

---

# Diagnóstico serológico de influenza en un grupo de pacientes con enfermedad respiratoria aguda mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación

ANA E. ARANGO, SANDRA V. GONZÁLEZ,  
MARÍA F. TORO

El propósito de este trabajo fue demostrar la circulación de los virus de influenza en la ciudad de Medellín. Se estudiaron 15 pacientes y 15 controles, titulando sus anticuerpos séricos mediante la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IH). En 8 pacientes (53,3%) se encontró alza o disminución cuádruple o mayor de los títulos. La positividad por subtipo fue de 62,5% para A/(H1N1), 25% para A/(H3N2) y 12,5% para influenza B. Los títulos estables  $\geq 40$  se consideraron como evidencia de infección previa o de circulación reciente del virus y se encontraron distribuidos así: Para A/(H3N2) 53,3% en los pacientes y 80% en los controles; para A/(H1N1) 100% en cada uno de los grupos y para B, 6,7% en los pacientes y 13,4% en los controles. Este informe sugiere una mayor circulación reciente de una cepa A/(H1N1). Los virus tipo B no parecen haber circulado en la población por un período prolongado ya que los ancianos no mostraron evidencia serológica de ello. En conclusión pudo observarse la circulación simultánea de las dos cepas A estudiadas, con predominio de la A/(H1N1). Sería recomendable mantener la vigilancia permanente de estos virus para poder aplicar medidas preventivas y de tratamiento oportuno.

## PALABRAS CLAVE

INFLUENZA

ENFERMEDAD RESPIRATORIA AGUDA

## INTRODUCCIÓN

La influenza es una enfermedad respiratoria de amplia distribución mundial que produce altas tasas de morbilidad y mortalidad en ciertos grupos de riesgo. Se transmite de persona a persona a través de secreciones respiratorias o por el contacto con las manos o superficies contaminadas (1).

La familia *Orthomyxoviridae*, a la que pertenecen los virus de la influenza, comprende tres virus denominados A, B y C con base en las propiedades antigénicas de las proteínas internas NP (nucleoproteína) y M (matriz). A su vez, el tipo A comprende diferentes subtipos que se identifican por las propiedades de los 2 principales antígenos externos: La hemaglutinina (H) y la neuraminidasa

---

**MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA** Ana Eugenia Arango Restrepo, Profesora Titular, Sección de Virología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia; **SANDRA V. GONZÁLEZ S**, Estudiante de último año de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Colegio Mayor de Antioquia; **MAGÍSTER EN INMUNOLOGÍA** María Fabiola Toro Castaño, Profesora Asociada, Sección de Inmunología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

(N). En cada tipo o subtipo se presentan pequeñas variaciones periódicas que generan diferentes cepas denominadas por año y lugar. El genoma viral es un RNA de cadena simple y segmentado en 8 fragmentos, lo que le da las posibilidades de recombinarse con otros virus y de mutar frecuentemente. Los virus influenza A presentan la mayor variación genética y son los principales productores de pandemias; la influenza B es un poco más estable pero también causa epidemias y brotes más localizados; el tipo C no presenta variación y la enfermedad asociada es semejante a un resfriado común por lo que no se le ha dado importancia (1,2).

La variación genética del virus es una característica fundamental en la epidemiología de la influenza pues permanentemente está cambiando y, por lo tanto, los anticuerpos creados como defensa en una infección pierden su efectividad ante la aparición de un nuevo subtipo o cepa viral. Esto, sumado a la severidad de la enfermedad en ciertos grupos poblacionales como enfermos crónicos, ancianos, inmunodeficientes y otros, ha llevado a conformar un programa mundial de vigilancia epidemiológica de la influenza, que permite la detección temprana de las nuevas cepas y subtipos en las comunidades y su incorporación a las vacunas que año tras año se modifican de acuerdo con las cepas circulantes en los diferentes países (1,2).

El período de incubación de la influenza es bastante corto (1-4 días) lo que facilita su diseminación. Los síntomas agudos duran de 2 a 4 días y se manifiestan por tos, dolor de garganta y síntomas sistémicos como fiebre alta, cefalea, dolores musculares y fatiga. La convalecencia suele ser lenta, persistiendo algunos de los síntomas como la tos y la fatiga. La complicación más frecuente es la neumonía bacteriana secundaria a la infección viral que es la principal causa de mortalidad en los grupos de riesgo. Complicaciones menos frecuentes son: neumonía viral primaria, otitis media, sinusitis, síndrome de Reye y otras (3,4).

El diagnóstico virológico se basa en el aislamiento del virus en cultivos celulares (MDCK) o en embrión de pollo y en el estudio serológico de los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación específicos de cada virus. Las muestras para el aislamiento comprenden hisopados nasales, aspirados nasofaríngeos, gargarismos, lavados bronquiales, etc. Idealmente deben ser tomadas en los 3 primeros días de la enfermedad y conservadas a 4°C hasta su envío y proceso en el laboratorio. Para el estudio serológico se utilizan dos muestras de sangre tomadas una en la fase aguda de la enfermedad y otra a las 2-3 semanas de la primera, con el fin de poder apreciar el alza o descenso en el título de anticuerpos, los cuales deben ser cuádruples o mayores para que sean significativos de infección reciente. Por lo general, se utiliza la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) y se procesan simultáneamente contra varias cepas de los diferentes tipos y subtipos que han circulado recientemente en el mundo (3-5 de tipo A y B). La IH permite identificar el virus infectante hasta los niveles de tipo y subtipo. El diagnóstico rápido de la infección puede hacerse mediante pruebas de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos de tipo de virus, aplicados a una preparación de células obtenidas del tracto respiratorio del paciente (5-10).

En Colombia se presentan periódicamente epidemias de enfermedades similares a la influenza, que en su mayoría quedan sin un diagnóstico específico de virus. La época de lluvias en los países tropicales es la de mayor frecuencia de la infección mientras que en países con estaciones el pico de la enfermedad se presenta en los meses de invierno y principios de primavera. Los informes recientes del Instituto Nacional de Salud (INS) en Colombia indican que en los últimos años la mayor circulación viral ha sido del subtipo A(H3N2). Mundialmente se reporta la circulación simultánea de virus A(H3N2), A(H1N1) y virus tipo B, con predominio de un virus sobre otro en diferentes años (11,12).

Desde finales de 1997 y durante el primer semestre de 1998 se han venido observando en Medellín casos compatibles con influenza que han recibido folclóricamente el nombre de "Abrazo de Rentería". Simultáneamente, se ha venido presentando en la ciudad una epidemia de dengue; en este trabajo se quiso averiguar si la influenza estaba circulando en la ciudad, mediante una encuesta serológica en un grupo de enfermos y otro de controles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Población de estudio

Se estudiaron 15 pacientes mayores de 15 años con sintomatología compatible con influenza, consistente en cefalea, malestar general, fiebre y síntomas respiratorios, que se encontraban en los 5 primeros días de la enfermedad. Como controles se incluyeron 15 personas sanas de los mismos grupos de edad, que no hubieran tenido recientemente enfermedad respiratoria.

A cada paciente se le tomaron 2 muestras de sangre así: Una en la fase aguda y otra en la convalescente. A los controles sólo se les tomó una muestra de sangre. De estas muestras se separó el suero y se conservó a -20°C hasta su proceso. Las muestras se tomaron entre los meses de marzo y mayo, coincidiendo con la temporada de lluvias.

Para la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IH) se siguió el protocolo del CDC (13) y se utilizaron antígenos de referencia donados por la WHO-CDC de Atlanta, EE.UU. Éstos fueron los tipos y cepas de virus circulantes en la temporada 97-98:

A/Nanchang/933/95 (H3N2)  
 A/Johannesburg/82/96 (H1N1)NIB-39  
 B/Beijing/184/93-like B/Harbin/07/94  
 B/Guangdong/8/93

Brevemente, las diferentes diluciones de cada suero tratadas con Enzima Destructora de Receptores (RDE), se incubaron con cada uno de los va-

rios antígenos virales a una concentración de 4 unidades hemaglutinantes (UHA). Luego de incubarlos se les agregó una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% y nuevamente se incubaron hasta que los controles permitieron la lectura de la prueba (aproximadamente 1 hora). El título de cada suero se anotó como la última dilución que produjo inhibición completa de la hemaglutinación. Se consideró positiva e indicativa de infección aguda reciente, aquella pareja de sueros (agudo y convalescente de cada paciente) que mostró alza o disminución cuádruple o mayor del título de anticuerpos entre las respectivas muestras. Los títulos estables mayores o iguales a 40 se consideraron como indicio de circulación reciente del virus implicado y también de infección previa por el mismo. Los títulos estables menores de 40 se consideraron como reacción cruzada entre las cepas del mismo tipo viral y posiblemente no indicativos de protección (14).

## RESULTADOS

En las tablas N° 1 y 2 se presentan las características de los pacientes: La edad osciló entre 20 y 80 años con un promedio de 47 años; 9 (60%) eran mujeres y 6 (40%) hombres; la mayoría de los enfermos y de los controles residían en los municipios de Medellín y Sabaneta.

TABLA N° 1

### PROCEDENCIA DE LOS PACIENTES Y CONTROLES

CIUDAD	PACIENTES		CONTROLES	
	N°	%	N°	%
Medellín	7	46,6	4	26,7
Sabaneta	5	33,3	5	33,3
Bello	2	13,3	0	00,0
Envigado	1	6,7	6	40,0
TOTAL	15	100,0	15	100,0

**TABLA N° 2**

**DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES POR EDAD Y SEXO**

SEXO	FÉMININO		MASCULINO		TOTAL	
EDAD	N°	%	N°	%	N°	%
15-29	2	13,3	1	6,7	3	20,0
30-44	2	13,3	2	13,3	4	26,7
45-59	3	20,0	1	6,7	4	26,7
60 o más	2	13,3	2	13,3	4	26,7
TOTAL	9	60,0	6	40,0	15	100,0

Los síntomas más frecuentes fueron: Cefalea (93%), tos (93%), rinorrea (87%), fiebre (87%), mialgias (80%), escalofríos (26%) y odinofagia (20%). No hubo diferencia por sexo en la presentación clínica de la enfermedad.

En 8 de los 15 pacientes (53,3%), los resultados de la prueba de IH demostraron alza o disminución cuádruple de los títulos de anticuerpos; de ellos el subtipo predominante fue A/(H1N1) en 5 (62,5%), seguido por el subtipo A/(H3N2) con 2 pacientes (25%); 1 paciente (12,5%) fue positivo para influenza B (Tabla N° 3).

**TABLA N° 3**

**RESULTADO DE LA PRUEBA DE IH EN SUEROS PAREADOS DEL GRUPO DE PACIENTES Y SU POSITIVIDAD SEGÚN LA CEPA VIRAL\***

RESULTADO DE LA PRUEBA DE IH	N°	%
Positivo	8	53,3
Negativo	7	46,7
POSITIVIDAD POR CEPAS		
A/Johannesburg/82/96(H1N1)NIB-39	5	62,5
A/Nanchang/933/95(H3N2)	2	25,0
B/Beijing/184/93-Like B/Harbin/07/94 y B/Guangdong/8/93	1	12,5

\* Se consideró positivo el par de sueros que presentó alza o descenso cuádruple de anticuerpos.

Un título estable de anticuerpos de 40 o más, indicio de la circulación reciente del virus o infección previa con él, se presentó, según el tipo viral, así: A/(H3N2) en 8 pacientes (53,3%) y 12 controles (80%); A/(H1N1) en el total de los pacientes y de los controles; para la influenza B en 1 paciente (6,7%) y 2 controles (13,3%); los demás individuos tuvieron títulos inferiores a 40.

**DISCUSIÓN**

La presentación clínica de las diferentes enfermedades producidas por virus respiratorios puede ser muy semejante por lo que la importancia del diagnóstico de laboratorio se hace mayor, en particular cuando existen patógenos prevenibles por vacunación como los virus de la influenza que pueden ser causa muy importante de mortalidad (1,4).

En el presente trabajo, en los 7 enfermos (46,7%) que no presentaron alza o disminución cuádruple en el título de anticuerpos IH se puede sospechar la presencia de cualquiera de los otros patógenos respiratorios o inclusive del virus dengue que circula ampliamente en la ciudad de Medellín y sus alrededores. La edad promedio de los pacientes fue 47 años, lo que limita la probabilidad de infección por algunos agentes virales como Virus Respiratorio Sincicial (VRS), parainfluenza y otros. Sin embargo, cabe anotar que lo inespecífico de los síntomas asociados puede hacer pensar en muchas otras entidades infecciosas.

Estos resultados sugieren mayor circulación reciente de una cepa A/(H1N1) similar a la A/Johannesburg/82/96 (H1N1) NIB-39, lo cual evidencia un cambio en el subtipo circulante del virus, que hasta el año pasado había sido un A(H3N2) que circulaba simultáneamente con uno del tipo B (11,15). Otra posibilidad podría ser que la cepa predominante en Medellín y su área metropolitana sea diferente de la reportada por el INS. Esto se hace más evidente si consideramos un título de 40

o mayor como evidencia de infección previa, ya que todos los pacientes y los controles revelaron positividad para el subtipo A(H1N1).

Con este mismo criterio, podemos decir que ha habido circulación simultánea amplia de los virus tipo A probados en este trabajo pues también encontramos títulos de anticuerpos indicativos de circulación reciente en pacientes y controles [53,3% y 80% respectivamente para A (H3N2)]. Para el virus tipo B, el panorama es un poco diferente, pues se encuentran títulos muy bajos (<20) en la mayoría de los pacientes y controles (93,4% y 86,7% respectivamente), contrario a lo esperado según el informe del INS que había detectado la circulación de uno de estos virus desde 1996 en la epidemia pasada. La explicación podría ser la baja circulación de este tipo viral en la comunidad o que estos virus tienen una menor capacidad de diseminación. Aunque B/Beijing viene circulando en Colombia desde 1994, no se puede demostrar en este estudio que su circulación haya aumentado; incluso las personas ancianas mostraron no tener anticuerpos en títulos importantes; así, este virus parece mantenerse restringido a individuos o pequeños grupos en la comunidad.

En este estudio el 50% de los casos positivos para influenza, procedía de un asilo de ancianos, lo cual enfatiza la necesidad e importancia, en estos grupos, de las medidas preventivas y de control, incluyendo la vacuna (16).

En conclusión, se observó la circulación simultánea de varios tipos y subtipos de influenza, con predominio de una cepa similar a A/Johannesburg/82/96 (H1N1) NIB-39. La influenza B parece haber circulado en mucha menor medida en los últimos años en la ciudad y existe al parecer un buen número de susceptibles acumulado. Sería aconsejable mantener una vigilancia permanente de estos virus mediante estudios como el presente pero incluyendo un mayor número de individuos y durante períodos más prolongados.

## AGRADECIMIENTOS

A la Organización Mundial de la Salud (OMS) y al Centro para el Control de las Enfermedades (CDC) de Atlanta, Estados Unidos, por la donación de los virus y antisueros utilizados en este trabajo.

## SUMMARY

### SEROLOGIC DIAGNOSIS OF INFLUENZA IN A GROUP OF PATIENTS WITH ACUTE RESPIRATORY DISEASE BY MEANS OF HEMAGGLUTINATION INHIBITION TEST

The aim of this study was to determine the circulation of influenza viruses in Medellín, Colombia. We studied 15 patients and 15 controls using the hemagglutination inhibition test in order to detect seric antibody titers to influenza viruses. In 8 patients (53,3%) we found four-fold rise or decrease of titers. Five patients (62,5%) were positive for subtype A(H1N1), 2 (25%) for subtype A(H3N2) and 1 (12,5%) for influenza B. Titers of 40 or higher, considered as evidence of previous infection or recent viral circulation, were as follows: 53,3% of patients and 80% of controls had these titers for subtype A(H3N2); 100% of patients and controls for subtype A(H1N1) and 6,7% of patients and 13,4% of controls for subtype B. This report suggests a major recent circulation of subtype A(H1N1). Type B viruses do not seem to have circulated recently, since oldest people in the study did not have serological evidence of infection with this particular subtype. In conclusion, the simultaneous circulation of both subtypes of influenza A (H3N2, H1N1) was shown. It would be advisable to maintain permanent surveillance of these viruses in order to apply preventive measures and the right treatment.

## BIBLIOGRAFÍA

- FIELDS B, KNIPE D, HOWLEY P. Orthomyxoviruses. En *Virology. Fields*, Vol 1, 3a Ed. New York: Lippincott - Raven; 1995: 1.353-1.397.
2. JAWETZ E, MELNICK J, ADELBERG E. Orthomyxoviruses. En: *Medical Microbiology*. 20 Ed. Norwalk, Connecticut: Appleton y Lange; 1995: 449-460.
  3. BEDOYA VI. Virus de la Influenza. En *Enfermedades Infecciosas*. 5a. ed. RESTREPO MI, BOTERO D, ROBLEDO M. Eds. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 1995: 13-19.
  4. MANDELL D, BENNETT E. Orthomyxovirus. En: *Enfermedades infecciosas: Principios y práctica*. 4 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1997: 1.734-1.755.
  5. SAVY V, CANDURA N. Influenza. *Manual de técnicas de diagnóstico virológico rápido*. Sociedad Argentina de Virología. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología; 1995: 13-19.
  6. ESPY M, SMITH T. Detección de la influenza por inmunofluorescencia. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 677-679.
- ZIEGLER T, SÁNCHEZ F. Type- and subtype specific detection of Influenza viruses in clinical specimens by rapid culture assay. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 318-321.
8. ROBERTSON J. Clinical influenza virus and the embryonated hen's egg. *Rev Med Virol* 1993; 3: 97-106.
  9. HUGHES J. Physical and chemical methods for enhanced rapid detection of viruses and other agents. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 150-175.
  10. RABALAIS G, STOUT K, COST K. Rapid diagnosis of respiratory viral infections by using a shell vial assay and monoclonal antibody pool. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1.505-1.508.
  11. Instituto Nacional de salud. Influenza. En *IQEN* 1996; 1: 1-11.
  12. Instituto Nacional de Salud. Influenza A (H5N1). *IQEN* 1998; 1: 1-5.
  13. PALMER DF, COLEMAN MT, DOWDLE WR, SCHILD GS. *Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis*. Atlanta: US Department of Health and Human Services, CDC; 1975: 25-45.
  14. PÉREZ MP, LÓPEZ C, LLACER A, NÁJERA E, NÁJERA R. La circulación de virus influenza y su repercusión en los niveles de anticuerpos en el hombre. *Bol Of Sanit Panam* 1980; 89: 113-123.
  15. TORO MF, OSSA JE, ARANGO AE, ACEVEDO LM, DÍAZ A. Actividad del virus de influenza humana en Medellín, Colombia, 1990-1993. *Acta Med Col* 1994;19: 164-171.
  16. KILBOURNE DE, CHANOCK PW, CHOPIN FM, DAVENPORT JC, GREGG GC, JACKSON PD, et al. Influenza vaccines. Summary of influenza workshop. *J Infect Dis* 1974; 129: 750-771.
-