995-2 002**

El análisis antigénico y genómico de las cepas de virus influenza fue llevado a cabo únicamente a partir de algunas de las cepas que pudieron ser recuperadas en cultivo. El número de cepas amplificadas en cultivo y el número de cepas incluidas en este estudio se modificó cada año y dependió de varios factores como ser la conservación de las muestras clínicas, la sensibilidad de los cultivos celulares, la disponibilidad de reactivos, etc. En el cuadro 12 se muestran el número de cepas de

virus influenza A y B recuperadas en cultivo, el número de cepas influenza A subtipificadas según su composición de HA en H1 y H3 y el total de cepas caracterizadas antigénicamente.

**Cuadro 12. Número de cepas de virus influenza A y B recuperadas en cultivo, subtipificadas con inmunosuero de oveja y caracterizadas antigénicamente con inmunosueros de hurón**

Año	N° de cepas Flu A recuperadas en cultivo	N° de cepas Flu B recuperadas en cultivo	N° de cepas subtipificadas con sueros de oveja			N° de cepas FLU A y B caracterizadas con sueros de hurón	
			H3	H1	B	Flu A	Flu B
1 995	6	2	DD*	DD*	DD*	6	2
1 996	27	0	23	1	0	6	0
1 997	38	17	9	12	17	8	0
1 998	259	0	27	0	0	37	0
1 999	152	18	60	4	0	111	17
2 000	55	6	0	4	0	50	5
2 001	415	85	1	0	0	406	85
2 002	18	135	0	0	0	18	135
<b>Totales</b>	<b>970</b>	<b>263</b>	<b>120</b>	<b>21</b>	<b>17</b>	<b>644</b>	<b>242</b>

\*DD: dato desconocido.

Los datos del cuadro muestran diferencias entre el número de cepas de virus influenza A y B recuperadas en cultivo para los distintos años, se observa que el número de muestras analizadas aumentó con el tiempo debido en gran parte al mejoramiento del sistema de envío y recolección de muestras así como a la prevalencia anual del virus.

#### *Subtipificación por RT-PCR semi anidada*

La técnica de RT-PCR semi anidada se llevó a cabo sólo a partir de algunos especímenes (muestras clínicas y sobrenadantes de cultivo) con diagnóstico positivo para el virus influenza A a partir de los cuales no se logró recuperar el título de HA apropiado para llevar a cabo la caracterización antigénica por IHA. El total de especímenes estudiados y los resultados de la subtipificación obtenidos se muestran en el cuadro 13.

**Cuadro 13. Muestras clínicas y sobrenadantes de cultivos subtipificados mediante la técnica de RT-PCR semi anidada período 1 997-2 002**

Año	Nº de especímenes testeados	Subtipificación por RT-PCR semi anidada		
		H1	H3	Neg.
1 997	6	1	2	3
1 998	15	0	15	0
1 999	17	2	8	7
2 000	0	-	-	-
2 001	0	-	-	-
2 002	21	4	2	15
<b>Totales</b>	<b>59</b>	<b>7</b>	<b>27</b>	<b>25</b>

De acuerdo a los datos de este cuadro es posible concluir que, si bien esta metodología se implementó sólo en algunos casos, su aplicación permitió conocer el subtipo viral (H1 o H3) al cual pertenecían el 58% de los especímenes con diagnóstico positivo para el virus influenza A estudiados. Por lo tanto, a pesar de no contar con la cepa viral recuperada en cultivos celulares, mediante esta técnica fue posible conocer si el subtipo al cual pertenecían estas cepas se asemejaba o no al subtipo de los virus influenza A circulantes en otros lugares de la Argentina y la región, para el mismo año.

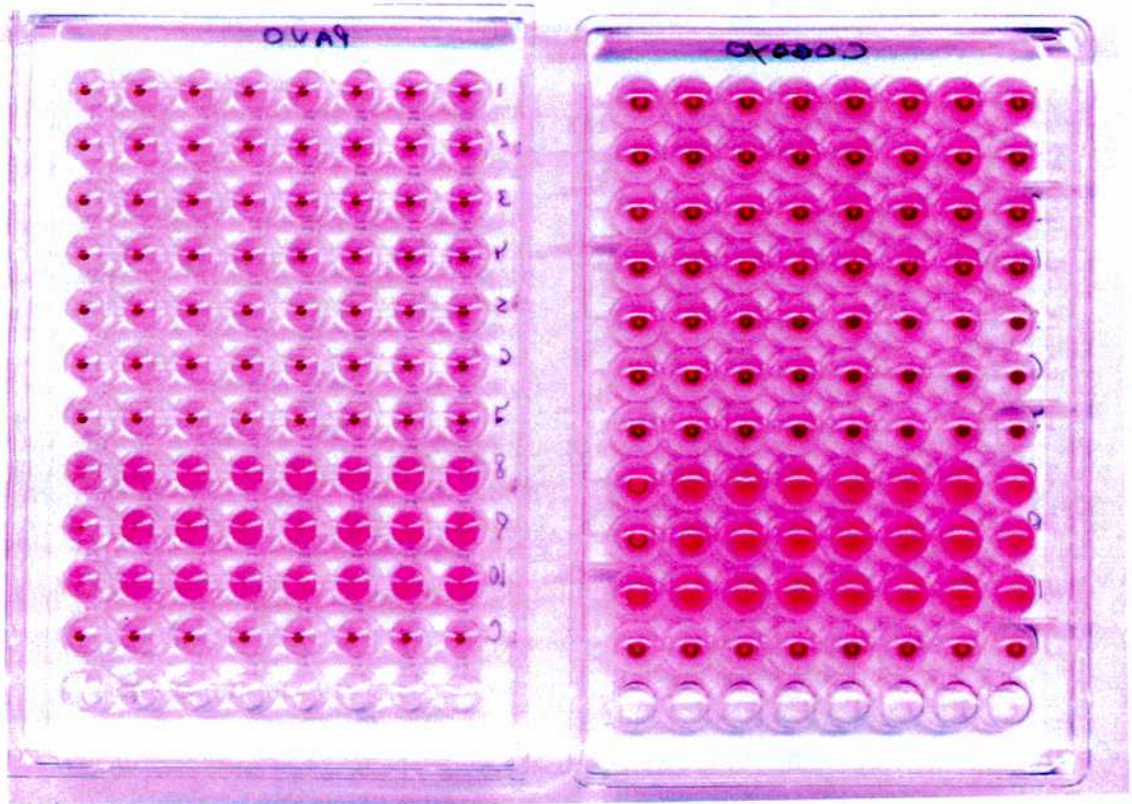
#### **IV.5.2- Resultados de la caracterización antigénica de las cepas de virus influenza aisladas en la Argentina y su comparación con cepas vacunales**

La proteína HA del virus influenza es el principal blanco contra la cual se dirigen la mayoría de los anticuerpos neutralizantes. El virus es capaz de evadir la respuesta inmunológica del huésped debido a la selección de nuevas cepas que adquieren mutaciones en la HA que dejan de ser reconocidas por los anticuerpos. El test de IHA permite llevar a cabo la caracterización antigénica de las cepas circulantes al enfrentarlas con inmunoseros dirigidos contra distintas cepas de referencia.

En la figura 15 se muestra el resultado de la comparación entre las técnicas de HA utilizando una suspensión de GR de cobayo al 0,75% y placas con fondo en U versus una suspensión de GR de pavo al 0,5% y placas con fondo en V. De acuerdo a

**GR de PAVO**

**GR de COBAYO**



**Figura 15:** Ha utilizando GR de pavo vs GR de cobayo

lo observado, la lectura es más confiable al utilizar glóbulos rojos de pavo, como lo indica también la bibliografía. Debido a ello, se decidió utilizar sangre de pavo tanto en las técnicas de Ha como de IHA.

La técnica de IHA nos permitió identificar cuáles fueron las cepas de virus influenza A y B que circularon en la Argentina durante el período 1 995-2 002. Estos datos se muestran en el cuadro 14.

**Cuadro 14. Cepas de virus influenza A y B que circularon en la Argentina, período 1 995-2 002**

Cepas virales	1 995	1 996	1 997	1 998	1 999	2 000	2 001	2 002
<b>Influenza A (H3N2)</b>								
A/Johannesburg/33/94	■							
A/Wuhan/359/95		■						
A/Sydney/5/97			■	■	■			
A/Panamá/2007/99							■	■
<b>Influenza A (H1N1)</b>								
A/Texas/36/91		■						
A/Bayern/7/95			■	■	■			
A/New Caledonia/20/99						■	■	■
<b>Influenza B</b>								
B/Beijing/184/93	■		■		■			
B/Yamanashi/166/98						■		
B/Sichuán/379/99							■	
B/Shizuoka/15/01							■	
B/Hong Kong/330/01								■
B/Hong Kong/1351/02								■

La presencia de virus influenza A se encontró durante todo el período y, de acuerdo a lo observado para este tipo viral, la aparición de una nueva variante antigénica provocó el reemplazo de la variante antigénica anterior en todos los casos. Dentro de los virus influenza A, los subtipos H1N1 y H3N2 circularon durante todos

los años analizados con excepción de 1 995 y 2 000, respectivamente. Por su parte, los virus influenza B no lograron ser recuperados en cultivo durante los años 1 996 y 1 998, a pesar de detectar la circulación del virus durante estos dos años mediante la técnica de diagnóstico rápido y, a diferencia de los virus influenza A, se observó la co-circulación de variantes antigénicas diferentes en el mismo año.

Debido a la importancia que reviste para la cobertura de la población el uso de vacunas apropiadas, en el cuadro 15 se muestran las cepas circulantes por año y la composición de la vacuna para el mismo año. Además, se incluye el título de neutralización cruzada de los sueros preparados con cepas vacunales contra las cepas de virus circulantes.

**Cuadro 15. Títulos de IHA obtenidos al enfrentar cepas de virus influenza A y B argentinas con sueros de hurón cepa-específica, período 1 995-2 002**

Año	Cepa circulante	Cepa vacunal	Antisuero anti cepa vacunal	
			Antígeno: Virus circulante	Antígeno: Virus vacunal
1 995	A/Johannesburg/33/94 (H3N2)	A/Shangdong/9/93 (H3N2)	80	640
	A/Hong Kong/1/94 (H3N2)		80	640
	B/Beijing/184/93	B/Panamá/45/90	40	160
1 996	A/Wuhan/359/95 (H3N2)	A/Johannesburg/33/94 (H3N2)	40	640
	A/Texas/36/91 (H1N1)	A/Singapore/6/86 (H1N1)	1280	1280
1 997	A/Sydney/5/97 (H3N2)	A/Wuhan/359/95 (H3N2)	160	1280
	A/Bayern/7/95 (H1N1)	A/Singapore/6/86 (H1N1)	640	1280
	B/Beijing/184/93	B/Beijing/184/93	320	320
1 998	A/Sydney/5/97 (H3N2)	A/Wuhan/359/95 (H3N2)	160	1280
	A/Bayern/7/95 (H1N1)	A/Bayern/7/95 (H1N1)	2560	2560
1 999	A/Sydney/5/97 (H3N2)	A/Sydney/5/97 (H3N2)	1280	1280
	A/Bayern/7/95 (H1N1)	A/Beijing/262/95 (H1N1)	80	2560
	B/Beijing/184/93	B/Beijing/184/93	320	320
2 000	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	640	640
	B/Yamanashi/166/98	B/Yamanashi/166/98	640	640
2 001	A/Panamá/2007/99 (H3N2)	A/Panamá/2007/99 (H3N2)	640	640
	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	640	640
	B/Sichuán/379/99	B/Sichuán/379/99	640	640
	B/Shizuoka/15/01		80	640
2 002	A/Panamá/2007/99 (H3N2)	A/Panamá/2007/99 (H3N2)	640	640
	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	640	640
	B/Hong Kong/330/01	B/Sichuán/379/99	<20	640
	B/Hong Kong/1 351/02		<20	640

En este cuadro no se incluyen todas las cepas vacunales que se aplicaron durante el período de estudio sino únicamente aquellas que se corresponden con las cepas circulantes aisladas para cada año.

Los títulos de IHA obtenidos con inmunosueros de hurón mostraron diferencias de 2 a 5 diluciones entre las cepas circulantes y las vacunales no relacionadas antigénicamente. Comparando los títulos de anticuerpos frente a las cepas homólogas y heterólogas fue posible establecer la relación antigénica entre las cepas circulantes en la Argentina y las correspondientes cepas vacunales. Estos datos se muestran en el cuadro 16.

**Cuadro 16. Grado de similitud antigénica entre las cepas de virus influenza A y B circulantes en la Argentina y las cepas vacunales, durante el período 1 995-2 002**

<b>Año</b>	<b>Caracterización antigénica</b>	<b>Cepas vacunales</b>	<b>Cercanamente relacionadas</b>
<b>1 995</b>	A/Johannesburg/33/94 (H3N2) A/Hong Kong/1/94 (H3N2) - B/Beijing/184/93	A/Shangdong/7/93 (H3N2)  A/Singapore/6/86 (H1N1) B/Panamá/45/90	No No - No
<b>1 996</b>	A/Wuhan/359/95 (H3N2) A/Texas/36/91 (H1N1) -	A/Johannesburg/33/94 (H3N2) A/Singapore/6/86 (H1N1) B/Beijing/184/93	No Si -
<b>1 997</b>	A/Sydney/5/97 (H3N2) A/Bayern/7/95 (H1N1) B/Beijing/184/93	A/Wuhan/359/95 (H3N2) A/Singapore/6/86 (H1N1) B/Beijing/184/93	No Si Si
<b>1 998</b>	A/Sydney/5/97 (H3N2) A/Bayer/7/95 (H1N1) -	A/Wuhan/359/95 (H3N2) A/Bayern/7/95 (H1N1) B/Beijing/184/93	No Si -
<b>1 999</b>	A/Sydney/5/97(H3N2) A/Bayern/7/95 (H1N1) B/Beijing/184/93	A/Sydney/5/97 (H3N2) A/Beijing/262/95 (H1N1) B/Beijing/184/93	Si No Si
<b>2 000</b>	- A/New Caledonia/20/9 (H1N1) B/Beijing/184/93	A/Sydney/5/97 (H3N2) A/New Caledonia/20/99 (H1N1) B/Beijing/184/93 o Yamanashi	- Si Si
<b>2 001</b>	A/Panamá/2007/99 (H3N2) A/New Caledonia/20/9 (H1N1) B/Sichuán/379/99 B/Shizuoka/15/01	A/Panamá/2007/99 (H3N2) A/New Caledonia/20/99 (H1N1) B/Sichuán/379/99	Si Si Si No
<b>2 002</b>	A/Panamá/2007/99 (H3N2) A/New Caledonia/20/99 (H1N1) B/Hong Kong/330/01 B/Hong Kong/1351/02	A/Panamá/2007/99 (H3N2) A/New Caledonia/20/99 (H1N1) B/Sichuán/379/99	Si Si No No



Se considera que un aislamiento está cercanamente relacionado, desde el punto de vista antigénico, a una cepa de referencia cuando al enfrentarse al inmunosuero de referencia reacciona con igual título que la cepa de referencia o difiere en hasta dos diluciones. Se considera el error de la técnica de IHA en  $\pm$  una dilución. Nótese que teniendo en cuenta estas consideraciones las cepas de campo influenza A subtipo H3N2 no se relacionaron cercanamente, desde el punto de vista antigénico con sus correspondientes cepas vacunales en los primeros años de este estudio y recién comenzaron a hacerlo a partir del año 1999.

Por otro lado, los virus influenza A subtipo H1N1 que circularon en 1999 tampoco se relacionaron de modo cercano con sus correspondientes cepas vacunales. Para el caso de los virus influenza B, las cepas circulantes no se relacionaron cercanamente con las vacunales en 1995 y en el 2002, y sí lo hicieron en forma parcial en el año 2001, registrándose tanto en el año 2001 como en el año 2002 una co-circulación de varias cepas. Si bien se considera que cuanto mayor es la similitud entre la cepa circulante y la cepa vacunal, mayor será la protección conferida por ésta a la población vacunada, la protección sería parcial en aquellos casos en los cuales las cepas circulantes compartan epitopes comunes con las cepas vacunales a pesar de no estar cercanamente relacionadas antigénicamente.

#### **IV.5.3- Número de subtipificaciones, aislamientos y caracterización antigénica de las cepas de virus influenza obtenidas en los países de la región, período 1999-2002**

Como se dijo anteriormente, además de las cepas argentinas, se llevó a cabo un análisis similar con las cepas de virus influenza provenientes de Brasil, Uruguay y Paraguay. En el cuadro 17 se muestra el número de cepas que se logró recuperar en cultivo celular del total de cepas recibidas provenientes de Brasil y los resultados de su caracterización antigénica.

**Cuadro 17. Resultados del aislamiento y caracterización antigénica de cepas provenientes de Brasil, período 2 001-2 002**

Año	Nº de cepas recibidas	Nº de cepas recuperadas		Caracterización antigénica con sueros de hurón
		Flu A	Flu B	
2 001	23	1	0	A/Panamá/2007/99 (H3N2)
2 002	54	6	38	A/Panamá/2007/99 (H3N2) A/New Caledonia/20/99 (H1N1) B/Shizuoka/15/01 B/Hong Kong/1351/02
<b>Totales</b>	<b>77</b>	<b>7</b>	<b>38</b>	

Luego de inocular en células, se logró amplificar el 58% de las cepas de virus influenza A y B recibidas. Si bien en el año 2 001 se analizó un único aislamiento, el estudio con inmunosueros de hurón sirvió para demostrar que las cepas de virus influenza A que circularon en Brasil durante los años 2 001 y 2 002 presentaban características antigénicas similares a las cepas aisladas en la Argentina durante esos dos años. En el caso de los virus influenza B, las cepas son similares a la variante Shizuoka que sólo fueron detectadas en la Argentina en el año 2 001 como los datos de Brasil son muy escasos no sabemos si también estaba presente en el 2 001 y continuó circulando en el 2 002.

En el cuadro 18 se muestran los resultados obtenidos con los aislamientos de Uruguay en el año 2 000.

**Cuadro 18. Resultados del aislamiento y la caracterización antigénica de cepas provenientes de Uruguay, año 2 000**

Año	Número de muestras Flu A + por IF	Nº de cepas recuperadas	Caracterización antigénica con sueros de hurón
2 000	4	4	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)

En este caso se logró recuperar en cultivo el 100% de las muestras con diagnóstico positivo para influenza A. Así como se observó para Argentina en el año 2 000, todas las cepas caracterizadas de Uruguay pertenecieron al subtipo H1N1 y fueron similares a la cepa A/New Caledonia/20/99.

Los resultados obtenidos para las cepas de Paraguay se presentan en el cuadro 19.

**Cuadro 19. Resultados del aislamiento y la caracterización antigénica de cepas provenientes de Paraguay, período 1 999-2 001**

<b>Año</b>	<b>Número de cepas recibidas</b>	<b>Nº de cepas recuperadas</b>	<b>Caracterización antigénica con sueros de hurón</b>
<b>1 999</b>	22	0	No se realizó
<b>2 000</b>	11	5	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)
<b>2 001</b>	23	1	A/Panamá/2.007/99 (H3N2)
<b>Totales</b>	<b>56</b>	<b>6</b>	

A pesar de que el porcentaje de recuperación en cultivo de cepas provenientes de Paraguay fue mucho menor con respecto al obtenido para Brasil y Uruguay (11%), el estudio antigénico de los aislamientos recuperados demostró que las cepas paraguayas presentaron características antigénicas similares a las argentinas para ese período de tiempo.

Estos resultados demuestran, que no sólo existe una circulación de cepas homólogas entre las distintas provincias argentinas para cada temporada sino que además, en otros países de la misma región, las cepas circulantes poseen características antigénicas similares entre sí y con las cepas de nuestro país.

#### **IV.5.4- Resultados del análisis filogenético de las cepas de virus influenza A que circularon en la Argentina y en otros países de la región durante el período 1 995-2 002**

##### **IV.5.4.1- Estudio molecular de la HA viral**

En el cuadro 20 figuran los nombres y caracterización antigénica de los aislamientos de campo realizados en distintas localidades de la república Argentina, Uruguay y Paraguay agrupadas según el año de aislamiento. Se trata de un total de siete cepas para el año 1 995 pertenecientes al subtipo H3N2; seis cepas del año 1 996 subtipo H1N1; dos cepas subtipo H3N2, tres cepas subtipo H1N1 y una cepa de influenza B del año 1 997; once cepas del año 1 998 subtipo H3N2; siete cepas subtipo H3N2, tres cepas subtipo H1N1 y seis cepas de influenza B del año 1 999; once cepas

subtipo H1N1 y dos cepas de influenza B del año 2 000; tres cepas subtipo H3N2 y una cepa de virus influenza B del año 2 001 y seis cepas de virus influenza B del año 2 002.

**Cuadro 20. Nomenclatura de las cepas de campo secuenciadas para cada año de estudio y su relación con las cepas de referencia utilizadas en la reacción de IHA**

<b>Año</b>	<b>Cepa de campo secuenciadas</b>	<b>Antigénicamente similar a</b>
1 995	A/Buenos Aires/4102/95	A/Johannesburg/33/94 (H3N2)
1 995	A/Buenos Aires/4065/95	"
1 995	A/Buenos Aires/4064/95	"
1 995	A/Buenos Aires/4098/95	"
1 995	A/Buenos Aires/4057/95	"
1 995	A/Buenos Aires/4084/95	"
1 995	B/Buenos Aires/9/95	B/Beijing/184/93
1 996	A/Buenos Aires/39/96	A/Wuhan/359/95 (H1N1)
1 996	A/Buenos Aires/4459/96	"
1 996	A/Buenos Aires/4534/96	"
1 996	A/Buenos Aires/4559/96	"
1 996	A/Buenos Aires/37/96	"
1 996	A/Buenos Aires/4634/96	"
1 997	A/SantaFe/5456/97	A/Sydney/5/97 (H3N2)
1 997	A/La Plata/12089/97	"
1 997	A/Buenos Aires/A64/97	A/Bayern/7/95 (H1N1)
1 997	A/Buenos Aires/T118/97	"
1 997	A/Buenos Aires/T114/97	"
1 997	B/Buenos Aires/SW16/97	B/Beijing/184/93
1 998	A/Buenos Aires/V235/98	A/Sydney/5/97 (H3N2)
1 998	A/Ushuaia/R13/98	"
1 998	A/Buenos Aires/T28/98	"
1 998	A/Neuquén/V541/98	"
1 998	A/Salta/V793/98	"
1 998	A/Córdoba/V391/98	"
1 998	A/Tucumán/V425/98	"
1 998	A/Buenos Aires/V191/98	"
1 998	A/Ushuaia/R254/98	"
1 998	A/Ushuaia/274/98	"
1 998	A/Córdoba/V185/98	"

1 999	A/Buenos Aires/M14/99	"
1 999	A/Misiones/195/99	"
1 999	A/Chaco/140/99	"
1 999	A/Buenos Aires/M6/99	"
1 999	A/Buenos Aires/M7/99	"
1 999	A/Mendoza/135/99	"
1 999	A/La Plata/12089/99	"
1 999	A/Buenos Aires/344/99	A/Bayern/7/95 (H1N1)
1 999	A/Buenos Aires/6177/99	"
1 999	A/Neuquén/1381/99	"
1 999	B/Buenos Aires/VL518/99	B/Beijing/184/93
1 999	B/Ushuaia/15732/99	"
1 999	B/Mar del Plata/VL373/99	"
1 999	B/Mar del Plata/VL385/99	"
1 999	B/Mar del Plata/ 595/99	"
1 999	B/Chaco/366/99	"
2 000	A/Buenos Aires/P27D1/00	A/Caledonia/20/99 (H1N1)
2 000	A/Neuquén/P3D1/00	"
2 000	A/Santa Fe/R98/00	"
2 000	A/Mar del Plata/235/00	"
2 000	A/Mendoza/Vj636/00	"
2 000	A/Chaco/R112/00	"
2 000	A/Uruguay/37/00	"
2 000	A/Uruguay/38/00	"
2 000	A/Uruguay/42/00	"
2 000	A/Uruguay/33/00	"
2 000	A/Paraguay/CS24/00	"
2 000	B/Chaco/R113/00	B/Yamanashi/166/98
2 000	B/Buenos Aires/161/00	"
2 001	A/Neuquén/1016002/01	"
2 001	A/Chaco/R538/01	A/Panamá/2007/99 (H3N2)
2 001	A/Buenos Aires/01	"
2 001	A/Neuquen/2260/01	"
2 002	B/Buenos Aires/MC1/02	B/Hong Kong/330/00
2 002	B/Buenos Aires/MC4/02	"
2 002	B/Buenos Aires/7640/02	"
2 002	B/Buenos Aires/1025461/02	"
2 002	B/La Plata/1025279/02	"
2 002	B/Buenos Aires/80397/02	"

La mayoría de las mutaciones que experimentan los virus de la gripe como consecuencia de la presencia de anticuerpos neutralizantes en la población, ocurren generalmente en el dominio globular de la porción HA<sub>1</sub> de la HA, alrededor del sitio de unión al receptor. Nosotros realizamos el estudio genómico basado en la amplificación y secuenciación de la porción HA<sub>1</sub> de la HA viral (984 nt.) de algunas cepas locales y regionales para poder establecer así una relación con lo observado en el estudio antigénico.

Los cambios aminoacídicos más relevantes observados en el alineamiento de secuencias basados en la porción HA<sub>1</sub> de la HA viral de las cepas influenza A (H3N2) donde se comparan cepas vacunales con algunas cepas circulantes para cada año se muestran en el cuadro 21. Las diferencias nucleotídicas entre las cepas estudiadas y las vacunales también se reflejan en el árbol de filogenia basado en la porción HA<sub>1</sub> de la HA viral (ver figura 16). En líneas generales es posible observar que, con respecto al árbol de filogenia basado en la secuencia nucleotídica de la porción HA<sub>1</sub> de la HA de las cepas de virus influenza A (H3N2), las cepas aisladas en la Argentina hasta el año 1998 inclusive forman grupos genómicos diferentes discriminados por año. A su vez, cada uno de estos grupos está representado por una cepa de referencia. A partir del año 1999 y hasta 2001 las diferencias nucleotídicas entre las cepas circulantes aisladas fueron menores por lo que todas ellas se ubican en una misma rama de filogenia.

Un análisis similar realizado para las cepas de virus influenza A (H1N1) se muestra en el cuadro 22 y en la figura 17, para este subtipo se observa la existencia de dos linajes diferentes representados cada uno por dos cepas de referencia, la A/Bayern/7/95 y la A/Beijing/262/96. En este árbol se muestra que las cepas que circularon en la Argentina y en la región hasta el año 1999 inclusive pertenecen al linaje representado por la cepa Bayern mientras que las posteriores al año 1999 pertenecen al linaje Beijing. Algo similar se desprende del análisis del árbol construido para las cepas de virus influenza B (cuadro 23 y figura 18). Se observa que las cepas aisladas en la Argentina hasta el año 2000 inclusive pertenecen al linaje representado por la cepa B/Yamagata/16/88 mientras que las posteriores se incluyen dentro del linaje representado por la cepa A/Hong Kong/335/01.

**Cuadro 21. Alineamiento de aminoácidos basado en la porción HA<sub>1</sub> de la HA de virus influenza A (H3N2), 1 995-2 002**

Shang793	OKLPONDNST	ATLCLGHGHA	V	PNGLIVKTKIT	NDQIEVTNAT	ELVQSSSTOR	ICGSPHRIID	GRNCTLIDAL	LGDPHCDGFG
HogKg194	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Joha3394	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Wuh35995	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Thess195	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SA114796	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Sydne597	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Buc22699	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Mosci099	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Buc22999	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pa200799	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA410295	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA406595	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA406495	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA409895	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA405795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA408495	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BsAs3996	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA445996	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA453496	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA455996	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BsAs3796	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA463496	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SF545697	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
LP208997	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BAV23598	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ushr1398	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BsAT2898	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NeuV54198	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Sav79398	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CoV39198	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Tuv42598	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BAV19198	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
UsR25498	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ush27498	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BsAM1499	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Mis19599	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Cha14099	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BsAsM699	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BsAsM799	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Men13599	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
N1600201	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
ChRS3801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ne226001	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BsA72201	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

Las cepas de referencia figuran en negrita

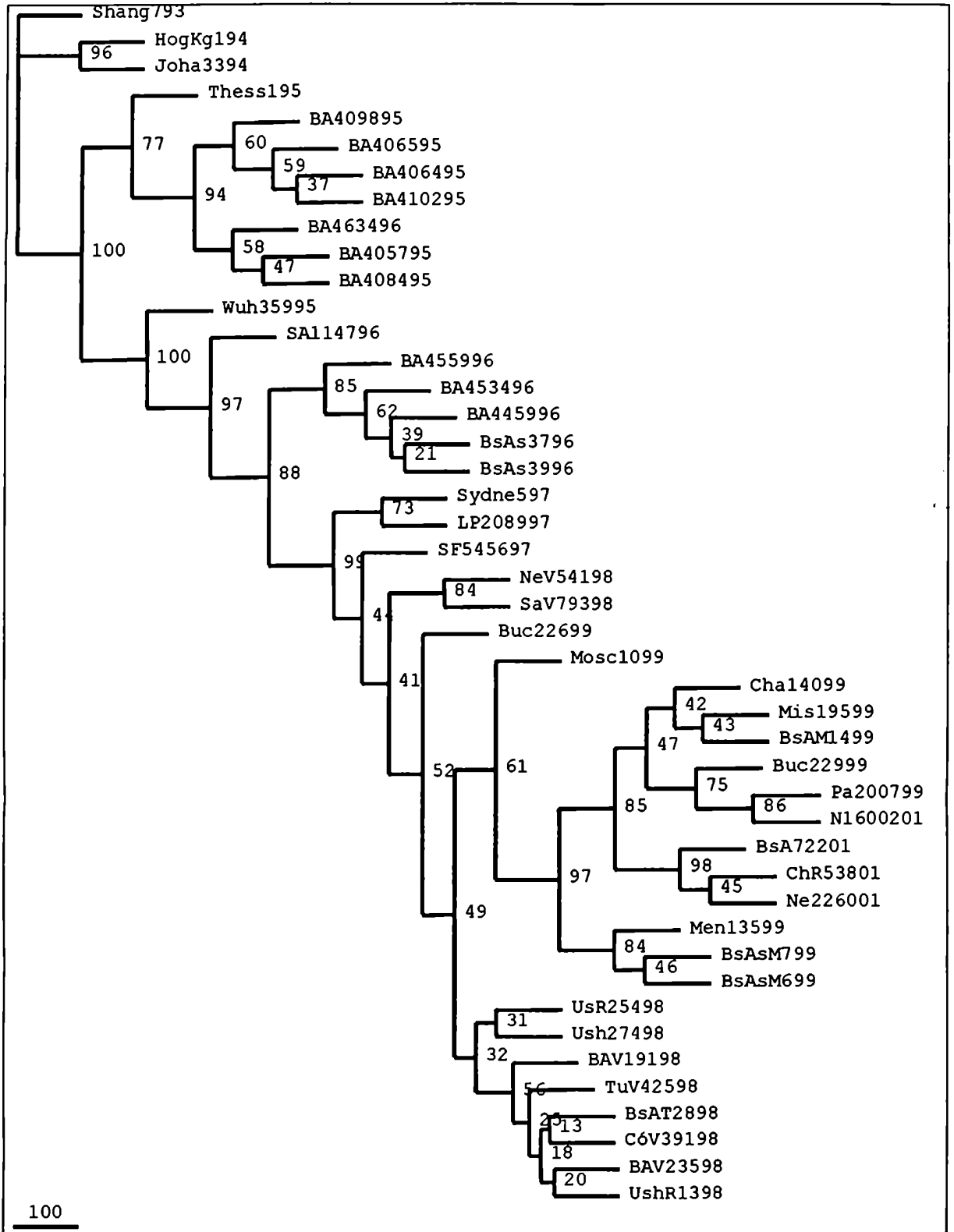
Shang793 NKEWDLFYER SKAYSNCYPY DVPDIASIRS LVASSGTLEF INEDFNWIGV AQDGGSYACK RGSVNSFFSR LNWLHQLKYK  
 HogKg194 .....N.....K.....  
 Joha3394 .....N.....K.....  
 Muh35995 .....G.....T.....  
 Thess195 .....G.....K.....  
 SA114796 .....S.....T.....K.....  
 Sydne597 .....S.....T.....IK.....Q.....  
 Buc22699 .....S.....T.....IK.....Q.....  
 Mosc1099 .....S.....T.....IK.....Q.....  
 Buc22999 .....S.....T.....NK.....Q.....  
 Pa200799 .....S.....T.....NK.....Q.....  
 BA410295 .....G.....K.....  
 BA406595 .....G.....K.....  
 BA406495 .....G.....K.....  
 BA409895 .....G.....K.....  
 BA405795 .....G.....K.....  
 BA408495 .....G.....K.....  
 BsAs3996 .....S.....T.....  
 BA445996 .....S.....T.....  
 BA453496 .....S.....T.....  
 BA455996 .....S.....T.....  
 BsAs3796 .....S.....T.....  
 BA463496 .....G.....K.....  
 SF545697 .....S.....T.....Q.K.....  
 LP208997 .....S.....T.....Q.K.....  
 BAV23598 .....S.....T.....Q.K.....  
 UshR1398 .....S.....T.....Q.K.....  
 BsAT2898 .....S.....T.....Q.K.....  
 NeuV54198 .....S.....T.....Q.K.....  
 SaV79398 .....S.....T.....Q.K.....  
 CoV39198 .....S.....T.....Q.K.....  
 TuV42598 .....S.....T.....Q.K.....  
 BAV19198 .....S.....T.....Q.K.....  
 Ush25498 .....S.....T.....Q.K.....  
 Ush27498 .....S.....T.....Q.K.....  
 BsAM1499 .....S.....T.....Q.K.....  
 M1s19599 .....S.....T.....Q.K.....  
 Chal14099 .....S.....T.....Q.K.....  
 BsASM699 .....S.....T.....Q.K.....  
 BsASM799 .....S.....T.....Q.K.....  
 Men13599 .....S.....T.....Q.K.....  
 N1600201 .....S.....T.....Q.RD.....  
 Chr53801 .....S.....T.....Q.K.....  
 Ne226001 .....S.....T.....Q.K.....  
 BsA72201 .....S.....T.....Q.K.....



Shang793 YPALNVITMDN NGKFDKLIW GVHHPSTDSO QTSLYVRASG RVTVSTKRSO QVTFPNTGSR FWRGQSSRI SIYWTIVKPG  
 HogKgl194 ..... I.D.Y. ....L.....  
 Joha3394 ..... I.D.Y. ....I.....  
 Wuh35995 ..... Q ..... I.....  
 Thess195 ..... Q ..... I.....  
 SAl14796 ..... Q ..... V.....  
 Sydne597 ..... AQ ..... I.....  
 Buc22699 ..... AQ ..... V.....  
 Mosc1099 ..... TQ ..... I.....  
 Buc22999 ..... AQ ..... V.....  
 Pa200799 ..... AQ ..... V.....  
 BA410295 ..... Q ..... I.....  
 BA406595 ..... Q ..... I.....  
 BA406495 ..... Q ..... I.....  
 BA409895 ..... Q ..... I.....  
 BA405795 ..... Q ..... I.....  
 BA408495 ..... Q ..... I.....  
 BsAs3996 ..... Q ..... V.....  
 BA445996 ..... Q ..... V.....  
 BA453496 ..... Q ..... V.....  
 BA455996 ..... Q ..... V.....  
 BsAs3796 ..... Q ..... V.....  
 BA463496 ..... Q ..... I.....  
 SF545697 ..... AQ ..... V.....  
 LP208997 ..... AQ ..... V.....  
 BAV23598 ..... AQ ..... V.....  
 Ushr1398 ..... AQ ..... V.....  
 BsAt2898 ..... AQ ..... V.....  
 NeuV54198 ..... AQ ..... V.....  
 Sav79398 ..... AQ ..... I.....  
 CoV39198 ..... AQ ..... V.....  
 TuV42598 ..... AQ ..... V.....  
 BAV19198 ..... AQ ..... V.....  
 UsR25498 ..... AQ ..... V.....  
 Ush27498 ..... AQ ..... V.....  
 BsAM1499 ..... AQ ..... V.....  
 MIs19599 ..... AQ ..... V.....  
 Cha14099 ..... AQ ..... V.....  
 BsAsM699 ..... AQ ..... V.....  
 BsAsM799 ..... AQ ..... V.....  
 Men13599 ..... AQ ..... V.....  
 N1600201 ..... AQ ..... V.....  
 ChrS3801 ..... AQ ..... V.....  
 Ne226001 ..... AQ ..... V.....  
 BsA72201 ..... AQ ..... V.....

Shang793 DILLINSTON LIAPRGYFKI RNGKSSIMRS DAPIGNCSSZ CIPFNGSIFN DKPFQNVNRI TYGACPRIVK QNTILKATGH  
 HogKgi194 .....  
 Joha33394 .....  
 Wuh35995 .....  
 Thess195 .....  
 SA114796 .....  
 Sydne597 .....  
 Buc22699 .....  
 Mosc1099 .....  
 Buc22999 .....  
 Pa200799 .....  
 BA410295 .....  
 BA406595 .....  
 BA406495 .....  
 BA409895 .....  
 BA405795 .....  
 BA408495 .....  
 BsAs3996 .....  
 BA445996 .....  
 BA453496 .....  
 BA455996 .....  
 BsAs3796 .....  
 BA463496 .....  
 SF545697 .....  
 LP208997 .....  
 BAV23598 .....  
 UshR1398 .....  
 BsAT2898 .....  
 NeuV54198 .....  
 SaV79398 .....  
 CoV39198 .....  
 TuV42598 .....  
 BAV19198 .....  
 UsR25498 .....  
 Ush27498 .....  
 BsAM1499 .....  
 Mis19599 .....  
 Cha14099 .....  
 BsAsM699 .....  
 BsAsM799 .....  
 Men13599 .....  
 N1600201 .....  
 ChR53801 .....  
 Ne226001 .....  
 BsA72201 .....

<b>Shang793</b>	<b>RNVPEKQT</b>
Hogfkg194	.....
Joha3394	.....
Wuh35995	.....
Thess195	.....
SAl14796	.....
Sydne597	.....
Buc22699	.....
Mosc1099	.....
Buc22999	.....
Pa200799	.....
BA410295	.....
BA406595	.....
BA406495	.....
BA409895	.....
BA405795	.....
BA408495	.....
BsAs3996	.....
BA445996	.....
BA453496	.....
BA455996	.....
BsAs3796	.....
BA463496	.....
SE545697	.....
LP208997	.....
BAV23598	.....
Ushr1398	.....
BsAT2898	.....
NeuV54198	.....
SaV79398	.....
CoV39198	.....
TuV42598	.....
BAV19198	.....
UsR25498	.....
Ush27498	.....
BsAM1499	.....
Mis19599	.....
Cha14099	.....
BsAsM699	.....
BsAsM799	.....
Men13599	.....
N1600201	.....
ChR53801	.....
Ne226001	.....
BsA72201	.....



**FIGURA 16:** Árbol de filogenia basado en la secuencia nucleotídica de la porción HA<sub>1</sub> de la HA de virus influenza A (H3N2), 1 995-2 002, construido con programas del paquete PHYLIP. El tamaño de la barra horizontal es proporcional al número de diferencias nucleotídicas, como lo indica la barra.

Abreviaturas correspondientes al cuadro 21 y a la figura 16

Abreviaturas	Identificación de la Cepa
<b>Cepas de Referencia</b>	
Shang793	A/Shangdong/7/93
HogKg194	A/Hong Kong/1/94
Joha3394	A/Johannesburg/33/94
Wuh35995	A/Wuhan/359/95
Thess195	A/Thessaloniki1/95
SA114796	A/South Africa/1.147/96
Sydne597	A/Sidney/5/97
Buc22699	A/Bucharest/226/99
Moscl099	A/Moscow/10/99
Buc22999	A/Bucharest/229/99
Pa200799	A/Panama/2007/99
<b>Cepas de Campo</b>	
BA410295	A/Buenos Aires/4102/95
BA406595	A/Buenos Aires/4065/95
BA406495	A/Buenos Aires/4064/95
BA409895	A/Buenos Aires/4098/95
BA405795	A/Buenos Aires/4057/95
BA408495	A/Buenos Aires/4084/95
BsAs3996	A/Buenos Aires/39/96
BA445996	A/Buenos Aires/4459/96
BA453496	A/Buenos Aires/4534/96
BA455996	A/Buenos Aires/4559/96
BsAs3796	A/Buenos Aires/37/96
BA463496	A/Buenos Aires/4634/96
SF545697	A/SantaFe/5456/97
LP208997	A/La Plata/12089/97
BAV23598	A/Buenos Aires/V235/98
UshR13998	A/Ushuaia/R13/98
BsAT2898	A/Buenos Aires/T28/98

<b>Cepas De Campo</b>	<b>Identificación de la Cepa</b>
NeuV54198	A/Neuquén/V541/98
SaV79398	A/Salta/V793/98
CoV39198	A/Córdoba/V391/98
TuV42598	A/Tucumán/V425/98
BAV19198	A/Buenos Aires/V191/98
UsR25498	A/Ushuaia/R254/98
Ush27498	A/Ushuaia/274/98
BsAM1499	A/Buenos Aires/M14/99
Mis19599	A/Misiones/195/99
Cha14099	A/Chaco/140/99
BsAsM699	A/Buenos Aires/M6/99
BsAsM799	A/Buenos Aires/M7/99
Men13599	A/Mendoza/135/99
N1600201	A/Neuquén/1016002/01
ChR53801	A/Chaco/R538/01
Ne226001	A/Neuquen/2260/01
BsA72201	A/Buenos Aires/01

**Cuadro 22. Alineamiento de aminoácidos basado en la porción HA<sub>1</sub> de la HA de virus influenza A (H1N1), 1 995-2 002**

<b>Singa686</b>	<b>DTICIGYHAN</b>	<b>NSTDTVDTVL</b>	<b>EKNVTVTHSV</b>	<b>NLLEDSHNGK</b>	<b>LCRLKGIAPL</b>	<b>QLGNCSIAGW</b>	<b>ILGNPECESL</b>	<b>FSKKSWSYIA</b>
Texa3691	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Bayer795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Bei26296	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NeCa2099	<b>I H..H.</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BAA6497	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BAT11897	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BAT11497	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BsA34499	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA617799	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ne138199	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BAP27D00	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NeP3D100	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SFeR9800	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MdP23500	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MVj63600	<b>I</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
ChaR11200	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Urug3700	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Urug3800	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Urug4200	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Urug3300	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PaCS2400	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

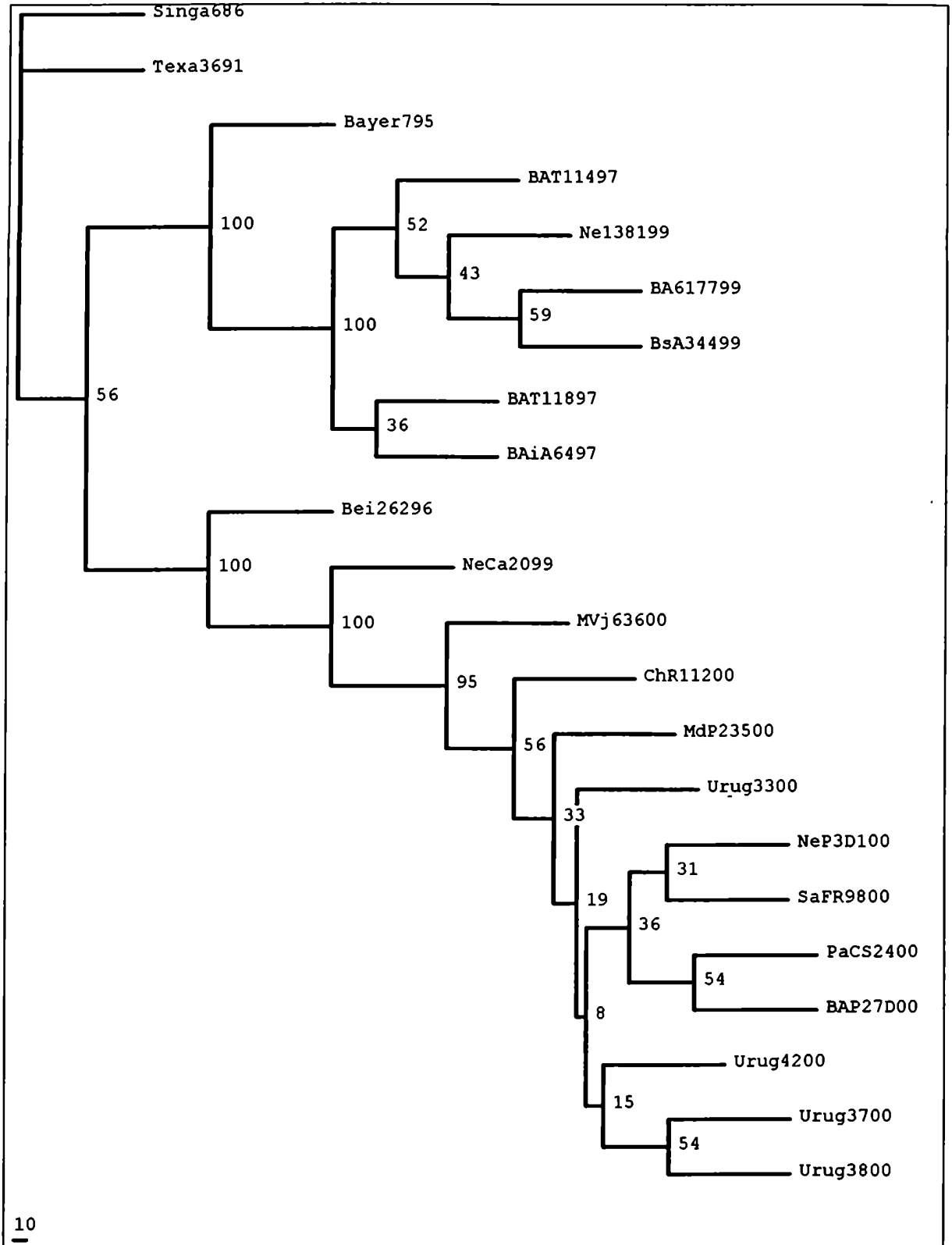
Las cepas de referencia figuran en negrita

Singa686	ETPNSNGTC	YPGYFADYEE	LREQLSSVSS	FERFEIFPKE	SSWPNHTVTK	GVTASCSHKG	RSFYRNLLW	LTEKNGSYPN
Texa3691	....P.....	.....	.....	.....	.....	..T...N.	K.....	..K...L...
Bayer795	....P.....	.....	.....	.....	.....	.....N.	K...K....	.....L...
Bei26296	....P.....	.....	.....	.....	.....	.....N.	K.....	.....L...
NeCa2099	....P.....	.....	.....	.....	.....	..S...N.	K.....	..G...L...
BAA6497	....P.....	.....	.....	.....	.....	.....N.	K...K....	.....L...
BAT11897	....P.....	.....	.....	.....	.....	.....N.	K...K....	.....L...
BAT11497	....P.....	.....	.....	.....	.....	.....N.	K...K....	.....L...
BsA34499	....P.....	.....	.....	.....	.....	.....N.	K...K....	.....L...
BA617799	....P.....	.....	.....	.....	.....	.....N.	K...K....	.....L...
Ne138199	....PK.....	.....	.....	.....	.....	.....N.	K...K....	.....L...
BAP27D00	....P.....	.....	.....	.....	.....	..S...N.	K.....	..G...L...
NeP3D100	....P.....	.....	.....	.....	.....	..S...N.	K.....	..G...L...
SFeR9800	....P.....	.....	.....	.....	.....	..S...N.	K.....	..G...L...
MdP23500	....P.....	.....	.....	.....	.....	..S...N.	K.....	..G...L...
MVJ63600	....P.....	.....	.....	.....	.....	..S...N.	K.....	..G...L...
ChaR11200	....P.....	.....	.....	.....	.....	..S...N.	K.....	..G...L...
Urug3700	....P.....	.....	.....	.....	.....	..S...N.	K.....	..G...L...
Urug3800	....P.....	.....	.....	.....	.....	..S...N.	K.....	..G...L...
Urug4200	....P.....	.....	.....	.....	.....	..S...N.	K.....	..G...L...
Urug3300	....P.....	.....	.....	.....	.....	..S...N.	K.....	..G...L...
PaCS2400	....PK.....	.....	.....	.....	.....	..S...N.	K.....	..G...L...



Singa686	LSKSYVNNKE	KEVLVIMGVH	HPSNIGDORA	IYHTENAYVS	VSSHYNRRF	TPEIAKRPKV	RGQEGRINY	WTLLEPGDTI
Texa3691	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
Bayer795	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
Bei26296	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
NeCa2099	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
BAA6497	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
BAT11897	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
BAT11497	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
EsA34499	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
BA617799	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
Ne138199	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
BAP27D00	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
NeP3D100	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
SFeR9800	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
McP23500	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
MVj163600	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
ChaR11200	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
Urug3700	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
Urug3800	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
Urug4200	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
Urug3300	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....
PaCS2400	.....	.....	.....	.....S.....	.....	.....	.....	.....





**FIGURA 17:** Árbol de filogenia basado en la secuencia nucleotídica de la porción HA<sub>1</sub> de la HA de virus unfluenza A (H1N1), 1 995-2 002, construido con programas del paquete PHYLIP. El tamaño de la barra horizontal es proporcional al número de diferencias nucleotídicas, como lo indica la barra.

Abreviaturas correspondientes al cuadro 22 y a la figura 17

Abreviaturas	Identificación de la Cepa
<b>Cepas de Referencia</b>	
Singa686	A/Singapore/6/86
Texa3691	A/Texas/36/91
Bayer795	A/Bayern/7/95
Bei26296	A/Beijing/262/96
NeCa2099	A/New Caledonia/20/99
<b>Cepas de Campo</b>	
BAA6497	A/Buenos Aires/A64/97
BAAT11897	A/Buenos Aires/T118/97
BAAT11497	A/Buenos Aires/T114/97
BsA34499	A/Buenos Aires/344/99
BA617799	A/Buenos Aires/6177/99
Ne138199	A/Neuquén/1381/99
BAP27D00	A/Buenos Aires/P27D1/00
NeP3D100	A/Neuquén/P3D1/00
SFeR9800	A/Santa Fe/R98/00
MdP23500	A/Mar del Plata/235/00
MVj63600	A/Mendoza/Vj636/00
ChaR11200	A/Chaco/R112/00
Urug3700	A/Uruguay/37/00
Urug3800	A/Uruguay/38/00
Urug4200	A/Uruguay/42/00
Urug3300	A/Uruguay/33/00
PaCS2400	A/Paraguay/CS24/00

**Cuadro 23. Alineamiento de aminoácidos basado en la porción HA<sub>1</sub> de la HA de virus influenza B, 1 995-2 002**

Victo287	DRICTGITSS	NSPHVVKTAT	QGEVNVIGVI	PLTTTTPTKSH	FANLKGTKTR	GKLCPKCLNC	TDLDVAlGRP	KCTGTIPSAK
Yama1688	.....	.....	.....	.....	.....	.....N...	.....	M.M.....
Pana4590	.....	.....	.....	.....	.....	.....N...	.....A..	M.V..T....
Bei18493	.....	.....	.....	.....	.....G	.....N...	.....	M.V..T....
Harbi794	.....	.....	.....	.....	.....	.....N...	.....	M.V..T....
Shand797	.....	.....	.....	.....	.....	.....N...	.....	M.V..T....
Bei24397	.....	.....	.....	.....	.....	.....N...	.....	.....N.....
Yam16698	.....	.....	.....	.....	.....	.....T...	.....	M.V.VT....
Sic37999	.....	.....A	.....	.....	.....	.....T...	.....	M.V.IT....
Johan599	.....	.....A	.....	.....	.....	.....T...	.....	M.V.IT....
Shiz1501	.....	.....A	.....	.....	.....	.....T.F.	.....	M.V.IT....
HKg33501	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....N.....
HK135102	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....N.....
BusAs995	.....	.....	.....	.....	.....	.....N...	.....	M.V..T....
BASW1697	.....	.....	.....	.....	.....	.....T...	.....	M.V.VT....
BAV51899	.....	.....	.....	.....	.....	.....T...	.....	M.V.IT....
MPV37399	.....	.....A	.....	.....	.....	.....T...	.....	M.V.IT....
MPV38599	.....	.....A	.....	.....	.....	.....T...	.....	M.V.IT....
U1573299	.....	.....A	.....	.....	.....	.....T...	.....	M.V.IT....
MdP59599	.....	.....A	.....	.....	.....	.....T...	.....	M.V.IT....
Chr11300	.....	.....A	.....	.....	.....	.....T...	.....	M.V.IT....
Cha36600	.....	.....	.....A	.....	.....	.....T...	.....	M.V.IT....
BA16100	.....	.....	.....A	.....	.....	.....T...	.....	M.V.IT....
BA5MC402	.....	.....	.....S	.....	.....	.....T...	.....	M.V.IT....
BA5MC102	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....N.....
BA764002	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....N.....
BA803902	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....N.....
LP527902	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....N.....
BA546102	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....N.....
Co771602	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....N.....

Las cepas de referencia figuran en negrita

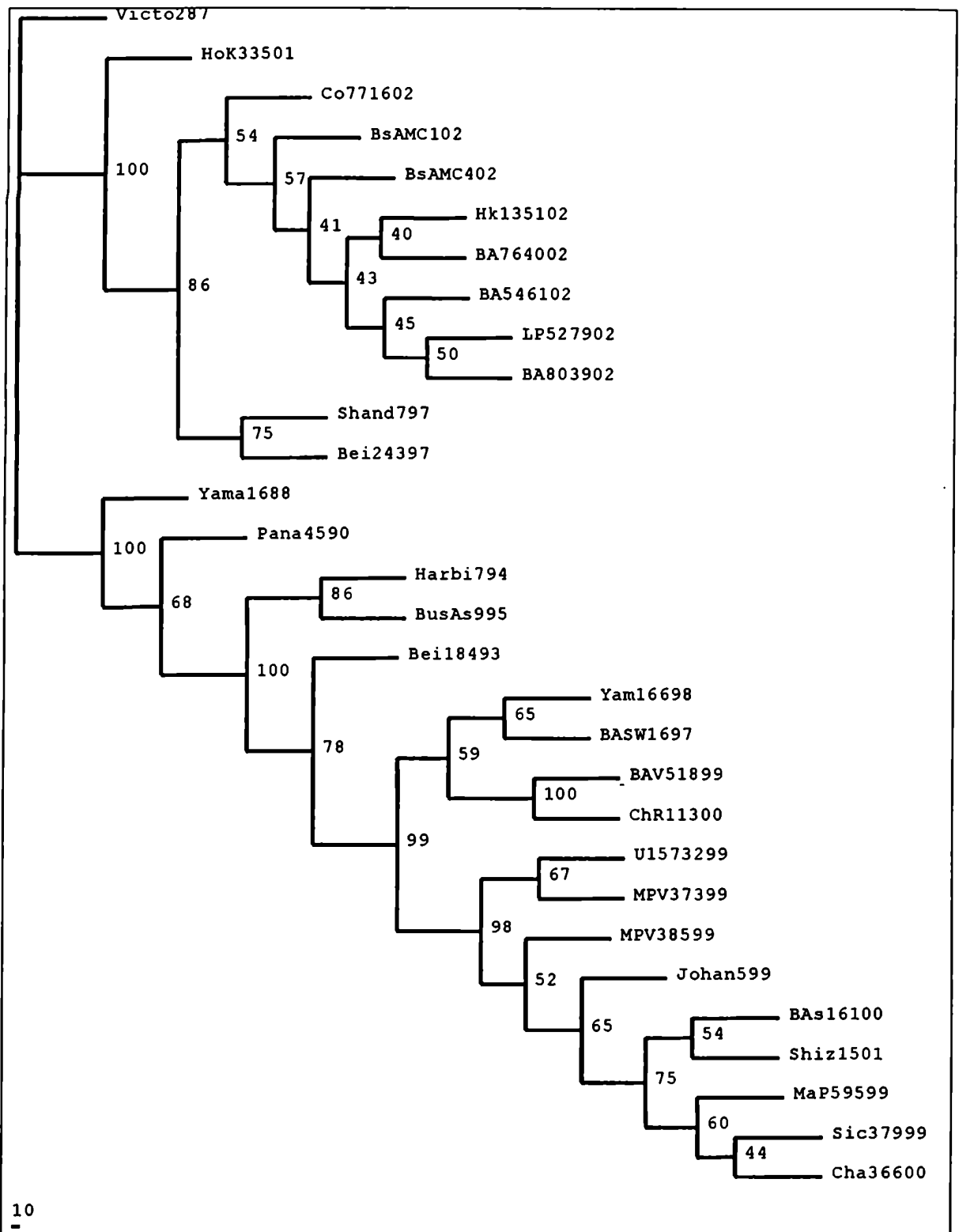
**Victo287 ASILHEKPV TSGCFPIHD RTKIRQLPNL LRGYEHRLS THNVINAETA PGGPKVGTGTS GSCPNTVINGN GFFATMANAV**  
 Yama1688 .....R. ....N. ....R. ....RL. ....SR. ....  
 Pana4590 .....R. ....N. ....R. ....RL. ....SRD .....  
 Bei18493 .....R. ....N. ....Q. ....RL. ....A.SRS .....  
 Harbi794 .....R. ....N. ....Q. ....RL. ....A.SRS .....  
 Shand797 V.....R. ....I. ....I. ....I. ....A.SRS .....  
 Bei24397 V.....R. ....I. ....K. ....I. ....V.....  
 Yam16698 .....R. ....K. ....Q. ....RL. ....A.SRS .....  
 Sic37999 .....R. ....K. ....Q. ....RL. ....S.SKS .....  
 Johan599 .....R. ....K. ....Q. ....RL. ....A.SKS .....  
 Shiz1501 .....R. ....K. ....Q. ....RL. ....A.SKS .....  
 HKg33501 V.....R. ....R. ....N. ....I. ....A.SKS .....  
 HK135102 V.....R. ....I. ....K. ....I. ....A.SKS .....  
 BusAs995 .....R. ....N. ....Q. ....RL. ....A.SRS .....  
 BASW1697 .....R. ....K. ....Q. ....RL. ....A.SRS .....  
 BAV51899 .....R. ....K. ....Q. ....RL. ....A.SRS .....  
 MPV37399 .....R. ....K. ....Q. ....RL. ....A.SRS .....  
 MPV38599 .....R. ....K. ....Q. ....RL. ....A.SRS .....  
 U1573299 .....R. ....K. ....Q. ....RL. ....A.SRS .....  
 MdP59599 .....R. ....K. ....Q. ....RL. ....A.SKS .....  
 Chr11300 .....R. ....K. ....Q. ....RL. ....A.SRS .....  
 Cha36600 .....R. ....N. ....Q. ....RL. ....A.SKS .....  
 BAs16100 .....R. ....N. ....Q. ....RL. ....A.SKS .....  
 BAsMC402 V.....R. ....K. ....I. ....A.SKS .....  
 BAsMC102 V.....R. ....K. ....I. ....A.SKS .....  
 BA764002 V.....R. ....K. ....I. ....V.....  
 BA803902 V.....R. ....K. ....I. ....A.SKS .....  
 LP527902 V.....R.A .....K. ....I. ....A.SKS .....  
 BA546102 V.....R. ....K. ....I. ....A.SKS .....  
 Co771602 V.....R. ....K. ....I. ....A.SKS .....

Victo287 PKGNKNTAM NPLITVEVPI CTEGEDQITV WGFHSDNETQ MVKLYGDSKP QKFTSSANGV TTHVVSQIGG FPNQAEDEGGL  
Yama1688 .RD--...T .K..... .KA. .KN.....N. .... .D .....T.....  
Pana4590 .RD--...T .K..... .K. .KN.....N. .... .D .....T.....  
Bei18493 .RD--...T .K..... .KI. .KN.....N. .... .D.T.....  
Harbi794 .RDD-...T .V..... .KA. .KN.....N. .... .D.T.....  
Shand797 .ND.....T .S.I..... .N. .A..... .D.T.....  
Bei24397 .ND.....T .S.I..... .T... .A..... .D.T.....  
Yam16698 .D.-...T .H. .KE..... .K. .KN.....N. .... .D.T.....  
Sic37999 .RD.-...T .H. .KE..... .K. .KN.....N. .... .D.T.....  
Johan599 .RD.-...T .H. .KE..... .DK.. .KN.....N. .... .D.T.....  
Shiz1501 .RD.-...T .H. .KE..... .K. .KN.....N. .... .D.T.....  
HKg33501 .NE.....T .S.I..... .A..... .I .....T.....  
HK135102 .ND.....T .S.I..... .K... .A..... .I .....T.....  
BusAs995 .RD.-...T .V..... .K. .KN.....N. .... .D.T.....  
BASW1697 .RD.-...T .H. .KE..... .K. .KN.....N. .... .D.T.....  
BAV51899 .RD.-...T .H. .KE..... .K. .KN.....N. .... .D.T.....  
MPV37399 .RD.-...T .H. .KE..... .K. .KN.....N. .... .D.T.....  
MPV38599 .RD.-...T .H. .KE..... .DK.. .KN.....N. .... .D.T.....  
U1573299 .RD.-...T .H. .KE..... .DK.. .KN.....N. .... .D.T.....  
MdP59599 .RD.-...T .H. .KE..... .K. .KN.....N. .... .D.T.....  
ChR11300 .RD.-...T .H. .KE..... .K. .KN.....N. .... .D.T.....  
Cha36600 .RD.-...T .H. .KE..... .K. .KN.....N. .... .D.T.....  
BAS16100 .RD.-...T .H. .KE..... .K. .KN.....N. .... .D.T.....  
BASMC402 .ND.....T .S.I..... .A..... .I .....T.....  
BASMC102 .ND.....T .S.I..... .A..... .I .....T.....  
BA764002 .ND.....T .S.I..... .A..... .I .....T.....  
BA803902 .ND.....T .S.I..... .I..... .I .....T.....  
LP527902 .ND.....T .S.I..... .I..... .I .....T.....  
BA546102 .ND.....T .S.I..... .I..... .I .....T.....  
Co771602 .ND.....T .S.I..... .T... .A..... .I .....T.....





Victo287	CPIWKTPLK	QVNGTKYRPP	A
Yama1688	LA	LA	LA
Pana4590	LA	LA	LA
Bei18493	LA	LA	LA
Harbi794	LA	LA	LA
Shand797	LA	LA	LA
Bei24397	LA	LA	LA
Yam16698	LA	LA	LA
Sic37999	LA	LA	LA
Johan599	LA	LA	LA
Shiz1501	LA	LA	LA
HKg33501	LA	LA	LA
HK135102	LA	LA	LA
BusAs995	LA	LA	LA
BASW1697	LA	LA	LA
BAV51899	LA	LA	LA
MPV37399	LA	LA	LA
MPV38599	LA	LA	LA
U1573299	LA	LA	LA
MdP59599	LA	LA	LA
ChR11300	LA	LA	LA
Cha36600	LA	LA	LA
BA16100	LA	LA	LA
BASMC402	LA	LA	LA
BASMC102	LA	LA	LA
BA764002	LA	LA	LA
BA803902	LA	LA	LA
LP527902	LA	LA	LA
BA546102	LA	LA	LA
Co771602	LA	LA	LA



**FIGURA 18:** Árbol de filogenia basado en la secuencia nucleotídica de la porción HA<sub>1</sub> de la HA de virus influenza B, 1 995-2 002, construido con programas del paquete PHYLIP. El tamaño de la barra horizontal es proporcional al número de diferencias nucleotídicas, como lo indica la barra.

Abreviaturas correspondientes al cuadro 23 y a la figura 18

Abreviaturas	Identificación de la Cepa
<b>Cepas de Referencia</b>	
Yama	B/Yamagata/16/88
Victo287	B/Victoria/2/87
Pana4590	B/Panama/45/90
Bei18493	B/Beijing/184/93
Harbi794	B/Harbin/7/94
Bei24397	B/Beijing/243/97
Shand797	B/Shangdong/7/97
Yam16698	B/Yamanashi/166/98
Johan599	B/Johannesburg/5/99
Sic37999	B/Sichuan/379/99
Shiz1501	B/Shizuoka/15/01
Hok33501	B/Hong Kong/335/01
HK135102	B/Hong Kong/1351/02
<b>Cepas de Campo</b>	
BusAs995	B/Buenos Aires/9/95
BASW1697	B/Buenos Aires/SW16/97
BAV51899	B/Buenos Aires/VL518/99
U1573299	B/Ushuaia/15732/99
MPV37399	B/Mar del Plata/VL373/99
MPV38599	B/Mar del Plata/VL385/99
MaP59599	B/Mar del Plata/ 595/99
Cha36600	B/Chaco/366/99
ChR11300	B/Chaco/R113/00
BA516100	B/Buenos Aires/161/00
Co771602	B/Córdoba/1027716/02
BsAMC102	B/Buenos Aires/MC1/02
BsAMC402	B/Buenos Aires/MC4/02
BA764002	B/Buenos Aires/7640/02
BA546102	B/Buenos Aires/1025461/02
LP527902	B/La Plata/1025279/02
BA803902	B/Buenos Aires/80397/02

A continuación detallaremos los cambios ocurridos año por año.

Año 1 995: De acuerdo a lo observado en el test de IHA, las cepas influenza A (H3N2) aisladas en nuestro país ese año estaban cercanamente relacionadas, desde el punto de vista antigénico, con la cepa A/Johannesburg/33/94 (H3N2). Sin embargo, el análisis genómico muestra que estas cepas son más semejantes a la cepa A/Thessalonika/1/95, la cual es una variante antigénicamente relacionada con la cepa Johannesburg. Los cambios a nivel de la estructura de aminoácidos de la porción HA<sub>1</sub> de la proteína HA que permiten diferenciar ambas variantes son: prolina 47 por serina, glicina 172 por ácido aspártico, arginina 197 por glutamina, ácido aspártico 216 por asparagina, tirosina 219 por serina, leucina/glutamina 226 por isoleucina y serina 278 por asparagina. Todos estos cambios estaban presentes en las cepas argentinas secuenciadas. La única cepa de virus influenza B que fue secuenciada presenta únicamente dos cambios aminoacídicos con respecto a la cepa B/Beijing/184/93: glicina 42 por alanina e isoleucina 80 por valina y 9 cambios con respecto a la cepa vacunal B/Panamá/45/90, lo cual explica por qué hay mayor similitud antigénica entre las cepas circulantes y la cepa Beijing.

Año 1 996: La mayoría de las cepas de campo aisladas durante 1996 fueron antigénicamente similares a la cepa A/Wuhan/359/95. Sólo una de ellas, la A/Buenos Aires/4634/96 presentó características genómicas similares a la cepa Tessalonika, al igual que lo observado con las cepas locales que habían circulado en nuestro país el año anterior. La cepa A/Thessalonika/1/95 es una intermediaria entre las cepas A/Johannesburg/33/94 y A/Wuhan/359/95. Sin embargo, desde el punto de vista genómico, las cepas locales parecieron estar más relacionadas a la variante A/South Africa/1147/96, cepa que no se distingue claramente de la cepa A/Wuhan/359/95 en el test de IHA. Comparando las secuencias aminoacídicas, los cambios más importantes entre estas dos cepas son: treonina 121 por asparagina, glicina 124 por serina, ácido aspártico 133 por asparagina y glicina 142 por arginina. Dos de estos cambios, el 124 y el 133, introducen sitios de N-glicosilación potenciales que podrían causar un cambio significativo en las propiedades antigénicas de la proteína. El único aislamiento de virus influenza A (H1N1) de esta temporada no fue secuenciado.

Año 1 997: Todas las cepas de virus influenza A (H3N2) aisladas en ese período fueron antigénicamente y genéticamente similares a una nueva variante representada por la cepa A/Sydney/5/97y éstas desplazaron totalmente a las cepas de la temporada anterior . Esta cepa evolucionó a partir de la cepa A/South Africa/1147/96. Los principales cambios aminoacídicos en las hemaglutininas de la cepa Sydney en relación a la cepa South Africa incluyen: lisina 62 por ácido glutámico, valina 144 por isoleucina, lisina 156 por glutamina, ácido glutámico 158 por lisina, valina 196 por alanina y asparagina 276 por lisina. Estos cambios sumados a las cuatro diferencias aminoacídicas entre las hemaglutininas de la cepa Wuhan y la cepa South Africa, representan diez cambios acumulativos que afectan a cuatro de los cinco sitios antigénicos presentes en la HA (A, B, C y E) y consecuentemente causan un cambio significativo en las propiedades antigénicas de esta molécula. Con respecto a las cepas influenza A (H1N1), los cambios aminoacídicos que permiten distinguir entre la cepa A/Bayern/7/95 (circulante) y la cepa A/Beijing/262/95 (vacunal) son: lisina 43 por leucina, treonina 47 por isoleucina, fenilalanina 71 por isoleucina, alanina 80 por valina, lisina 156 por arginina, lisina 163 por asparagina, isoleucina 185 por metionina, valina 202 por leucina, ácido aspártico 222 por glicina, serina 271 por prolina y glicina 273 por asparagina. En el test de IHA se observó que todas las cepas estudiadas eran similares a la cepa Bayern. Este resultado fue confirmado en el estudio genómico ya que los cambios aminoacídicos de las cepas locales se correspondieron con los presentes en la cepa Bayern. Con respecto a las cepas influenza B, los cambios aminoacídicos presentes en las cepas aisladas en 1 997 con respecto a la cepa vacunal B/Beijing/184/93 y que perduraron en el tiempo son: glicina 42 por alanina, asparagina 56 por treonina, asparagina 116 por lisina, tirosina 179 por histidina, glicina 184 por ácido glutámico y valina 267 por isoleucina. A pesar de estos cambios aminoacídicos, las cepas influenza B circulantes fueron reconocidas por el inmunosuero Beijing con altos títulos.

Año 1 998: Ese año, todos los aislamientos recuperados en el laboratorio resultaron ser similares a la cepa A/Sydney/5/97. Cambios adicionales ocurridos en cepas más recientes similares a la cepa Sydney incluyen tanto prolina 103 por glutamina o tirosina 137 por serina, siendo el último el más frecuente. Una de las cepas argentinas, la A/Tucumán/V425/98, presentó bajo título de IHA frente al antisuero Sydney. Se sabe que el bajo título observado en el test de IHA de cepas aisladas en otras partes del mundo

se debe a la adquisición (en las posiciones 45 o 144) o pérdida (en las posiciones 133 o 246) de potenciales sitios de glicosilación en la HA, ya que los mismos enmascaran la reactividad antigénica de la molécula. En este caso, no se observan cambios con respecto a la cepa Sydney en dichas posiciones.

Año 1 999: Durante ese año, tres nuevas variantes emergieron a partir de la cepa Sydney que fueron denominadas por el Centro de Londres como A, B y C. Dichas variantes se distinguen de la cepa Sydney en la secuencia del gen que codifica para la HA, pero estos cambios no son extensivos a la secuencia aminoacídica de la porción HA<sub>1</sub> de las cepas tempranas aisladas durante la temporada anterior semejantes a Sydney. Los virus pertenecientes al grupo A, representado por la cepa A/Moscow/10/99, poseen, en comparación con las cepas tempranas similares a Sydney, glutamina en lugar de arginina en la posición 57 y arginina en lugar de lisina en la posición 160. En cambio, los virus comprendidos dentro del grupo B, representado por A/Bucharest/229/99, poseen todos o algunos de estos cambios: isoleucina 144 por asparagina (creando un nuevo sitio de glicosilación), ácido aspártico 172 por ácido glutámico y treonina 192 por isoleucina, mientras que los más recientes poseen una glutamina en la posición 57. Los aminoácidos característicos de las cepas integrantes del grupo C, como A/Bucharest/226/99, son: serina 31 en lugar de asparagina y fenilalanina o valina en la posición 137. De acuerdo a estos datos, todas las cepas argentinas pertenecen al grupo B.

Con respecto a las cepas influenza A (H1N1), todas ellas resultaron ser similares a la cepa Bayern, al igual que en el año 1 997. Las secuencias de la porción HA<sub>1</sub> correspondientes a algunas de las cepas de campo aisladas hacia fin de la temporada 1 999 presentan cambios aminoacídicos con respecto a cepas similares a la cepa Bayern aisladas en años anteriores. Dichos cambios son: ácido glutámico 86 por lisina, ácido glutámico 120 por ácido aspártico, asparagina 168 por lisina, treonina 194 por lisina, treonina 166 por isoleucina e isoleucina 321 por valina.

Por otro lado, las secuencias aminoacídicas de la porción HA<sub>1</sub> de las cepas similares a B/Beijing/184/93 que fueron secuenciadas presentaron algunos cambios adicionales en comparación con otros aislamientos secuenciados años anteriores en la Argentina y en otros países del hemisferio sur como ser: valina 29 por alanina, asparagina 197 por ácido aspártico y valina 220 por isoleucina. La variación en el residuo 197, presencia de asparagina o ácido aspártico, resulta en la presencia o ausencia,

respectivamente, de un sitio de glicosilación en el extremo superior de la molécula de HA. Este cambio estuvo presente en tres de las cinco cepas de virus influenza B estudiadas este año.

Año 2 000: Durante esa temporada, todas las cepas de virus influenza A (H1N1) fueron antigénicamente similares a una nueva variante de A/Beijing/262/95 que fue la cepa A/New Caledonia/20/99. Desde el punto de vista genómico, todas las cepas argentinas, uruguayas y paraguayas secuenciadas de este período presentaron un único cambio aminoacídico con respecto a esta cepa de referencia en la posición 163 (lisina por metionina).

Con respecto a los virus influenza B, después de cuatro años consecutivos de estar presente en la fórmula vacunal, se decidió considerar como un componente vacunal alternativo a una cepa más reciente, la cepa B/Yamanashi/166/98. Todos los aislamientos locales, que habían sido mejor reconocidos por el inmunosuero Yamanashi en comparación con el inmunosuero Beijing, presentaron únicamente dos cambios aminoacídicos con respecto a la cepa Yamanashi, valina 29 por alanina y valina 300 por isoleucina.

Año 2 001: La cepa A/Panamá/2007/99 es una variante más reciente que evolucionó a partir de la cepa A/Sydney/5/97. A pesar de que ambas cepas son indistinguibles desde el punto de vista antigénico, el estudio genómico demuestra la existencia de tres cambios aminoacídicos característicos de la cepa Panamá que permiten diferenciar a una de la otra: arginina 57 por glutamina, ácido aspártico 172 por ácido glutámico y treonina 192 por isoleucina. Estos cambios presentes en todas las cepas secuenciadas este año, además de otros presentes sólo en algunas cepas como ser el cambio en la posición 144 de isoleucina por asparagina, creando así un sitio de glicosilación adicional. Estos resultados implican que existió coincidencia entre las cepas circulantes y la correspondiente cepa vacunal. No se cuenta con secuencias de cepas de virus influenza A (H1N1) ni tampoco de influenza B que circularon ese año.

Año 2 002: Este año sólo se secuenciaron algunas cepas de virus influenza B. Desde el punto de vista antigénico, ninguno de los aislamientos de virus influenza B estudiados fue reconocido por el antisuero generado contra la cepa vacunal en el test de IHA. Todas

las cepas de virus influenza B aisladas y caracterizadas durante este período pertenecieron al linaje Victoria. Dentro de este linaje, se distinguen dos sublinajes o grupos tomando como base la secuencia de la HA. Las cepas pertenecientes al grupo 1, representadas por la cepa B/Hong Kong/335/01 o B/Hong Kong/330/01, se diferencian de previos aislamientos, como la cepa B/Shandong/7/97 por los siguientes cambios aminoacídicos: histidina 116 por arginina, isoleucina 121 por asparagina y ácido aspártico 164 por ácido glutámico. Dentro del grupo 2, representado por la cepa B/Shandong/7/97, se ubican las cepas B/Shandong/7/97, B/Hong Kong/1351/02 y B/Brisbane/32/02. Todas las cepas argentinas secuenciadas ese año presentan cinco cambios aminoacídicos con respecto a la cepa Hong Kong 335 y sólo dos en comparación con la cepa Shandong, por lo tanto es posible asegurar que todas las cepas argentinas pertenecen, desde el punto de vista genómico, al grupo 2.

#### **IV.5.4.2- Estudio molecular de la NA viral**

Además de la HA, la NA quizás también esté involucrada en la severidad de la infecciones causadas por el virus influenza. Si bien los anticuerpos dirigidos contra esta proteína de superficie no son suficientes para neutralizar la capacidad infectiva del virus, existe la posibilidad de que afecten la patogenicidad del mismo reduciendo el título viral y la extensión de las lesiones en el pulmón (121).

Los resultados del alineamiento de la secuencia aminoacídica de la NA (1413 nt.) de algunos virus influenza A (H3N2) y B se muestran en los cuadros 24 y 25, respectivamente, mientras que los árboles de filogenia construidos en base a la secuencia nucleotídica de la NA de los virus influenza A (H3N2) se presentan en la figura 19 y los virus influenza B en la figura 20.



**Cuadro 24. Alineamiento de aminoácidos basado en la NA de virus influenza A (H3N2), 1 995-2 002**

Shang793	MNPNQKIITI	GSVTLTIATI	CFLMQIAILV	TTVTLHFQY	ECNSPPNNQV	MLCEPTIIEE	NITEIVYLTN	TTIEKEICPK
Joha3394	.....S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....E
Wuh35995	.....S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SA114796	.....S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Sydne597	.....S	.....	.....	.....S	.....	.....	.....	.....
Joha2998	.....S	.....	.....	.....L	.....	.....	.....	.....
Mosc2099	.....S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA406495	.....S	.....	.....	.....P	.....	.....	.....	.....
BA405795	.....S	.....	.....	.....P	.....	.....	.....	.....
BA409895	.....S	.....	.....	.....P	.....	.....	.....	.....
BA408495	.....S	.....	.....	.....P	.....	.....	.....	.....
BA406595	.....S	.....	.....	.....P	.....	.....	.....	.....
BA410295	.....S	.....	.....	.....P	.....	.....	.....	.....
BsAs3996	.....S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA445996	.....S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA463496	.....S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA455996	.....S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BsAs3296	.....S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SF545697	.....S	.....	.....	.....S	.....	.....	.....	.....
BAV23598	.....S	.....	.....	.....L	.....	.....	.....	.....
UshR1398	.....S	.....	.....	.....L	.....	.....	.....	.....
UsR25498	.....S	.....	.....	.....L	.....	.....	.....	.....
CoV39198	.....S	.....	.....	.....L	.....	.....	.....	.....
BAV19198	.....S	.....	.....	.....L	.....	.....	.....	.....
CoV18598	.....S	.....	.....	.....L	.....	.....	.....	.....
BASt2898	.....S	.....	.....	.....L	.....	.....	.....	.....
TuV42598	.....S	.....	.....	.....L	.....	.....	.....	.....
NeV54198	.....S	.....	.....	.....L	.....	.....	.....	.....
SaV79398	.....S	.....	.....	.....L	.....	.....	.....	.....
LP208999	.....S	.....	.....	.....S	.....	.....	.....	.....
Pa200799	.....S	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA5M1499	.....S	.....	.....	.....A	.....	.....	.....	.....

Las cepas de referencia figuran en negrita

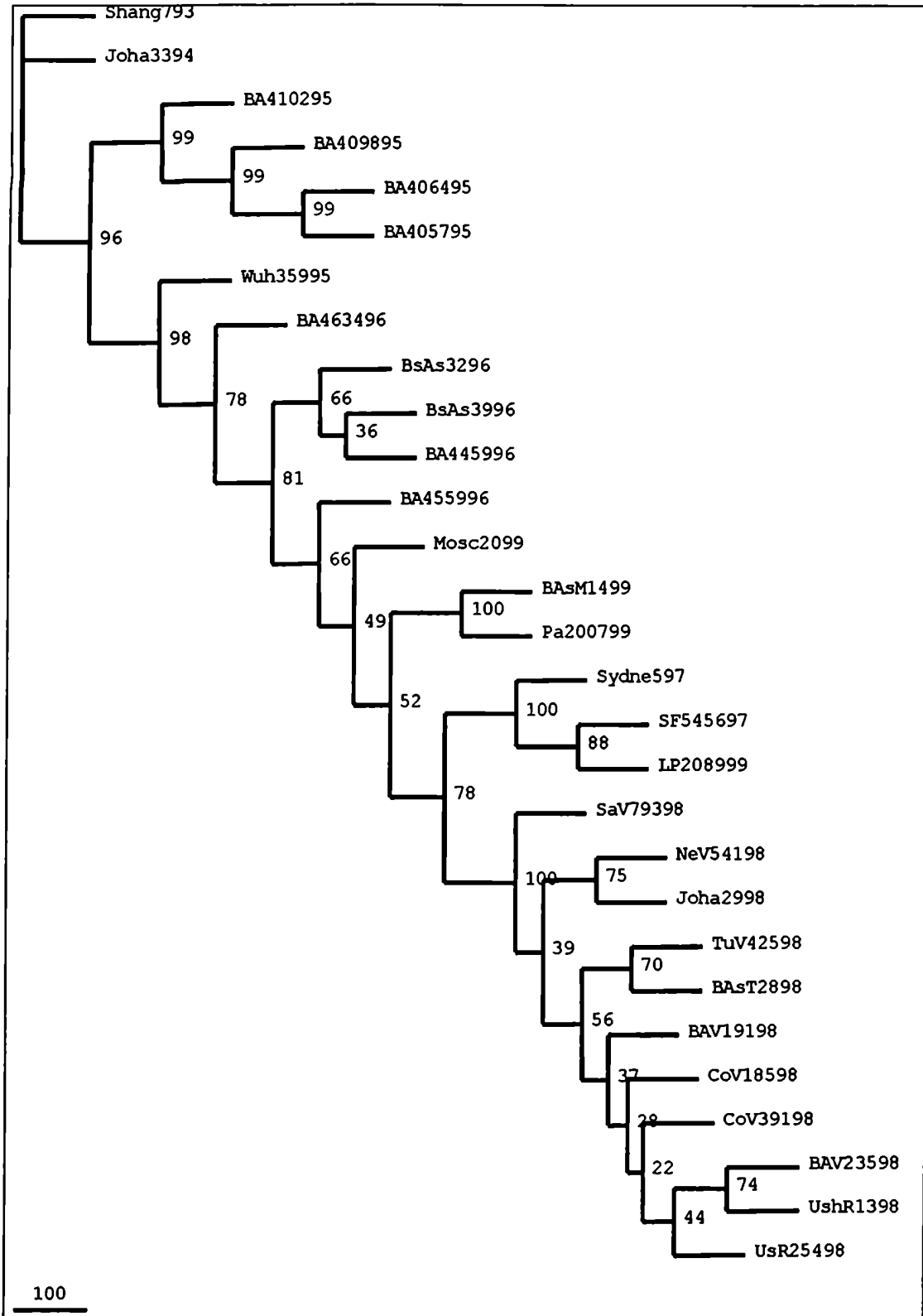
Shang793	LAEYRNWSKP	QCKITGFAPP	SKDNSIRLSA	GGDIWVTREP	YVSCDPKCY	QFALGGTTL	NNRHSNDTVH	DRTPYRTLIM
Joha3394	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Wuh35995	.....	.M.....	.....	H.....	D.....	.....	.....	.....
SA114796	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
Sydne597	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
Joha2998	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
Mosc2099	.....	.N.....	.....	.....	D.....	.....	.G.....	.....
BA406495	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA405795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA409895	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA408495	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA406595	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA410295	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BsAs3996	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
BA445996	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
BA463496	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
BA455996	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
BsAs3296	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
SF545697	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
BAV23598	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
UshR1398	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
UsR25498	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
CoV39198	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	G.....
BAV19198	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
CorV18598	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
BAsT2898	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
TuV42598	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
NeV54198	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
SaV79398	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
LP208999	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
Pa200799	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....
BAsM1499	.....	.....	.....	.....	D.....	.....	.....	.....



Shang793	MTDGSASERA	DTKILFIEEG	KIVHISPLSG	SAQHVEECSC	YPRYPGVRVCV	CRDNWKGSNR	PIVDINVKDY	SIYSSYVCSG
Joha3394								
Wuh35995	G.				S.			
SA114796	G.				I.			
Sydne597	G.							
Joha2998	G.	I..Q.						
Mosc2099	GK.	T.						
BA406495	G.							
BA405795	G.							
BA409895	G.							
BA408495	G.							
BA406595	G.							
BA410295	G.							
BsAs3996	G.							
BA445996	G.							
BA463496	G.							
BA455996	G.							
BsAs3296	G.							
SF545697	G.							
BAV23598	G.	I..Q.						
Ushr1398	G.	I..Q.						
UsR25498	G.	I..Q.						
CoV39198	G.	I..Q.						
BAV19198	G.	I..Q.						
CorV18598	G.	I..Q.						
BAst2898	G.	I..Q.						
TuV42598	G.	I..Q.						
NeV54198	G.	I..Q.						
SaV79398	G.	I..Q.						
LP208999	G.							
Pa200799	G.	T.K.						
BAsm1499	G.	T.K.						

	LVGDTPRKND	SSSSSYCRNP	NNEKSGHGK	GWAFDDGNDV	WMGRTISEEL	RSGYETFKVI	GGWSKPNKSL	QINRQVIYDR
Shang793	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Joha3394	.....	W.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Wuh35995	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	K.....	.....	.....
SA114796	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	K.....	E.....	.....
Sydne597	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	KF.....	E.....	.....
Joha2998	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	KF.....	E.....	.....
Mosc2099	.....	H.LD.....	E.G.....	.....	.....	K.....	E.....	.....
BA406495	.....	.....	E.G.....	.....	.....	K.....	.....	.....
BA405795	.....	.....	E.G.....	.....	.....	K.....	.....	.....
BA409895	.....	.....	E.G.....	.....	.....	K.....	.....	.....
BA408495	.....	.....	E.G.....	.....	.....	K.....	.....	.....
BA406595	.....	.....	E.G.....	.....	.....	K.....	.....	.....
BA410295	.....	.....	E.G.....	.....	.....	K.....	.....	.....
BsAs3996	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	K.....	E.....	.....
BA445996	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	K.....	E.....	.....
BA463496	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	K.....	.....	.....
BA455996	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	T.....	E.....	.....
BsAs3296	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	K.....	E.....	.....
SF545697	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	KF.....	E.....	.....
BAV23598	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	KF.....	E.....	.....
UshR1398	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	KF.....	E.....	.....
UsR25498	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	KF.....	E.....	.....
CoV39198	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	KF.....	E.....	.....
BAV19198	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	KF.....	E.....	.....
CorV18598	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	KF.....	E.....	.....
BAst2898	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	KF.....	E.....	.....
TuV42598	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	KF.....	E.....	.....
NeV54198	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	G.KF.....	E.....	.....
SaV79398	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	KF.....	E.....	.....
LP208999	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	KF.....	E.....	.....
Pa200799	.....	H.LD.....	E.G.....	.....	.....	KS.....	E.....	E.....
BAsm1499	.....	H.L.....	E.G.....	.....	.....	KF.....	E.....	E.....





**FIGURA 19:** Árbol de filogenia basado en la secuencia nucleotídica de la NA de virus influenza A (H3N2), 1 995-2 002, construido con programas del paquete PHYLIP. El tamaño de la barra horizontal es proporcional al número de diferencias nucleotídicas, como lo indica la barra.

Abreviaturas correspondientes al cuadro 24 y a la figura 19

Abreviaturas	Identificación de la Cepa
<b>Cepas de Referencia</b>	
Shang793	A/Shangdong/7/93
Joha3394	A/Johannesburg/33/94
Wuh35995	A/Wuhan/359/95
SA114796	A/South Africa/1147/96
Sydne597	A/Sydney/5/97
Joha2998	A/Johannesburg/29/98
Mosc2099	A/Moscow/20/99
Pa200799	A/Panamá/2007/99
<b>Cepas de Campo</b>	
BA408495	A/Buenos Aires/4084/95
BA406595	A/Buenos Aires/4065/95
BA410295	A/Buenos Aires/4102/95
BA409895	A/Buenos Aires/4098/95
BA406495	A/Buenos Aires/4064/95
BA405795	A/Buenos Aires/4057/95
BA463496	A/Buenos Aires/4634/96
BsAs3296	A/Buenos Aires/32/96
BsAs3996	A/Buenos Aires/39/96
BA445996	A/Buenos Aires/4459/96
BA455996	A/Buenos Aires/4559/96
SF455697	A/Santa Fe/4556/97
SaV79398	A/Salta/V793/98
NeV54198	A/Neuquén/V541/98
TuV42598	A/Tucumán/V425/98
BAst2898	A/Buenos Aires/T28/98
BAV19198	A/Buenos Aires/V191/98
CoV18598	A/Córdoba/V185/98
CoV39198	A/Córdoba/V391/98
BAV23598	A/Buenos Aires/V235/98
UshR1398	A/Ushuaia/R13/98
UsR25498	A/Ushuaia/R254/98
BAstM1499	A/Buenos Aires/M14/99
LP208999	A/La Plata/12089/99



Cuadro 25. Alineamiento de aminoácidos basado en la NA de virus influenza B, 2 002

Victo287	MLPSTIQTLT	LFLTSGGVL	SLYVSALLSY	LLYSDILLKF	SPTKIIAPT	SLDCANASNV	QAANHSATKE	MTFLLPEPEV
Yama1688	.....S	.....S	.....S	.....S	..E.T..KV	P.....P	..V.R...G	..L..S....
Bei18493	.....S	.....S	.....S	.....S	..E.T...	P.....P	..V.R...G	V..I.....
Oma16296	.....S	.....S	.....S	.....S	.....V	.....Y	.....E	.....E
Yam16698	.....S	.....S	.....S	.....S	..E.T...	P.N.....	..V.R...G	V..LP.....
Sic37999	.....S	.....S	.....S	.....S	..E.T...	P.....A	..V.R...G	V..L.....
HgKg2201	.....S	.....S	.....S	.....S	.....T	..S.....F	V.....V	.....V
HgK33001	.....S	.....S	.....S	.....S	.....T	..S.....F	V.....V	.....V
HK135102	.....S	.....S	.....S	.....S	..E.T...	P.....P	..V.R...G	V..L.....
LP527902	.....S	.....S	.....S	.....S	..E.T...	P.....P	..V.R...G	V..L.....
Co771602	.....S	.....S	.....S	.....S	..E.T...	P.....P	..V.R...G	V..L.....
BA803902	.....S	.....S	.....S	.....S	..E.T...	P.....P	..V.R...G	V..L.....
BA546102	.....S	.....S	.....S	.....S	..E.T...	P.....P	..V.R...G	V..L.....
BA764002	.....S	.....S	.....S	.....S	..E.T...	P.....P	..V.R...G	V..L.....

Victo287	TYPRLSCQGS	TFOKALLISP	HRFGEAKGNS	APLIIREPFI	ACGPKCKHF	ALTHYAAQPG	GYNGTREDR	NKLRHLISVN
Yama1688	.....P	.....SR	.....SR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR
Bei18493	.....P	.....SR	.....SR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR
Oma16296	.....P	.....SR	.....SR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR
Yam16698	.....P	.....SR	.....SR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR
Sic37999	.....P	.....SR	.....SR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR
HgKg2201	.....P	.....SR	.....SR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR
HgK33001	.....P	.....SR	.....SR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR
HK135102	.....P	.....SR	.....SR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR
LP527902	.....P	.....SR	.....SR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR
Co771602	.....P	.....SR	.....SR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR
BA803902	.....P	.....SR	.....SR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR
BA546102	.....P	.....SR	.....SR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR
BA764002	.....P	.....SR	.....SR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR	.....TR

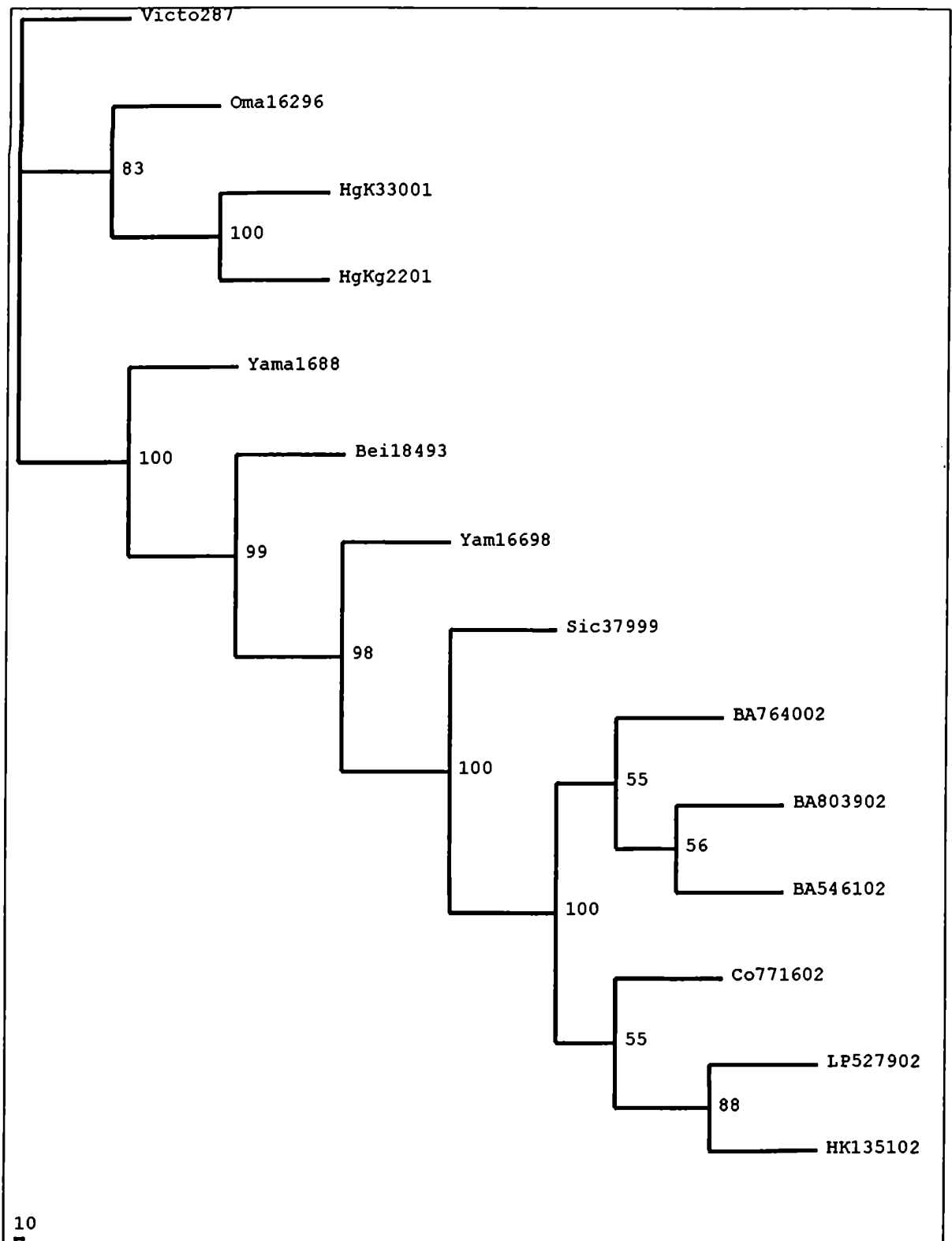
Las cepas de referencia figuran en negra

Victo287 LGKIPTVENS IFHMAAWSGS ACHDGREWTY IGVDPDSNA LIKIKYGEAY TDTYHSYANN ILRTQESACN CIGGDCYLMI  
 Yama1688 .....  
 Bei18493 .....  
 Oma16296 .....  
 Yam16698 .....  
 Sic37999 .....  
 HgKg2201 .....  
 HgK33001 F .....  
 HK135102 .....  
 LP527902 .....  
 Co771602 .....  
 BA803902 .....  
 BA546102 .....  
 BA764002 .....

Victo287 TDGSASGISK CRFLKIREGR IKEIFPTGR VEHTTECTCG FASNKTECA CRDNSYAKR PFVKLVETD TAEIRLMCTE  
 Yama1688 .....  
 Bei18493 .....  
 Oma16296 .....  
 Yam16698 .....  
 Sic37999 .....  
 HgKg2201 .....  
 HgK33001 .....  
 HK135102 .....  
 LP527902 .....  
 Co771602 .....  
 BA803902 .....  
 BA546102 .....  
 BA764002 .....

Victo287 TYLDTPRPDD GSITGPCESN GEKGRGGIKG GFVHQRMASK IGRWYSRTMS KTERMGMELY VKYDGFPTD SDALAPSGVM  
 Yama1688 .....D.....  
 Bei18493 .....D.....  
 Oma16296 .....D.S.....T.R.....K.....  
 Yam16698 .....D.S.....K.....G.....I.....TL.....  
 Sic37999 .....D.S.....K.....G.....L.....  
 HgKg2201 .....D.S.....K.....  
 HgK33001 .....D.S.....K.....  
 HK135102 .....D.S.....K.....G.....A.....L.....  
 LP527902 .....D.S.....K.....G.....A.....L.....  
 Co771602 .....D.S.....K.....G.....A.....L.....  
 BA803902 .....D.S.....K.....G.....A.....L.....  
 BA546102 .....D.S.....K.....G.....A.....L.....  
 BA764002 .....D.S.....K.....G.....A.....L.....

Victo287 VSMKEPGWYS FGFEIKDKKC DVPCIGIEMV HDGGKKTWHS AATAIYCLMG SQQLLWDTVT GVDNAL  
 Yama1688 .....  
 Bei18493 ...E.....  
 Oma16296 ...E.....  
 Yam16698 ...E.....  
 Sic37999 ...E.....E.....  
 HgKg2201 ..IE.....T.....  
 HgK33001 ..IE.....T.....I.....  
 HK135102 ...E.....E.....  
 LP527902 ...E.....E.....  
 Co771602 ...E.....E.....  
 BA803902 ...E.....E.....N.....  
 BA546102 ...E.....E.....  
 BA764002 ...E.....E.....



**FIGURA 20:** Árbol de filogenia basado en la secuencia nucleotídica de la NA de virus influenza B, 2 002, construido con programas del paquete PHYLIP. El tamaño de la barra horizontal es proporcional al número de diferencias nucleotídicas, como lo indica la barra.

Abreviaturas correspondientes al cuadro 25 y a la figura 20

<b>Abreviaturas</b>	<b>Identificación de la Cepa</b>
<b>Cepas de Referencia</b>	
Victo287	B/Victoria/2/87
Yama1688	B/Yamagata/16/88
Bei18493	B/Beijing/184/93
Oma16296	B/Oman/162/96
Yam16698	B/Yamanashi/166/98
Sic37999	B/Sichuan/379/99
HogK33001	B/Hong Kong/330/01
HgKg2201	B/Hong Kong/22/01
HK135102	B/Hong Kong/1351/02
<b>Cepas de Campo</b>	
Co771602	B/Córdoba/1027716/02
BA764002	B/Buenos Aires/7640/02
BA546102	B/Buenos Aires/1025461/02
LP527902	B/La Plata/1025279/02
BA803902	B/Buenos Aires/8039/02

El árbol de filogenia basado en la secuencia nucleotídica de los virus influenza A (H3N2) presenta grupos de filogenia que se diferencian con respecto al momento de aparición de las cepas representados por cepas de referencia homólogas a los observados en los árboles construidos en base a la HA<sub>1</sub> de la HA viral. Debido a que el número de cambios aminoacídicos ocurridos en la NA es menor respecto de los cambios ocurridos en la HA viral, la diferenciación entre los grupos genómicos observados en este árbol no es tan marcada como lo es para la HA. Con respecto al árbol de las cepas de virus influenza B se encontró que, todas las cepas aisladas en la Argentina pertenecieron al linaje representado por la cepa Yamagata.

A continuación detallaremos los cambios ocurridos año por año.

Año 1 995: La mayoría de las cepas de virus influenza A (H3N2) secuenciadas presentaron los mismos cambios en la secuencia aminoacídica y, al igual que lo observado para la HA viral, éstas están más relacionadas a la cepa A/Tessalonika/1/95 que a la cepa A/Johannesburg/33/94. Los cambios con respecto a la cepa Tessalonika son: serina 44 por prolina y ácido aspártico 208 por asparagina.

Año 1 996: El análisis genómico de las cepas de virus influenza A (H3N2) de este año demostró la circulación, por un lado, de cepas más recientes que demostraron poseer una secuencia aminoacídica similar a la cepa A/South Africa/1147/96 y por otro lado, la persistencia de cepas que presentaban cambios aminoacídicos propios de los observados en el año anterior en las cepas similares a la cepa Tessalonika. Estos resultados son similares a lo observado para la HA viral. Las cepas que presentan una secuencia aminoacídica similar a South Africa poseen un sólo cambio con respecto a la misma: isoleucina por valina en la posición 287.

Año 1 997: Existen siete cambios en la secuencia aminoacídica entre las NA de la cepa Wuhan y la cepa Sydney. Los aislamientos locales estudiados demostraron tener gran similitud con la cepa Sydney y sólo se diferencian en un única posición con respecto a la misma.

Año 1 998: El estudio genómico de la NA de las cepas argentinas y uruguayas demostró que existe una gran homogeneidad genómica entre las cepas argentinas al igual que entre las cepas uruguayas como así también una completa similitud entre las cepas argentinas y las cepas uruguayas. La NA de la mayoría de las cepas similares a A/Sydney/7/97 (H3N2) que fueron aisladas durante el año 1 998 presentaron mayor número de cambios con respecto a esta cepa de referencia en relación a las primeras cepas argentinas similares a Sydney aisladas en 1 997. Entre estos cambios se incluyen: serina 43 por asparagina, prolina 45 por isoleucina, valina 263 por isoleucina, prolina 267 por glutamina, fenilalanina 370 por leucina y glicina 401 por ácido aspártico. Algunos de estos cambios, en particular aquellos en las posiciones 370 y 401 quizás afecten el comportamiento antigénico de estas cepas.

Año 1 999: La única cepa argentina secuenciada este año conservó algunos cambios en la secuencia aminoacídica de la NA que ya se habían observado años anteriores con respecto a la cepa Sydney, como ser en las posiciones 43 y 267, y además presentó nuevos cambios con respecto a la misma. Entre estos últimos se encuentran valina 50 por asparagina, isoleucina 265 por treonina, arginina 400 por ácido glutámico y arginina 403 por metionina. Como se mencionó previamente en el estudio genómico de la HA, las cepas argentinas aisladas en 1 999 pertenecieron al grupo B. De acuerdo a lo observado por el Centro Internacional de Referencia de Londres con respecto a la NA de aislamientos provenientes de distintas partes del mundo, las cepas incluidas en el grupo B presentaban cambios en la NA típicos de cepas virales pertenecientes a diferentes grupos genómicos definidos por este Centro (122). Esto se ve reflejado en las cepas argentinas ya que los nuevos cambios descritos previamente se corresponden con los mencionados por este Centro. Esto último indicaría que la NA de las cepas locales provienen de la reasociación de distintas variantes genómicas.

Año 2 002: Durante este año se secuenciaron cinco cepas de virus influenza B provenientes de distintas provincias argentinas. El alineamiento basado en la secuencia aminoacídica junto con el árbol de filogenia demostraron que todas las cepas estudiadas pertenecen al linaje Yamagata, al igual que las cepas estudiadas años anteriores. Este resultado sumado al estudio genómico de la HA de estas cepas citado previamente permiten concluir que durante este período circularon en nuestro país cepas de virus

influenza B resultantes de la recombinación entre los linajes similares a Yamagata y Victoria. La aparición de dichas recombinantes había sido descrita previamente por otros autores (123, 124), al igual de la ocurrencia de rearrreglos genéticos entre diferentes “clusters” de virus influenza A subtipo H3N2 que circularon en el mismo período de tiempo (125).

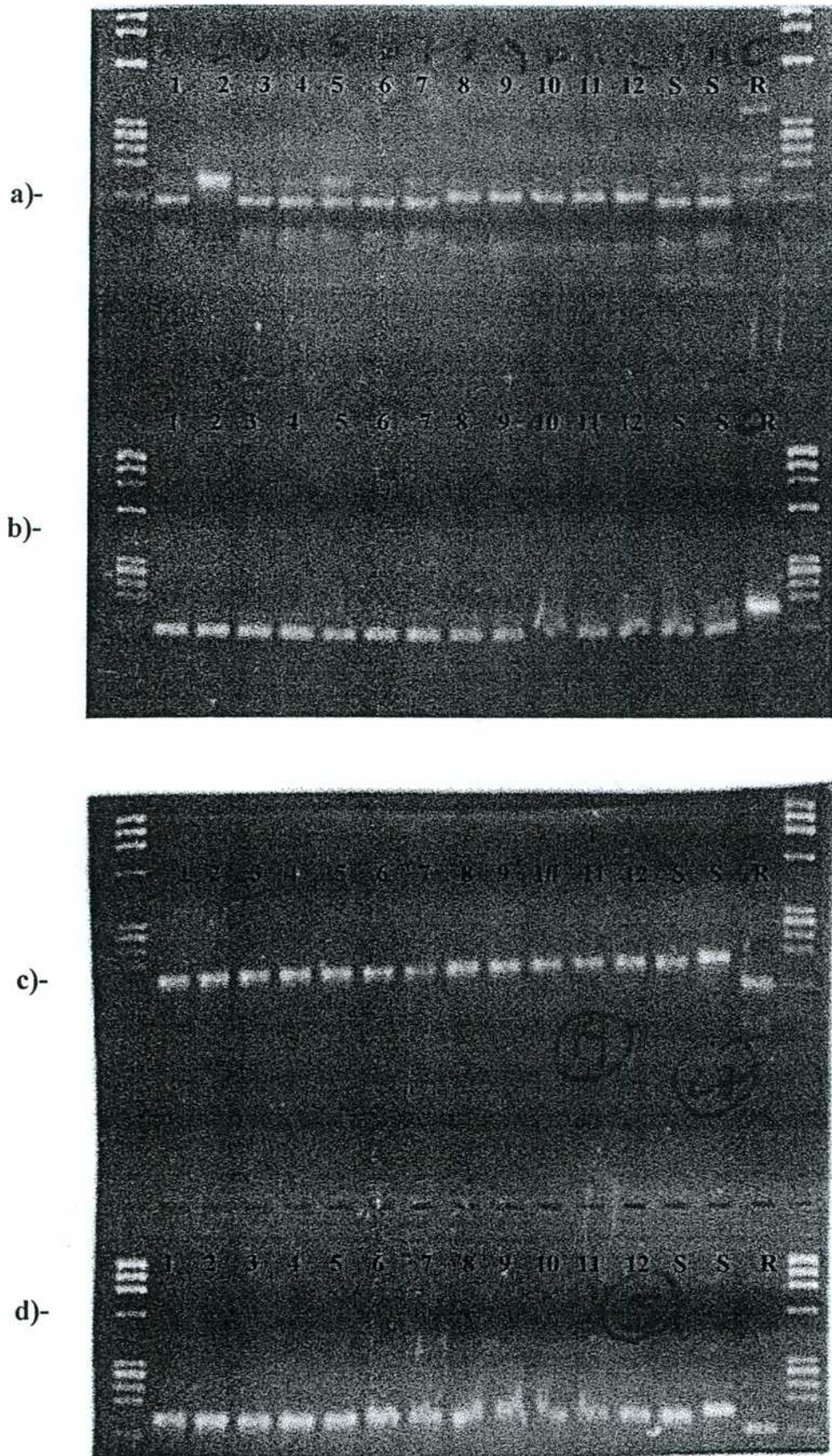
#### **IV.7- Análisis de resistencia antiviral**

En la figura 21 a, b, c y d se muestran los geles de agarosa en los cuales se sembraron los productos obtenidos luego de la digestión de los fragmentos de ADN amplificados de la proteína M2 con las enzimas Aci I, Ita I, Mwo I y Ssp I, respectivamente. De acuerdo a esta figura, todas las cepas analizadas serían sensibles a los antivirales que actúan inhibiendo a la proteína M2 con excepción de aquella que fue sembrada en la calle número 2 (A/Córdoba/V185/98) del gel correspondiente a los productos obtenidos luego de la digestión con la enzima Aci I. Este resultado implicaría que la cepa Córdoba posee un cambio en la posición que codifica para el aminoácido número 26 que implica la pérdida del sitio de restricción para la enzima Aci I. Como consecuencia de este resultado se llevó a cabo la secuenciación parcial del gen que codifica para la proteína M2 de la cepa A/Córdoba/V185/98 y su posterior traducción a aminoácidos. Comparando la secuencia de la cepa A/Córdoba/V185/98 con la de la cepa A/Leningrado/57, la cepa en estudio posee una isoleucina en la posición 26 mientras que la cepa de referencia posee una leucina. Este cambio explicaría la pérdida del sitio de restricción de la enzima Aci I en la cepa A/Córdoba/V185/98.

El cambio descrito en la bibliografía para la posición 26 que le confiere a una cepa la capacidad de resistir a la amantadina-rimantadina es de leucina a fenilalanina (126), pero no existen referencias acerca de cuales son las consecuencias a nivel biológico del cambio de leucina a isoleucina en esta posición. Por ello, se realizó el estudio de sensibilidad a la rimantadina *in vitro*.

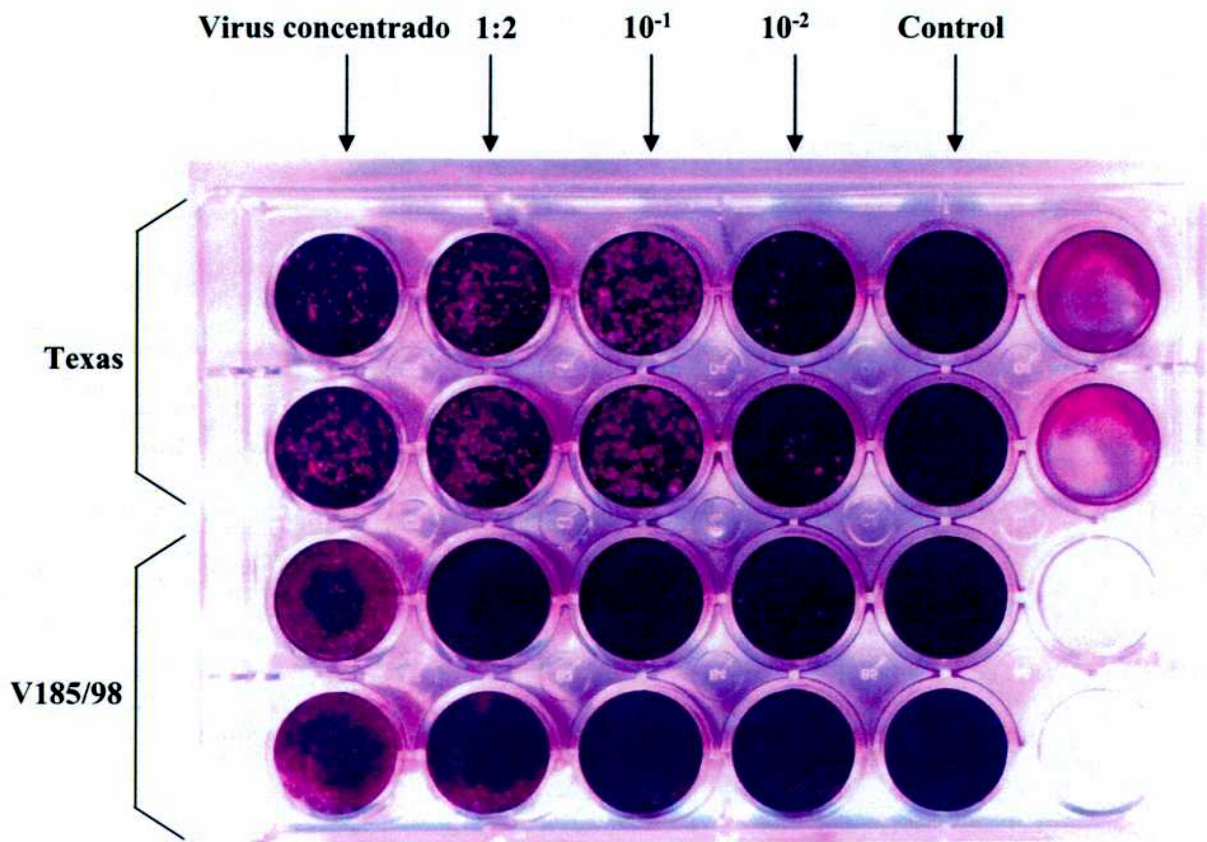
Previamente se determinó la citotoxicidad de la rimantadina para las células MDCK. No se observó un efecto deletéreo de la droga sobre la monocapa celular en el espectro de concentraciones usadas que luego fueron utilizadas en el ensayo de reducción de placas. Los títulos de virus obtenidos por plaqueo de la cepa patrón A/Texas/36/91 y de la cepa



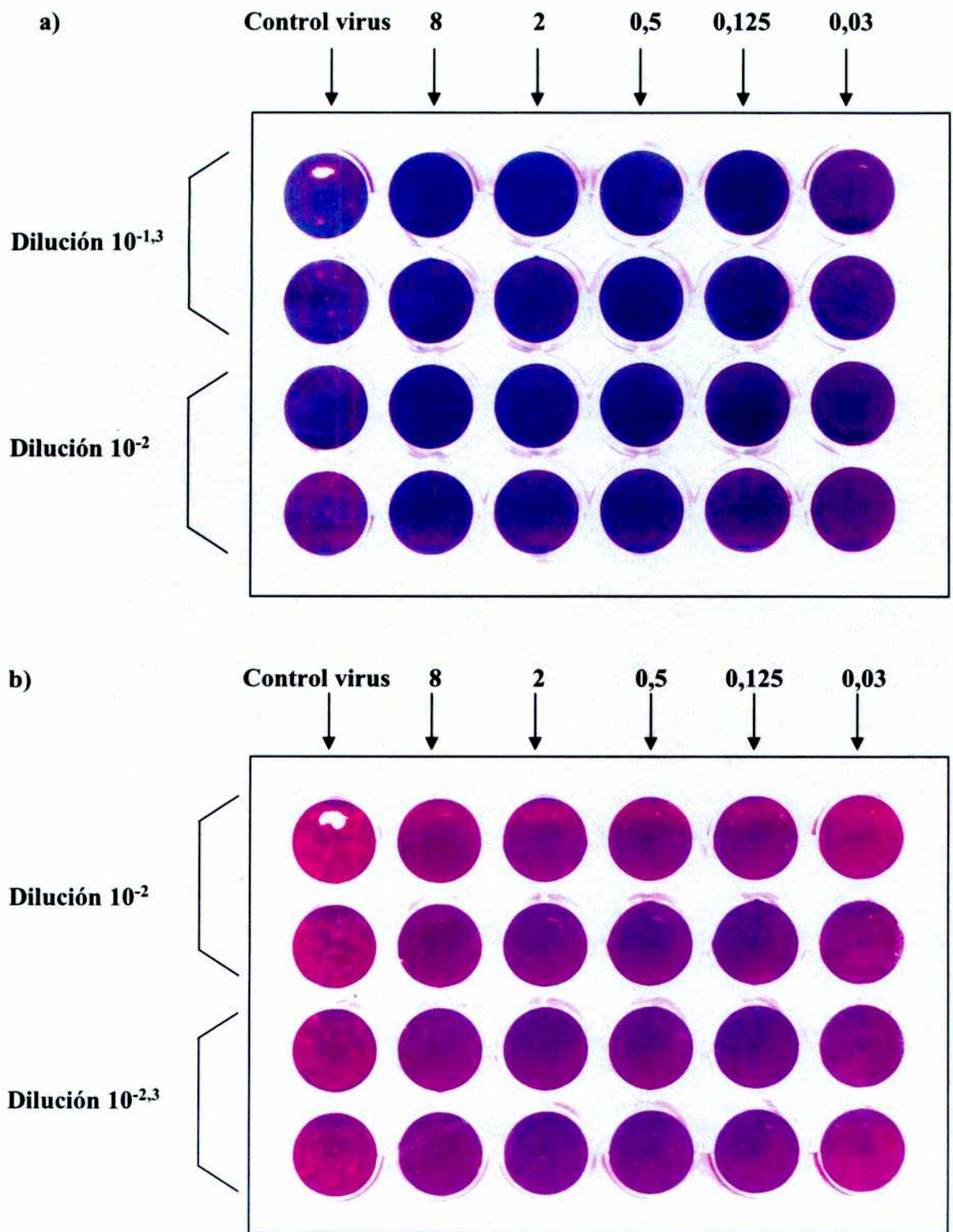


**Figura 21:** Geles de agarosa donde se corrieron los productos de la técnica de RFLPs. Enzimas de restricción: a)- Aci I; b)- Ita I; c)- Mwo I y d)- Ssp I. Las calles corresponden a las siguientes muestras: 1 (12089/97); 2 (V185/98); 3 (V425/98); 4 (M6/99); 5 (VA102/99); 6 (VL267/99); 7 (VA135/99); 8 (R18/99); 9 (VJ636/00); 10 (VJ235/00); 11 (R98/00); 12 (CS24/00); S (Cepa Sensible) y R (Cepa Resistente)

Córdoba. fueron de  $3,1 \times 10^3$  y  $3,95 \times 10^3$  respectivamente (figura 22). El mismo ensayo de plaqueo se repitió esta vez en presencia de distintas concentraciones de rimantadina: 8  $\mu\text{gr/ml}$ , 2  $\mu\text{gr/ml}$ , 0,5  $\mu\text{gr/ml}$ , 0,125  $\mu\text{gr/ml}$  y 0,03  $\mu\text{gr/ml}$  (figura 23). Se observó inhibición del número de placas para todas las concentraciones de droga analizadas mientras que hubo placas de lisis en el pocillo correspondiente a la monocapa control. De acuerdo a la bibliografía, con respecto al ensayo de reducción de placas, la concentración inhibitoria de la rimantadina oscila entre 0,1 y 0,4  $\mu\text{g/ml}$  para distintas cepas de virus influenza A humanas subtipo H1N1, H2N2 y H3N2 (127). Nuestros datos muestran que la susceptibilidad de ambas cepas mutante y control es similar y se encuentra dentro del rango descrito en la bibliografía. Aunque no hemos podido determinar la dosis DE50 con precisión, consideramos que la mutante no parece ser resistente a la rimantadina.



**Figura 22:** Titulación de las cepas A/Texas/36/91 y A /Córdoba/V185/98 mediante la técnica de plaqueo.



**Figura 23:** Ensayo de plaqueo en presencia de distintas concentraciones de rimantadina (expresada en  $\mu\text{gr/ml}$ ). a) Cepa A/Texas/36/91 y b) Cepa A/Córdoba/V185/98.



## V. DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis hemos analizado la situación epidemiológica del virus influenza en la Argentina considerando los registros de muertes por neumonía e influenza, la prevalencia del virus influenza entre las infecciones respiratorias de origen viral y caracterizando además la composición antigénica y genómica de las cepas circulantes durante el período de 1 995 a 2 002. Se han establecido también las relaciones filogenéticas entre las cepas de referencia y las cepas de virus influenza A y B aisladas en Argentina y en otros países de la región durante el período de tiempo antes mencionado. Hemos comparado, además, las relaciones antigénicas entre las cepas circulantes con las componentes que se incluyen como cepas vacunales cuyo resultado ha influido en la necesidad de realizar dos encuentros internacionales al año de modo de poder formular vacunas para la región sur en forma más apropiada.

Como resultado de la búsqueda de virus respiratorios en muestras de pacientes con IRAB, menores de cinco años, recolectadas en el laboratorio durante el período 1 995-1 999, se llegó a la conclusión de que aproximadamente el 6% de los casos son debidos a la infección por el virus influenza. Este dato coincide con lo observado por otros autores que también utilizaron el método de búsqueda de antígenos virales por IF, para la detección de virus (128). Por lo tanto, para este grupo etario, el virus influenza ocuparía el segundo o tercer lugar de importancia (dependiendo de la temporada invernal en estudio) entre los virus respiratorios causantes de enfermedad. Debido a la sub-notificación histórica de los casos de influenza y a la carencia de un análisis epidemiológico a lo largo del tiempo, no es posible evaluar el verdadero impacto de este patógeno en la salud pública, así como no se pueden establecer comparaciones con otros sistemas de notificación implementados en otros países del mundo.

En cuanto a la época del año en la cual los aislamientos de virus influenza son más predominantes, como consecuencia de los cinco años de estudio, se observó una mayor circulación de este virus entre los meses de mayo y septiembre. Este resultado es comparable con el de otros países de clima templado tanto del hemisferio norte como del hemisferio sur donde los brotes de influenza tienden a ser estacionales, ocurriendo durante los meses más fríos del año (129). En cambio, en los países de

clima tropical, la mayor circulación de los virus influenza generalmente se registra durante las estaciones de lluvia y de sequía (57).

Hasta el momento, se desconocen cuales son las razones por las que la circulación del virus influenza varía estacionalmente. Se ha especulado mucho acerca de los medios por los cuales podría ocurrir la diseminación de cepas de virus influenza entre ambos hemisferios (130). Los vehículos sugeridos incluyen las aves migratorias y el transporte de los virus en forma de aerosoles generados por personas infectadas que se movilizan de un lugar a otro por aire, mar o tierra en presencia de otras personas sanas susceptibles a la infección.

En nuestro país, no se tiene un conocimiento extenso acerca de la presencia del virus influenza en las aves silvestres, aunque hasta el momento, se lo considera libre de influenza aviar. En cuanto al control establecido a nivel gubernamental de las aves que ingresan al país, el SENASA realiza de rutina un muestreo de las aves de interés comercial para reproducción y aves exóticas ornamentales con el objeto de determinar la presencia o ausencia de anticuerpos producto de la infección por virus influenza A mediante la utilización de la técnica de precipitación en gel de agar.

Un índice útil para cuantificar el impacto que causa el virus influenza en la población es la medición del efecto que tiene esta enfermedad sobre la mortalidad registrada en las estadísticas vitales locales y nacionales. Las curvas correspondientes a la tasa de mortalidad generadas en base a la información del número de muertes por influenza y neumonías recolectada por el SINAVE para toda la población de nuestro país remarcan la importancia de los niños menores de cinco años y los adultos mayores de 65 años como los dos grupos de riesgo más expuestos a complicaciones causadas por la gripe, como se mencionó previamente (figura 9). La gran diferencia observada entre ambos grupos de riesgo radica en que a mayor edad la tasa de mortalidad aumenta aproximadamente veinte veces; si a ello le sumamos alguna condición clínica de riesgo, la incidencia puede llegar a ser treinta veces mayor en los ancianos que en los niños. Debido a ello, durante una epidemia, el 90% de las muertes por gripe y neumonías se producen en los ancianos.

A pesar de la importancia numérica del grupo de riesgo de los mayores de 50 años, la reproducibilidad de los datos obtenidos en el laboratorio sobre el estudio de la circulación viral se analizó basándose únicamente en los datos correspondientes a los niños menores de cinco años que presentaban infecciones respiratorias agudas bajas

en el período de estudio 1 995-1 999. Esta decisión se debió a que no se dispone a nivel nacional de un número comparable de muestras que permitan realizar un análisis similar para el grupo etario de los mayores de 50 años. Una de las tareas pendientes a nivel nacional es la de reforzar por medio de la Red Nacional de Laboratorios la vigilancia del virus influenza en el grupo etario que incluye a los mayores de 65 años. La escasez de muestras provenientes de pacientes de este grupo se debe, en gran medida, a la falta de conciencia de la comunidad médica, la cual tiende a considerar que el diagnóstico etiológico de la neumonía es prescindible. Con el objeto de revertir esta situación, a partir del año 2 003, el Ministerio de Salud organizó un sistema de médicos centinela dirigido al estudio de las neumonías adquiridas en la comunidad donde se incluye, entre otros, el estudio etiológico viral de la enfermedad.

En relación a la diferencia de la mortalidad observada en la figura 9 entre el año 1 999 y el resto de los años estudiados, es sorprendente que la presencia de virus que ya habían circulado previamente (cuadro 15) causara una mortalidad importante ese año, especialmente en el grupo de riesgo correspondiente a los adultos mayores de 75 años que seguramente poseían anticuerpos protectores.

Los factores que afectan el porcentaje de las muertes por neumonías e influenza incluyen: 1) la incidencia del virus influenza en la población, 2) los niveles de inmunidad pre-existente a los virus circulantes en la población general (como resultado de infecciones naturales previas o por vacunación contra el virus influenza), 3) la virulencia de los virus influenza circulantes, 4) la proporción de la población con patologías de base que hacen que sean considerados dentro del grupo de alto riesgo de padecer complicaciones y muertes atribuibles a influenza, 5) la incidencia y virulencia de otros patógenos respiratorios y 6) los factores metodológicos de detección de virus (131). Hasta el momento, se desconoce la combinación específica de estos factores que contribuyó al aumento del porcentaje de las muertes por influenza y neumonías ocurridas durante el año 1 999.

Una de las dificultades que se presentan al querer tener un cuadro más aproximado de la realidad de la enfermedad causada por el virus influenza en nuestro país consiste en que, debido a que el diagnóstico de este patógeno generalmente no se confirma mediante pruebas de laboratorio, en los certificados de defunción de muchas personas cuya muerte está relacionada con esta enfermedad no se consigna la influenza como causa de deceso. Así, varios autores (118,132), han determinado que



la magnitud de la mortalidad por influenza durante las epidemias debe obtenerse mediante la suma de la mortalidad por neumonías e influenza; sin embargo, estas mediciones sólo tienen en cuenta una fracción de las muertes relacionadas con la influenza y no son una buena medida del efecto global de la influenza sobre la mortalidad.

El análisis de la relación existente entre las notificaciones al SINAVE del número de síndromes tipo influenza y el número de aislamientos de virus influenza detectados demostró que cuando se alcanzó el máximo en el número de notificaciones, el porcentaje de recuperación de virus influenza (especialmente virus influenza tipo A) en las muestras de hisopados nasofaríngeos obtenidas de niños menores de cinco años fue mayor que el encontrado en las estaciones en las cuales el virus no fue detectado en la población. Es importante aclarar que si bien el número de aislamientos de virus influenza detectados en 1998 prácticamente duplica el número de aislamientos del mismo virus registrado durante el año 1997, esto no se debe a una mejora en el sistema de recolección de muestras utilizado. En base a este estudio es posible concluir que, el análisis de los datos de morbi-mortalidad representan herramientas epidemiológicas muy útiles para cuantificar el efecto de las epidemias causadas por el virus influenza. Sin embargo, este tipo de análisis presenta ciertas limitaciones.

En este trabajo de tesis quedó demostrado que además de los métodos de diagnóstico que se utilizan de rutina para detectar infecciones causadas por el virus influenza como ser los cultivos celulares y la determinación de antígeno, el uso de técnicas moleculares que permiten detectar directamente la presencia del virus en muestras respiratorias facilita la investigación de brotes y permiten contar rápidamente con la identificación del virus. Para complementar el estudio de la subtipificación en H1 y H3 de algunos virus influenza tipo A que no pudieron ser recuperados en cultivo, se utilizó la técnica de RT-PCR semi anidada a partir de muestras originales con diagnóstico positivo para el virus influenza A. De acuerdo a lo observado en el cuadro 13, a partir de la utilización de esta técnica fue posible conocer el subtipo viral al cual pertenecían 34 de las 59 especímenes estudiados durante el período de tiempo comprendido entre los años 1997 y 2002. La sensibilidad y especificidad de esta técnica permiten, por lo tanto, conocer el subtipo viral de cepas que por diferentes razones no pudieron ser recuperadas en cultivo. Sin

embargo, la desventaja de este tipo de ensayos radica en que no está disponible el antígeno viral necesario para llevar a cabo el análisis antigénico, como lo requiere la vigilancia del virus influenza.

Si bien la introducción de nuevas metodologías se refleja en la obtención de resultados más confiables y representativos acerca de las características de las cepas circulantes, la implementación de las mismas no se traduce en un incremento de la detección de casos positivos para el virus influenza. La variación que se observa año tras año en el número de cepas recuperadas en cultivo representada en el cuadro 12 se debe, por un lado, a la prevalencia de virus influenza durante cada temporada y por otro lado, al incentivo previo y las posibilidades de los profesionales de la salud que los motiva a enviar muestras positivas para complementar su estudio.

Algunos autores estudiaron la gravedad de las epidemias de influenza en EEUU desde 1 972 a 1 997 (133). Encontraron que a lo largo de todo el período estudiado la magnitud de la mortalidad varía en las distintas épocas epidémicas. Así, en la mayoría de las estaciones caracterizadas por la circulación del virus influenza A (H3N2), el número total de muertes relacionadas con influenza fue superior en comparación con aquellas estaciones en las que circularon virus influenza tipo A (H1N1) y tipo B.

El estudio basado en la subtipificación y la caracterización antigénica a partir de los aislamientos de virus influenza provenientes de distintas provincias de nuestro país recolectados durante el período 1 995-2 002 demostró que los virus influenza A (H3N2) circularon durante todo el período de estudio con excepción del año 2 000, en el cual se logró detectar solamente la presencia de virus influenza A (H1N1) e influenza B. Durante los años epidémicos 1 996 y 1 999, circularon ambos subtipos de virus influenza A siendo predominantes las cepas H3N2 y en 1 999 se detectó además la circulación de virus influenza B. En 1 995, a pesar de no considerarse año epidémico debido a que los datos de morbilidad coinciden con el valor esperado pero no lo superan, también se registró un exceso de muertes. Durante este año se observó la circulación de cepas influenza A (H3N2) e influenza B con predominio de las primeras. Sin embargo en 1 996 y 1 998, años en los que también circuló de forma predominante la cepa H3N2, aunque con ciertas variaciones antigénicas con respecto a las cepas que circularon en los inviernos de años anteriores, no se produjo ningún exceso de mortalidad. Esto podría explicarse debido a que en el desarrollo de una

epidemia de influenza, no solo la aparición de antígenos nuevos y la existencia de inmunidad en la población, sino también otros factores como las condiciones socio-económicas de la población así como la temperatura, la contaminación ambiental y la humedad relativa, podrían influir sobre la actividad del virus influenza y por ende sobre la mortalidad, como se mencionó previamente. Finalmente, durante los años 2 001 y 2 002 circularon ambos subtipos de virus influenza A (H3N2 y H1N1) e influenza B.

Al comparar las características antigénicas y genómicas de las cepas circulantes de virus influenza A y B se observó una gran homogeneidad entre las cepas provenientes de distintas provincias argentinas durante todo el período de estudio. Por otro lado, si bien el número de muestras y aislamientos provenientes de otros países de la región fue menor al número de aislamientos argentinos estudiados, se observó una similitud parcial entre la circulación de los virus influenza B aislados en Argentina respecto de los aislados en Brasil, Paraguay y Uruguay. Durante los años 2 000 y 2 001 se detectaron en este estudio cepas de virus influenza B en la Argentina pero no en otros países de la región. En el año 2 002, todas las cepas de virus influenza B circulantes en Argentina fueron similares a la cepa Hong Kong mientras que en Brasil co-circularon cepas de virus influenza B con características antigénicas similares tanto a la cepa Hong Kong como a la cepa Shizuoka. Finalmente, al comparar los árboles de filogenia construidos con cepas argentinas y de la región con aquellos obtenidos por otros países de ambos hemisferios que incluyen las mismas cepas de referencia que se utilizaron en este estudio, fue posible observar que la topología general de los mismos no varía dentro del período de estudio analizado, a pesar de que, en algunas ocasiones, la aparición de nuevas variantes en el tiempo varía entre países de distintos hemisferios e incluso entre países que pertenecen al mismo hemisferio pero que no presentan las mismas condiciones climáticas (134).

Por otro lado, fue posible establecer la relación existente entre las cepas circulantes y las cepas vacunales correspondientes para cada período. Con respecto a las cepas de virus influenza A subtipo H3N2, las cepas circulantes en la población no coincidieron con la componente vacunal durante los primeros años de este estudio y recién comenzaron a hacerlo a partir del año 1 999. El gran desfase observado durante los primeros años de este estudio se vio remarcado con la emergencia de la cepa A/Sydney/5/97 que comenzó a circular por primera vez en nuestro país durante la

segunda mitad del año 1 997 dando origen a un brote epidémico importante. Esta fue la cepa prototipo recomendada por la OMS para ser incluida en la fórmula vacunal utilizada en el hemisferio norte durante la temporada 1 998-1 999 pero no fue implementada como componente vacunal para el hemisferio sur hasta 1 999. La abrupta introducción de la cepa Sydney y los efectos causados por ella en distintos países del hemisferio sur hicieron que la autoridades de la OMS evaluaran la necesidad de organizar una segunda reunión anual para decidir la fórmula vacunal en base a la circulación de cepas de este hemisferio. La implementación definitiva de esta nueva reunión se logró de acuerdo al estudio de las cepas circulantes y su comparación con las cepas vacunales. Los beneficios de la misma llevada a cabo a partir del año 1 998 se ven reflejados en los resultados de la vigilancia obtenidos entre 1 999 y 2 002, años durante los cuales las cepas de virus influenza A subtipo H3N2 coincidieron plenamente con sus correspondientes componentes vacunales.

El punto crítico de emergencia de las principales variantes antigénicas está enfatizado por las relaciones filogenéticas entre los genes que codifican para la HA viral. La figura 16 refleja que el gen de la HA de las cepas H3 ha evolucionado como un único linaje y se sabe que el mismo se estableció luego de la introducción de los virus H3N2 en la población humana en 1 968, ubicándose las variantes significativas desde el punto de vista epidemiológico cerca del tronco principal del árbol (135). Así como queda ilustrado por los cinco cambios realizados en la componente vacunal entre 1 995 y el 2 002, las nuevas variantes antigénicas pueden originarse con una frecuencia de una cada 1 ó 2 años, a pesar de que los cambios antigénicos han sido menos marcados desde la emergencia de las cepas similares a la cepa A/Sydney/5/97. Por lo tanto, el reemplazo de variantes pre-existentes, en general, ocurre con gran rapidez. El análisis de las secuencias nucleotídicas del gen de la HA permite también distinguir la emergencia de otras variantes, algunas de las cuales quizás representen cepas intermediarias que preceden la emergencia de variantes antigénicas subsecuentes. Por ejemplo, una variante representada por la cepa A/Thessalonika/1/95 presenta una secuencia de aminoácidos intermediaria entre las secuencias de las cepas A/Johannesburg/33/94 y A/Wuhan/359/95 y fue la cepa predominante antigénicamente similar a Johannesburg que circuló en Argentina durante 1 995, previo a la emergencia de la cepa Wuhan. Con respecto a la cepa A/South Africa/1147/96, que fue representativa de los virus que circularon mayoritariamente

en 1 996, fue intermediaria en la emergencia de la cepa Sydney. A pesar de que variantes distinguibles son capaces de co-circular (por ejemplo, la cepa A/Buenos Aires/4634/96 fue la única cepa aislada en 1 996 que presentó características antigénicas y genómicas similares a las de las cepas aisladas durante el año anterior), éstas generalmente persisten únicamente durante períodos cortos y son rápidamente reemplazadas por variantes subsecuentes. Así, a pesar de la variación entre los virus de influenza A subtipo H3N2, generalmente existe un alto grado de semejanza entre los virus predominantes causantes de brotes en diferentes partes del mundo. Esto explicaría la gran similitud de las características antigénicas y genómicas observadas entre las cepas argentinas y las cepas estudiadas provenientes de otros países de la región y del mundo.

La caracterización antigénica de cepas de virus influenza A que circularon en Argentina durante 1 998, demostró que una de ellas, la cepa A/Tucumán/V425/98, reaccionó con bajo título frente al inmunosuero generado con la cepa Sydney. Posteriormente, el análisis genómico demostró que, a pesar de las diferencias observadas en el test de IHA, esta cepa pertenecía al grupo genómico representado por la cepa Sydney. Los cambios aminoacídicos que podrían explicar su diferente reactogenicidad en comparación con las otras cepas locales aisladas ese año y la cepa Sydney son: glicina 129 por ácido glutámico, leucina 194 por isoleucina y valina 223 por isoleucina, estando los dos primeros dentro del sitio antigénico B, el cual se encuentra ubicado cerca del sitio de unión al receptor celular por lo cual algunos de estos cambios o la combinación de ellos podría ser la causa de un comportamiento diferente de esta cepa en el momento de interaccionar con los glóbulos rojos de pavo en el test de IHA.

Los virus pertenecientes al subtipo H1N1 fueron los responsables de la devastadora pandemia de 1 918-1 919 que causó entre 20 y 50 millones de muertes en todo el mundo. A pesar de que la tasa de acumulación de mutaciones de los genes que codifican para la HA y la NA son comparables con las de los virus subtipo H3N2 y la estructura antigénica de la HA<sub>1</sub> es similar a la de los virus H3 (136), los cambios antigénicos ocurren con menor frecuencia, lo cual se evidencia en la menor cantidad de cambios recomendados para la componente vacunal H1N1 desde 1 977. De hecho, aislamientos similares a la cepa A/Bayern/7/95 realizados en Argentina y la región hasta el año 1 999, luego de 13 años, estaban antigénicamente relacionados con la cepa A/Singapore/6/86. En contraste con los cambios antigénicos entre las cepas de

virus influenza a subtipo H3N2, las variantes antigénicas que emergieron en 1986, representada por la cepa Singapore y 1995, representada por la cepa A/Beijing/262/95, no evolucionaron directamente a partir de virus que circularon previamente y representan diferentes linajes que circulan al mismo tiempo. Las diferencias antigénicas que se observan entre ambos linajes parecen deberse en gran medida a la supresión del nucleótido ubicado en la posición 130 de la porción HA<sub>1</sub> de la HA (1 de los 10 aminoácidos característicos diferencian ambos linajes, como se observa en el cuadro 22) presente en las cepas similares a la cepa Beijing. Las cepas H1N1 que circularon en la Argentina entre 1997 y 1999 presentaron características similares a la cepa Bayern. Esta cepa estuvo presente en la fórmula vacunal únicamente en el año 1998, siendo en 1999 reemplazada por la cepa A/Beijing/262/95. A pesar de que el antisuero generado contra la cepa A/Beijing/262/95 reconoce con bajo título de IHA a la cepa A/Bayern/7/95 (IHA:80), estudios serológicos en humanos revelaron que la vacuna que incluía a la cepa A/Beijing/262/95 producía altos títulos de anticuerpos capaces de reconocer y proteger en forma cruzada frente a una infección generada por la cepa A/Bayern/7/95 (137) A partir del año 2000, las cepas H1N1 circulantes coincidieron plenamente con sus correspondientes cepas vacunales.

Para el caso de los virus influenza B, las cepas circulantes no coincidieron con las vacunales en 1995 y en el 2002, y coincidieron parcialmente en el año 2001, debido que durante este año se observó una co-circulación de cepas pertenecientes al mismo linaje (Sichuan y Shizuoka), pero distinguibles desde el punto de vista antigénico ya que la cepa Shizuoka está considerada una variante antigénica menor de la cepa Sichuan. En el año 2000, después de cuatro años consecutivos de estar presente en la fórmula vacunal la cepa B/Beijing/184/93, se decidió considerarla como un componente vacunal alternativo a una cepa más reciente, la cepa B/Yamanashi/166/98. Todos los aislamientos locales de ese año, que habían sido mejor reconocidos por el inmunosuero Yamanashi, en comparación con el inmunosuero Beijing, presentaron únicamente dos cambios aminoacídicos con respecto a la cepa Yamanashi, valina 29 por alanina y valina 300 por isoleucina. Estos resultados confirman que la actualización del componente B en la fórmula vacunal fue acertada.

La evolución de los virus influenza B se caracteriza por la co-circulación de linajes que se diferencian a nivel antigénico y genómico durante largos períodos de

tiempo. Ambos linajes, definidos en base a la relación filogenética de los genes de la HA, divergieron entre los inicios y mediados de la década de los 70, uno representado por la cepa B/Victoria/2/87 y el otro representado por la cepa B/Yamagata/16/88 (138). En base a los resultados obtenidos en la técnica de IHA y en el estudio de filogenia basado en la porción HA<sub>1</sub> de la HA viral, todas las cepas que circularon tanto en la Argentina como en otros países de la región hasta el año 2 001 inclusive pertenecieron al linaje Yamagata, mientras que en el año 2 002 se detectó la re-emergencia del linaje Victoria a partir de la circulación de las cepas B/Hong Kong/330/01 y B/Hong Kong/1351/02. Si bien durante el año 2 002 todas las cepas aisladas en la Argentina pertenecieron al linaje Victoria, en Brasil se observó una co-circulación de cepas pertenecientes a ambos linajes. El predominio de las cepas pertenecientes al linaje Victoria en distintas regiones geográficas llevó a la OMS a incluir como componente vacunal de la fórmula 2 003 a la cepa B/Hong Kong/330/01.

A pesar de que las cepas Hong Kong 330 y Hong Kong 1351 pertenecen a sublinajes diferentes dentro del mismo linaje, los resultados de la técnica de IHA demostraron que el inmunosuero generado contra la cepa Hong Kong 1351 reaccionó mejor con las cepas locales en comparación con el inmunosuero Hong Kong 330. Esta diferencia se debería a que el primero fue generado a partir de una cepa que presenta un nuevo sitio de glicosilación que el segundo no posee pero que está presente en las cepas argentinas, como se observa en el cuadro 23 (Klimov A. comunicación personal). El linaje Victoria había circulado por última vez en nuestro país en 1 988, causando en ese momento un brote epidémico de considerable magnitud. Como se mencionó previamente, dentro del linaje Victoria se reconocen dos sublinajes o grupos definidos en base a la secuencia nucleotídica de la HA, Hong Kong 330 y Shandong 7. Durante el año 2 002, todas las cepas argentinas secuenciadas ese año presentan cinco cambios aminoacídicos con respecto a la cepa Hong Kong 330 y sólo dos en comparación con la cepa Shandong, por lo tanto es posible asegurar que todas las cepas argentinas pertenecen, desde el punto de vista genómico, al grupo 2. Uno de los cambios es común a todas las cepas locales y corresponde al aminoácido ubicado en la posición 121 donde la cepa Shandong posee una isoleucina mientras que las cepas argentinas poseen una treonina. El otro cambio se ubica en la posición 199 donde la cepa de referencia presenta un ácido glutámico y las cepas argentinas poseen en algunos casos isoleucina y en otros treonina. La posición 199 es uno de los sitios de glicosilación en la molécula de HA en

los virus influenza B. Cuando en esta posición está presente el aminoácido treonina, este sitio debería estar glicosilado, en cambio cuando están presentes los aminoácidos asparagina, isoleucina o alanina, este sitio no está glicosilado. La cepa Hong Kong 330 no está glicosilada en esta posición, en cambio, la cepa Hong Kong 1351 sí. En base a todo lo dicho previamente, nosotros podemos concluir que la diferencia en la posición 199 entre las cepas locales sería la única que justificaría su comportamiento antigénico desigual ya que todas las cepas que reaccionan con altos títulos de IHA frente al antisuero Hong Kong 330 no poseen glicosilación en la posición 199 mientras que todas las que reaccionan con bajo título sí.

Como se mencionó previamente, los anticuerpos dirigidos contra la NA viral no son capaces de neutralizar la infectividad del virus pero se sabe que cumplen un papel importante que consiste en reducir la diseminación viral y por lo tanto ejercen una presión de selección considerable. Si bien la variabilidad antigénica de la proteína NA también debe ser considerada tanto en el análisis del impacto epidémico de las cepas de virus influenza como también en la predicción de la emergencia de nuevas cepas, en este trabajo de tesis no se realizaron estudios de caracterización antigénica de la NA debido a la complejidad de las técnicas disponibles para ello y a su escasa confiabilidad.

Los genes de la NA de los virus influenza A subtipo H3N2 presentan una relación filogenética similar a la observada para la HA viral, como se observa en la figura 19 y han experimentado un grado de cambio similar durante los últimos 33 años. Muchos de los cambios aminoacídicos asociados con cambios antigénicos se ubican en la superficie de la enzima alrededor del sitio catalítico (139).

Aún se desconoce la interacción que existe entre los cambios aminoacídicos que ocurren en la HA y en la NA durante la evolución de estos virus. Sin embargo, aparentemente, dichas proteínas variarían en forma independiente de manera tal que los cambios significativos en la antigenicidad de la NA no necesariamente coinciden con aquellos que ocurren en la HA (125). Por ejemplo, luego de la emergencia de los virus similares a la cepa A/Sydney/5/97, se observaron mayores cambios en la NA con la emergencia de una NA distinguible desde el punto de vista antigénico que estaba representada por la cepa A/Moscow/10/99. En la figura 19 se distinguen tres grupos representados por las neuraminidasas de las cepas A/Johannesburg/29/98, A/Panamá/2007/99 y A/Moscow/19/99. Las cepas argentinas y de la región aisladas durante los años 1998 y 1999 que desde el punto de vista antigénico y genómico



presentan una HA similar a la cepa vacunal Sydney, poseen una NA que se ubica en el grupo de filogenia representado por la cepa A/Johannesburg/29/98. Así, la co-circulación de algunas variantes de cepas H3N2 con diferentes combinaciones de distintas cepas aisladas en 1 998 y 1 999 indican la importancia de las reasociaciones de los genes de la HA y la NA en la emergencia de las variantes epidémicas.

Como se esperaba, la circulación de virus pertenecientes a diferentes linajes en el mismo momento del año y en la misma zona geográfica dio origen a nuevas cepas producto de la reasociación genética de distintos virus influenza B. Así, las cepas argentinas aisladas durante el año 2 002, al igual que otros virus que fueron predominantes en varias partes del mundo como ser África, América y Europa entre 1 992 y 1 996 (123), poseen una HA perteneciente al linaje Victoria y una NA perteneciente al linaje Yamagata.

Así, de acuerdo al análisis de los resultados obtenidos en los estudios antigénicos y genómicos de las cepas circulantes, particularmente para las cepas de virus influenza A subtipo H3N2, es posible concluir que estos estudios se complementan y que es necesario el desarrollo de ambos si lo que se desea es obtener una conclusión confiable que mejor refleje la realidad con respecto a la definición de nuevas variantes. Estos estudios sirven también para demostrar que el lugar de origen de nuevas variantes antigénicas tanto de los virus influenza A como de los virus influenza B es aleatorio. Si bien la gran parte de las nuevas variantes producto tanto de cambios antigénicos menores como mayores de las proteínas superficiales de la partícula viral se han originado en el Asia, algunas de ellas también han sido detectadas por primera vez en otros países como ser Australia o Grecia. Además vemos que no existe un patrón definido que explique el movimiento de las cepas de virus influenza en el mundo. Por ejemplo, la cepa de virus influenza A Sydney que circuló por primera vez en la Argentina en el mes de octubre de 1 997, se aisló en Australia en el mes de junio y no fue detectada en el hemisferio norte hasta la temporada invernal del año 1 998. Mientras que la cepa de virus influenza B Hong Kong 330, se detectó primero en Estados Unidos en marzo del 2 002 y luego en el invierno del mismo año en nuestro país.

Las drogas amantadina y rimantadina son alternativas aunque no igualmente importantes y eficientes como la vacuna para la prevención de la enfermedad causada por el virus influenza tipo A. El uso de ambas drogas para tratamiento se ha asociado

con la selección rápida y desarrollo de virus resistentes. Además, como se mencionó previamente, existe la posibilidad de que se originen cepas resistentes naturalmente, sin haber recibido tratamiento previo con amantadina o rimantadina. La base molecular del cambio a la susceptibilidad de amantadina y rimantadina causado por las mutaciones en las posiciones 26, 27, 30 y 31 no se conoce hasta el momento. Estructuralmente, la introducción de un aminoácido más polar o más cargado podría alterar la disposición de la proteína M2 en la membrana, pero se desconoce si la droga se une directamente al canal iónico o si una mutación que altera el canal iónico es capaz de afectar el pegado de la droga a otro sitio cercano. Mediante las técnicas de RT-PCR y RFLPs utilizadas para el estudio de la proteína M2 de doce aislamientos de virus influenza A recolectados entre los años 1997-2000, fue posible concluir que una de ellas, la cepa A/Córdoba/V185/98 (H3N2) presenta un cambio aminoácido en la posición 26 de leucina a isoleucina. Al querer determinar si este cambio le confería a nivel biológico la capacidad de no ser sensible a la rimantadina, se vio que tanto la cepa patrón Texas como la cepa Córdoba fueron inhibidas con todas las concentraciones de droga analizadas *in vitro*, entre las cuales se incluyó la  $CI_{50}$  establecida para la rimantadina. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la cepa Córdoba se comportaría como una cepa sensible a la rimantadina, al igual que el resto de los aislamientos analizados. En un estudio en el cual se analizaron 2017 cepas de virus influenza A aisladas en distintos países del mundo llevado a cabo por el CDC de Atlanta, USA, se observó que sólo un 0,8% de las cepas eran resistentes a la droga (140). Por lo tanto, debido que el número de muestras estudiadas fue bajo, era esperable la baja o nula detección de cepas resistentes. A pesar de ser un estudio preliminar, este análisis permitió conocer por primera vez las características a nivel de la proteína M2 de cepas aisladas en la región recientemente.

En los últimos años, se ha reconocido la importancia del virus influenza como productor de una enfermedad emergente y reemergente, por lo que en varias reuniones de expertos se ha planteado la necesidad de prepararse para una nueva pandemia. Una situación de alarma producida por una pandemia será detectada por un aumento abrupto en las notificaciones de síndrome tipo influenza asociado al aumento del porcentaje de muestras clínicas positivas para el virus influenza seguido por un aumento de la mortalidad. Si bien la OMS ha establecido grupos especiales de trabajo en distintos países, frente a la eventualidad de una pandemia, el apoyo que pueda

brindar este organismo a nivel mundial sería limitado. De ahí la importancia del programa de control que establezca cada país que va a depender, en gran medida, de la vigilancia epidemiológica y de las herramientas de trabajo con las cuales se disponga localmente. La aparición de una nueva cepa pandémica de virus influenza A probablemente implique la necesidad de generar nuevos métodos de detección para confirmar su presencia. La metodología y el análisis de las cepas circulantes desarrollados a lo largo de este trabajo de tesis, además del aporte de información que representó hasta el momento, podrían ser utilizados como base para el desarrollo tanto de métodos de diagnóstico como de técnicas que se requieran para estudios más avanzados.




---

Celia E. Coto



---

VILMA L. SAURY



---

ANDRÉS ANTONIO



## VI. CONCLUSIONES

- ✓ El estudio de virus respiratorios en muestras de pacientes con IRAB menores de cinco años recolectadas en el laboratorio durante el período 1 995-1 999 reveló que aproximadamente el 6% de los casos son debidos a la infección por el virus influenza, ocupando así este patógeno el segundo o el tercer lugar en importancia entre los virus respiratorios estudiados.
- ✓ De acuerdo a los datos de morbilidad basados en el número de notificaciones de síndrome tipo influenza durante el período 1 995-2 001 recolectados por el SINAVE, los períodos considerados epidémicos fueron el año 1 996, la segunda mitad del año 1 997 y en 1 999. Por otro lado, el análisis de la mortalidad por influenza y neumonías indicó que se registró un exceso de muertes sólo en 1 999. Finalmente, al comparar los datos de morbilidad con el número de aislamientos positivos para el virus influenza detectados en el laboratorio se vio que los máximos de ambas curvas coincidieron plenamente durante todo el período de estudio
- ✓ La caracterización antigénica de las cepas de virus influenza aisladas en Argentina durante el período 1 995-1 999 y su comparación con cepas vacunales demostró que las cepas circulantes de virus influenza A (H3N2) no se relacionaron cercanamente, desde el punto de vista antigénico, con sus correspondientes cepas vacunales durante los primeros años de este estudio y recién comenzaron a hacerlo a partir del año 1 999. Por otro lado, los virus influenza A (H1N1) que circularon en 1 999 tampoco se relacionaron cercanamente con sus correspondientes cepas vacunales. Los virus influenza B circulantes no se relacionaron cercanamente con las cepas vacunales en 1 995 y en el 2 002 y sí lo hicieron parcialmente en el año 2 001, registrándose tanto en el año 2001 como en el año 2 002 una co-circulación de cepas.
- ✓ Al comparar las características antigénicas y genómicas de las cepas circulantes de virus influenza A y B se observó una gran homogeneidad entre las cepas

provenientes de distintas provincias argentinas durante todo el período de estudio. El mismo estudio realizado con los aislamientos provenientes de distintos países del Cono Sur aislados entre 1999 y el 2002 estableció que si bien las características antigénicas de las cepas de virus influenza A que circularon en los países de la región fueron similares a las que se observaron para las cepas argentinas, las características antigénicas de los virus influenza B que circularon en Brasil en el año 2002 coincidieron parcialmente con las de las cepas argentinas aisladas ese año.

- ✓ El análisis de los resultados obtenidos en los estudios antigénicos y genómicos de las cepas circulantes, particularmente para las cepas de virus influenza A subtipo H3N2, demostró que estos estudios se complementan y que es necesario el desarrollo de ambos si lo que se desea es obtener una conclusión confiable que refleje mejor la realidad con respecto a la definición de nuevas variantes.
- ✓ El estudio preliminar de resistencia antiviral a la rimantadina realizado a partir de 12 de cepas de virus influenza A aislados en Argentina y en el Paraguay entre el año 1997 y el 2002 sugeriría que todos los aislamientos analizados serían sensibles a la acción de esta droga.



## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Weissenbacher, M. C. Y Ávila M. A.** Los virus como causa de IRA alta y baja en niños: características generales y diagnóstico. Pag: 89-106. En *Infecciones Respiratorias en niños*. Edit. Benguigui Y., López Antuñano F. J., Schmunis G. Y Yunes J. Oficina Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Serie HCT/AIEPI-1, Washington D.C., 1997.
2. Defunciones de menores de cinco años, indicadores seleccionados, Argentina 2000. Dirección de Estadística e Información de Salud; Subsecretaría de Relaciones Sanitarias e Investigación en Salud; Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias, Ministerio de Salud. Boletín anual, julio de 2002.
3. **Weissenbacher M., Carballal G., Avila M., Salomon H., Harisiadi J., Catalano M., Cequeiro M. C. and Murtagh P.** Etiologic and clinical evaluation of acute lower respiratory tract infections in young Argentinean children: an overview. 1990. *Rev Infect Dis* 12: S889-S898.
4. **Grmek, M.** *Les Maladies a l' Aube de la civilization Accidentale*. 1893. Payot, Paris.
5. **Hirsch, A.** *Handbook of Geographical and Historical Pathology*. 1883. New Sydenham society, London.
6. **Smith W., Andrewes C. H. and Laidlaw P. P.** A virus obtained from influenza patients. 1933. *Lancet* ii, 66-68.
7. **Francis T. Jr.** A new type of virus from epidemic influenza. 1940. *Science* 92: 405.
8. **Taylor R. M.** A further note on 1233 (influenza C) virus. 1951. *Arch. Gesamte Virusforsch* 4: 485.
9. **Burnet F.M.** Influenza virus on the developing egg. 1936. *Brit. J. Exp. Pathol.* 17: 282.
10. **Hirst G. K.** The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. 1941. *Science* 94: 22.
11. **Wilson I.; Skehel J. and Wiley D.** Structure of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 30 resolution. 1981. *Nature* 289:366-373.



12. **Plotch, S.; Bouloy M.; Ulmanen, I. and Krug, M.** A unique cap (m<sup>7</sup>GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. 1981. *Cell* 23: 847-858.
13. **Skehel, J.** Polypeptide synthesis of influenza virus-infected cells. 1972. *Virology* 56: 394-9.
14. **Whittaker, G.; Bui, M. and Helenius, A.** The role of nuclear import and export in influenza virus infection. 1996b. *Trends Cell Biol* 6: 67-71.
15. **Hay, A.** The action of adamantanamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. 1992. *Sem Virol* 3: 21-30.
16. **Hughey, P.; Roberts, P.; Holsinger, L.; Zebedee, S.; Lamb, R. and Compans, R.** Effects of antibody to the influenza A virus M2 protein on M2 surface expression and virus assembly. 1995. *Virology* 212: 411-21.
17. **Zebedee, S. and Lamb, R.** Growth restriction of influenza A virus by M2 protein antibody is genetically linked to the M1 protein. 1989. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1061-5.
18. **Webster, R.; Kendal, A. and Gerhard, W.** Analysis of antigenic drift in recently isolated influenza A (H1N1) viruses using monoclonal antibody preparations. 1979. *Virology* 96: 258-264.
19. **Yamashita, M. Krystal, M. Fitch, W. and Palese, P.** Influenza B virus evolution: Co-circulating lineages and comparison of evolutionary patterns with those of influenza A and C viruses. 1988. *Virology* 163: 112-122.
20. **Both, G. and Sleight, M.** Complete nucleotide sequence of the hemagglutinin gene from a human influenza virus of the Hong Kong subtype. 1980. *Nucl Acid Res* 8:2561-2575.
21. **Both, G. and Sleight, M.** Conservation and variation in the hemagglutinin of Hong Kong subtype influenza viruses during antigenic drift. 1981. *J Virol* 39:663-672.
22. **Wiley, D.; Wilson, J. and Skehel, J.** Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza hemagglutinins and their involvement in antigenic variation. 1981. *Nature* 289:373-378.
23. **Krystal, M.; Young, J. and Palese, P.** Sequential virus mutations in hemagglutinins of influenza B isolates: Definition of antigenic domains. 1983. *Proc Natl Acad Sci* 80:4527-4531.

24. **Crosby, A.** *Epidemic and Peace*, 1918. 1976. Greenwood Press, Westford, CT.
25. **Gething, M.; Bye, J. and Skehel, J.** Cloning and DNA sequence of double stranded copies of hemagglutinin genes from H2 and H3 strains elucidate antigenic shift and drift in human influenza virus. 1980. *Nature* 287:301-306.
26. **Winter, G.; Fields, S. and Brownlee, G.** Nucleotide sequence of the hemagglutinin gene of a human influenza virus H1 subtype. 1981. *Nature* 292:72-73.
27. **Scholtissek C, Rohde W, von Hoyningen V and Rott R.** On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. (1978a). *Virology* 87: 13-20.
28. **Fang, R.; Min Jou, W. and Huylebroeck, D.** Complete structure of A/duck/Ukraine/63 influenza hemagglutinin gene: Animal virus as progenitor of human H3 Hong Kong 1968 influenza hemagglutinin. 1981. *Cell* 25:315-323.
29. **Masurel, N.** Relation between Hong Kong virus and former human A2 isolates and the A/equi 2 virus in human sera collected before 1957. 1969. *Lancet* 1:907-910.
30. **Davenport, F.; Minuse, E. and Hennessy A.** Interpretations of influenza antibody patterns of man. 1969. *Bull WHO* 41:453-460.
31. **Dingle, J.; Badger, D. and Jordon, W.** *Illness in the home: a study of 25,000 illnesses in a group of Cleveland families.* 1964. Cleveland, OH: Press of Western Reserve University 162-187.
32. **Louria, D.; Blumenfeld, H.; Ellis, J.; et al.** Studies on influenza in the pandemic of 1957-1958. II. Pulmonary Complications of Influenza. 1959. *J Clin Invest* 38: 213-265.
33. **Wright, P.; Thompson, J.; Mc Kee, K.; et al.** Patterns of illness in the highly febrile young child: epidemiological, clinical and laboratory correlates. 1981. *Pediatrics* 67: 694-700.
34. Centers for Disease Control and Prevention. 1996. *MMWR* 45 (RR-5), 1-24.
35. **Oseasohn, R.; Adelson, L. and Kaji, M.** Clinic and pathologic study of thirty-three fatal cases of asian influenza. 1959. *N Engl J Med* 260: 509-518.
36. **Nicholson, K.G.** *Semin. Respir.* 1992. *Infect.* 7, 26-37.

37. **Douglas R.** Influenza in man. In: Kilbourne DE, de. *The Influenza Viruses and Influenza*. 1975. New York: Academic Press: 395-447.
38. **Hinshaw, V.; Olsen, C.; Dybdahl-Sissoko, N. and Evans, D.** Apoptosis: A mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. 1994. *J. Virol.* 68:3667-3673.
39. **Takisawa, T.; Fukuda, R.; Miyawaki, T.; et al.** Activation of the apoptotic Fas antigen-encoding gene upon influenza virus infection involving spontaneously produced beta-interferon. 1995. *Virology* 209: 288-296.
40. **Jordan, W.; Denny, F. and Badger, G.** A study of illness in a group of Cleveland families. XVII. The occurrence of Asian influenza. 1958. *Am J Hyg* 68: 160.
41. **Hall C. and Douglas, R.** Nosocomial influenza infection as a cause of intercurrent fevers in infants. 1975. *Pediatrics* 55: 673.
42. **Stanley, E. and Jackson G.** Viremia in asian influenza. 1966. *Trans Assoc Am Physicians* 79: 376-387.
43. **Cruz, J.; Quinonez, E.; Ferandez, A. and Devalte, F.** Isolation of viruses from nasopharyngeal secretions. Comparison of aspiration and swabbing as means of sample collection. 1987. *J Infect Dis* 156: 415-416.
44. **Dowdle, W. and Schild, G.** Laboratory propagation of human influenza viruses, experimental host range, and isolation from clinical material. 1975. In: Kilbourne, E.D. (de.). *The Influenza Viruses and Influenza*, pp. 243-68. Academic Press, New York.
45. **Govorkova, E.; Murti, G.; Meignier, B.; de Taisne, C. and Webster, R.** African Green Monkey Kidney (vero) cells provide an alternative host system for influenza A and B viruses. 1996. *J Virol* 70: 5519-5524.
46. **Warner, J.; Todd, S.; Shalaby, H. et al.** Comparison of Directigen Flu A with viral isolation and direct immunofluorescence for the rapid detection and identification of influenza A virus. 1991. *J Clin Microbiol.* 29: 479-482.
47. **Doller, G.; Schuy, W.; Tjhen, K.; et al.** Direct detection of influenza virus antigen in nasopharyngeal specimens by direct enzyme immunoassay in comparison with quantitating virus shedding. 1992. *J Clin Microbiol.* 30: 866-869.

48. **Class, E.; Sprenger, M.; Kleter, G.; et al.** Type specific identification of influenza viruses A, B, and C by the polymerase chain reaction. 1992. *J Virol Methods*. 39:1-13.
49. **Dowdle, W.; Kendal, A. and Noble, G.** Influenza viruses. In: **Lenette E.; Schmidt N.**; eds. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections*. 1979. Washington, DC: American Public Health Association 603-605.
50. **Rabinovich, S.; Baldini, J. and Bannister, R.** Treatment of influenza; The therapeutic efficacy of amantadine HCl and rimantadine HCl in naturally occurring influenza A2 outbreak. 1969. *Am J Med Sci*. 257:328-335.
51. **Falsey, A.; Walsh, E. and Betts, R.** Serologic evidence of respiratory syncycial virus infection in nursing home patients. 1990. *J Infect Dis*. 162:568-569.
52. **Hinshaw, V. and Webster, R.** The natural history of influenza A viruses. 1982. In: **Beard, A. S.** (ed.) *Basic and Applied Influenza Research*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
53. **Subbarao, E.; Klimov, A.; Katz, J.; Regnery, H.; Lim, W.; Hall, H.; Perdue, M.; Swayne, D.; Bender, C.; Huang, J.; Hemphill, M.; Rowe, T.; Shaw, M.; Xu, X.; Fukuda, K. and Cox, N.** Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. 1998. *Science* 279: 393-396.
54. **Lin, Y.; Shaw, M.; Gregory, V.; Cameron, K.; Lim, W.; Klimov, A.; Subbarao, K.; Guan, Y.; Krauss, K.; Shortridge, K.; Webster, R.; Cox, N. and Hay, A.** Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: Relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (17): 9654-9658.
55. **Hope-Simpson, R.** Epidemic mechanisms of type A influenza. 1979. *J Hygiene, Cambridge* 83: 11-26.
56. **Hope-Simpson, R.** The role of season in the epidemiology of influenza. 1981. *J Hygiene, Cambridge* 86: 35-47.
57. **Kilbourne, E.** 1987. *Influenza*. Plenum, New York.
58. **Barker, W and Mullooly, J.** Impact of epidemic type A influenza in a defined adult population. 1980. *Am J Epidemiol* 112:798-811.

59. **Nolan, T.; Goodman, R.; Hinman, A.; Noble, G.; Kendal, A. and Thacker, S.** Morbidity and mortality associated with influenza B in the United States, 1979-80: A report from the Centre for Disease Control. 1980. *J Infect Dis* 142: 360-362.
60. **Clark, P.; Feltz, E.; List-Young, B.; Ritter, D. and Noble, G.** An influenza B epidemic within a remote Alaska community: serologic, epidemiologic, and clinical observations. 1970. *J Am Med Assoc* 214: 507-12.
61. **Hall, W.; Goodman, R. Noble, G.; Kendal, A. and Steece, R.** An outbreak of influenza B in an elderly population. 1981. *J Infect Dis* 144: 297-302.
62. **Monto, A. and Kioumeh, F.** The Tecumseh study of respiratory illness XII. Occurrence of influenza in the community, 1966-71. 1975. *Am J Epidemiol* 102: 553-663.
63. **Centres for Disease Control and Prevention (1996)** *MMWR* 45 (RR-5), 1-24.
64. **Nichol, K.** 1996. *Arch. Intern. Med.* 156, 1546-1550.
65. **Nichol, K.; Lind, A.; Margolis, K.; et al.** The effectiveness of vaccination against influenza in healthy, working adults. 1995. *New Engl. J. Med.* 333: 889-893.
66. **Hinshaw, V. and Webster, R.** 1982. The natural history of influenza A viruses. In: Beare, A.S. (ed.). *Basic and Applied Influenza Research*, pp.79-104. CRC Press, Boca Raton.
67. **Webster R.; Bean, W.; Gorman, O.; Chambers, T. and Kawaoka, Y.** Evolution and ecology of influenza A viruses. 1992. *Microbiol Rev* 56: 152-79.
68. **Osterhaus, A.; Rimmelzwaan, G.; Martina, B.; Bestebroer, T. and Fouchier, R.** Influenza B virus in seals. 2000. *Science* 12; 288 (5468): 1051-3.
69. **Lvov, D. and Zhdanov, V.** Circulation of influenza virus genes in the biosphere. 1987. *Sov Med Rev Virol* 1: 129-52.
70. **Shortridge, K.** Avian influenza A viruses of southern china and Hong Kong ecological aspects and implications for man. 1982. *Bull Who* 60: 129-35.
71. **Guo, Y.; Min, W.; Fengen, J.; Ping, W. and Jiming, Z.** Influenza ecology in China. 1983. In: Laver, W.G. (ed) *The Origin of Pandemic Influenza Viruses*, pp.211-23. Elsevier, New York.

72. **Yamane, N.; Odagisi, T. and Arikawa, J.** Isolation of orthomyxoviruses from migrating and domestic ducks in Northern Japan in 1976-79. 1978. *Jpn J Med Sci Biol* 31: 407-15.
73. **Hannoun, C. and Devaux, J.** Circulation enzootique permanente de virus grippaux dans la baie de la Somme. 1980. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 3: 177-83.
74. **Ottis, K. and Bachmann, P.** Occurrence of Hsw 1N1 subtype influenza A viruses in wild ducks in Europe. 1980. *Arch Virol* 63: 185-90.
75. **Slemons, R.; Johnson, D.; Osborn, J. and Hayes, F.** Type A influenza viruses isolated from wild free-flying ducks in California. 1974. *Avian Dis* 18: 119-25.
76. **MacKenzie, J.; Edwards, E.; Holmes, R. and Hinshaw, V.** Isolation of ortho- and paramyxoviruses from wild birds in Western Australia, and the characterization of novel influenza A viruses. 1984. *Aust J Exp Biol Med Sci* 62:89-99.
77. **Webster, R.; Yakhno, M.; Hinshaw, V.; Bean, W. and Murti, K.** Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. 1978. *Virology* 84: 268-78.
78. **Rohm, C.; Zhou, N.; Suss, J.; Mackenzie, J. and Webster, R.** Characterization of a novel influenza haemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. 1996. *Virology* 217: 508-16.
79. **Li, S.; Orlich, M. and Rott, R.** Generation of seal influenza virus variants pathogenic for chickens, because of hemagglutinin cleavage site changes. 1990. *J Virol* 64: 3297-303.
80. **Vey, M.; Orlich, M.; Adler, S.; Klenk, H.; Rott, R. and Garten, W.** Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. 1992. *Virology* 188: 408-13.
81. [www.clinfec.org/gripe.htm](http://www.clinfec.org/gripe.htm). Tema del mes: Influenza: una enfermedad emergente. Una aproximación a su conocimiento. Dr. Fabio Grill. Cátedra y Clínica de Enfermedades Infecciosas, Montevideo, abril 2001.
82. **Gorman, O.; Bean, W.; Kawaoka, Y. and Webster, R.** Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. 1990a. *J Virol* 64: 1487-97.

83. **Gorman, O.; Donis, R.; Kawaoka, Y. and Webster, R.** Evolution of influenza A virus PB2 genes: Implications for evolution of the ribonucleoprotein complex and origin of human influenza A virus. 1990b. *J Virol* 64: 4893-902.
84. **Webster, R.; Bean, W.; Gorman, O.; Chambers, T. and Kawaoka, Y.** Evolution and ecology of influenza A viruses. 1992. *Microbiol Rev* 56: 152-79.
85. **Scholtissek, C.** Pigs as "mixing vessels" for the creation of new pandemic influenza A viruses. 1990. *Med Principles Pract* 2: 65-71.
86. **Kawaoka, Y.; Krauss, S. and Webster, R.** Avian to human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. 1989. *J Virol* 63: 4603-8.
87. **Scholtissek, C.; Burger, H.; Kistner, O. and Shortridge, K.** The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. 1985. *Virology* 147: 287-94.
88. **Shortridge, K. and Stuart-Harris, C.** An influenza epicentre?. 1982. *Lancet* ii: 812-13.
89. **Shortridge, K.** Pandemic influenza: a zoonosis?. 1992. *Sem Resp Infect* 7: 11-25.
90. **Claas, E.; Osterhaus, A.; van Beek R.; Jong, J.; Rimmelzwaan, G.; Senne, D.; Krauss, S.; Shortridge, K. and Webster, R.** Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. 1998. *Lancet* 351: 472-477.
91. **Betts, F. and Douglas, R.** Influenza virus. In: Mandel, G.; Douglas, R. and Bennet, J. eds. *Principles and practice of infectious diseases*, third edition; Churchill Livingstone Inc 1990: 1306-25.
92. **Hayden, F. and Couch, R.** Clinical and epidemiological importance of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. In: Elsevier science Publishers BV. *Options for the Control of Influenza II*. C. Hannoun et al eds. 1992: 193-201.
93. **Hayden, F. and Rollins, B.** In vitro activity of the neuraminidase inhibitor GS4071 against influenza viruses. 1997. *Antiviral Res* 34: A86.

94. Glaxo Wellcome Inc. Relenza® (zanamivir for inhalation) package insert. Research Triangle Park, NC: Glaxo Wellcome Inc., 1999.
95. Roche Laboratories, Inc. Tamiflu™ (oseltamivir phosphate) capsules package insert. Nutley, NJ: Roche Laboratories Inc., 1999.
96. Peck, F. Purified influenza virus vaccine: a study of viral reactivity and antigenicity. 1968. *J Am Med Assoc* 206: 2277-82.
97. Advisory Committee on Immunization Practices. 1997. *MMWR* 46 (RR-9), 1-25.
98. Nichol, K.; Lind, A.; Margolis, K. et al. The effectiveness of vaccination against influenza in healthy, working adults. 1995. *New Engl J Med*. 333: 889-893.
99. Künzel, W.; Glathe, H.; Engelmann, H. and Hoecket, Ch. Van. Kinetics of humoral antibody response to trivalent inactivated split influenza vaccine in subjects previously vaccinated or vaccinated for the first time. 1996. *Vaccine* 14 (12): 1108-1110.
100. Meiklejohn, G.; Eickhoff, T. and Graves P, I. Antigenic drift and efficacy of influenza virus vaccines, 1976-1977. 1978. *J Infect Dis*. 138:618-624.
101. Stamboulian, D.; Bonvehi, P.; Nacinovich, F. and Rüttimann, W. Immunization against influenza in the elderly: the Argentinian experience. 1993-1997. 1999. *Vaccine* 17: S53-S56.
102. Belshe, R.; Mendelman, P.; Treanor, J. et al. The efficacy of live attenuated cold-adapted trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children. 1998. *N Engl J Med* 358:1405-1412.
103. Hampson, AW and Cox NJ. 1996. Global surveillance for pandemic influenza: are we prepared? In: Brown, LE, Hampson, AW & Webster, RG (eds) *Options for the Control of Influenza*, Vol. 3. Elsevier, Amsterdam.
104. Regnery, H.; Bender, C.; Subbarao, K.; Klimov, A.; Hall, H.; Friedrich, F. and Cox, N. Antigenic and genetic analysis of influenza A (H3N2) strains isolated in latin american and Caribbean countries since 1991. Poster presentado en la International Conference on Emerging Infectious Diseases, llevado a cabo en Atlanta, Georgia, del 8 al 11 de marzo de 1997.



105. **Savy, V.; Baumeister, E. y Pontoriero, A.** Estudio antigénico de cepas de influenza A (H3N2) circulantes en la Argentina y su relación con las cepas vacunales. 1999. *Medicina* 59: 225-230.
106. **Saiki, R.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.; Horn, G.; Erlich, H. and Arnheim, N.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Science* Dec 20; 230(4732):1350-4.
107. **Casas, I.; Powll, L.; Klapper, P and Cleator G.** New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. 1995. *J Virol Meths* 53:25-36.
108. **Zhang W. and Evans D.** Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. 1991. *J. Virol. Methods* 33: 165-189.
109. **Genetics Computer Group.** Program manual for the GCG package, version 8.0 (1994). Madison, Wisconsin, United Sates: Genetics Computer Group; 1996.
110. **Thompson, J.; Bibson, T.; Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. 1997. *Nucleic Acids Research* 24:4876-4882.
111. **Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I. and Nei, M.** 2001. Mega 2.1: Molecular Evolutionary Analysis Software, *Bioinformatics* Vol. 17, 12:1244-1245.
112. **Felsenstein, J.** 1993. PHYLIP phylogeny inference package, version 3.57. Seattle, Washington, United States: University of Washington; 1993.
113. **Saittou, N. and Imanishi, T.** Relative efficiencies of Fitch-Margolish maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. 1989. *Mol Biol Evol* 6:514-525.
114. **Page RDM.** TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 1996; 12(4): 357-358.
115. **Ellis, J.; Chakraverty, P. and Clewley, J.** Genetic and antigenic variation in the haemagglutinin of recently circulating human influenza A (H3N2) viruses in the United Kingdom. 1995. *Archives of Virology* 140: 1889-1904.

116. **Klimov, A.; Rocha, E.; Hayden, G.; Shult, P.; Roumillat, L. Andf Cox, N.** Prolonged shedding of amantadine-resistant influenza A viruses by immunodeficient patient: detection by polymerase chain reaction-restriction análisis. 1995. *The Journal of Infectious Diseases* 172: 1352-5.
117. **Eickhoff, T.; Sherman, I. and Serfling R.** Observations on excess mortality associated epidemic influenza. 1961. *JAMA* 176:776-82.
118. **Lui, K. and Kendal, A.** Impact of influenza epidemics on mortality in the United States from October 1972 to May 1985. 1987. *Am J Publish Health* 77:712-6.
119. **Benenson, A.** Control of communicable diseases in man. 15a de. Washington D.C. American Public Health Association; 1990.
120. **Kusznierz, G.; Imaz, M.; Zerbini, E.; Savy, V.; Knez, V. y Sequeira, M.** Efecto de las epidemias de influenza sobre la mortalidad en Santa Fe, Argentina, en 1992-1999. 2002. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am j Public Health* 12 (1): 26-36.
121. **Kilbourne, E.; Laver, W.; Schulman, J. And Webster, R.** Antiviral activity of antiserum specific for an influenza virus neuraminidase. 1968. *J. Virol* 2: 281-288.
122. Annual Report, Who Influenza Centre, 1999.
123. **McCullers, J.; Wang, G.; He, S. And Webster, R.** Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature. 1999. *J. Virol.* 73: 7343-7348.
124. **Xu, X.; Shaw, J.; Smith, C.; Cox, N. and Klimov, A.** Multiple lineages co-circulation and genetic reassortment of the neuraminidase and hemagglutinin genes within influenza viruses of the same type/subtype. 2001. In "Options for the Control of Influenza IV" (A. Osterhaus, N. Cox and A. Hampson, Eds), pp. 383-387. Elsevier Science, New York.
125. **Xu, X.; Cox, N.; Bender, C.; Regnery, H. and Shaw, M.** Genetic variation in neuraminidase genes of influenza A (H3N2) viruses. 1996. *Virology* 224: 175-183.
126. **Hay, A.** The action of adamantanamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. 1992. *Semin Virol* 3: 21-30

127. **Hayden FG, Cote KM, Douglas RG Jr.** Plaque inhibition assay for drug susceptibility testing of influenza viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;17:865–870.
128. **Avila, M.; Salomón, H.; Carballal, G. Et al.** Isolation and identification of viral agents in Argentinian children with acute lower respiratory tract infection. 1990. *Rev Inf Dis* 12(8): 9974-81.
129. **Thacker, S.** The persistence of influenza A in human populations. 1986. *Epidemiol Rev* 8, 129-41.
130. **Webster, R.; Hinshaw, V.; Bean, W. and Sriam, G.** Influenza viruses: transmission between species. 1980. *Phil Trans Roy Soc London* 288, 439-47.
131. **Centres for Disease Control and Prevention.** Update: influenza activity-United States, 1999-2000 season. *MMWR* 2000; 49(9): 173-177.
132. **Choi, K. and Thacker, S.** Mortality during influenza epidemics in the United States, 1967-1978. 1982. *Am J Public Health* 72(11): 1280-1283.
133. **Simonsen, L.; Clarke, M.; Williamson, D.; Stroup, D.; Arden, N. and Schonberger, L.** The impact of influenza epidemics on mortality: introducing severity index. 1997. *Am J Public Health* 87(12): 1944-1950.
134. **Cox, N. and Subbarao, K.** Global epidemiology of influenza: past and present. 2000. *Annu Rev Med* 51: 407-421.
135. **Bush, R; Bender, C.; Subbarao, K.; Cox, N. and Fitch, W.** Predicting the evolution of human influenza A. 1999. *Science* 286: 1921-1925.
136. **Raymond, F.; Caton, A.; Cox, N.; Kendal, A. and Brownlee, G.** The antigenicity and evolution of influenza H1 haemagglutinin, from 1950-1957 and 1977-1983: two pathways from one gene. 1986. *Virology* 148: 275-287.
137. **World Health Organization.** 1998 recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 1998-99 season. *WHO Wkly Epidemiol. Rec* 73:56-60.
138. **Rota, P.; Wallis, T.; Harmon, M.; Rota, J.; Kendal, A. and Nerome, K.** Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. 1990. *Virology* 175: 59-58.
139. **Colman, P.; Varghese, J. and Laver, W.** Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. 1983. *Nature* 303: 41-44.

140. **Ziegler, T.; Hemphill, M.; Ziegler, M.; Perez-Oronoz G.; Klimov, A.; Hampson, A.; Regnery, H. And Cox, N. Low incidence of rimantadine resistance in field isolates of Influenza A viruses. 1999. The Journal of Infectious Diseases 180: 935-9.**