

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
UNAN – LEON.
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**



TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE MAESTRIA EN EPIDEMIOLOGIA.

TEMA:

Brote de enfermedades respiratorias agudas ocurrido en el distrito II de la ciudad de Managua durante los meses de Junio a Agosto del 2007

Autora: Lic. Saira Saborío Galo.

Tutores: Dr. Angel Balmaseda.
Responsable Dpto. Virologia CNDR-MINSA.
Managua – Nicaragua.

Dr. Gregorio Matus Lacayo.
Master en Epidemiología y Salud Pública.
UNAN-LEON.

Agosto 2008

DEDICATORIA.

Dedico esta monografía a:

Dios, pues gracias a El podemos investigar mucho de sus misterios y a la capacidad que puso en el ser humano para poderlos aclarar.

A mi padre Guillermo (q. p. d), ya que una vez me dijo: “Lo que somos es el regalo que Dios nos hace, y lo que llegamos a ser es el regalo que le ofrecemos”.

A mi madre Nubia, quien siempre me ha dicho: “El mejor regalo que te puedo ofrecer son tus estudios”.

A mi abuelita Bertha: quien con sus noventa y seis años me ha demostrado que el ser útil y servicial al prójimo; es una de las mejores cualidades del ser humano.

Mis hermanas: con su entusiasmo, juventud, han sido ejemplo para vivir cada día de manera muy especial, así como cada etapa de mi vida.

Al poeta, el ingenioso, el humanista; mi amor, Ángel, llegastes a mi vida de manera muy especial e hicistes la diferencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por dar la voluntad y la fortaleza para vencer cada reto y obstáculo que surgió en el camino.

A mis padres que nunca dudaron en brindarme su apoyo y por la confianza depositada para salir adelante.

Al Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia Dra. Concepción Palacios-Minsa Central, al Centro de Salud Sócrates Flores Vivas y a colaboradores de la Universidad de Berkeley por su apoyo a la posible realización de esta monografía.

Muy especialmente a: Dr. Alcides González (Dir. CNDR).

Lic. Leonel Pérez (Dpto. Virología- CNDR).

Dra. Guillermina Kuan (Dir. C/S Sócrates Flores Vivas)

Ing. William Avilés (Resp. Informática C/S SFV)

Aubree Gordon (Universidad de Berkeley).

Dra. Eva Harris (universidad de Berkeley).

Dr. Juan Centeno (Heodra- León).

A mis tutores:

Dr. Angel Balmaseda, quien con mucho ahínco compartió sus conocimientos de manera incondicional, así como su valioso tiempo e impulsó el desarrollo de esta tesis.

Dr. Gregorio Matus (Heodra- León), quien compartió sus conocimientos en la formación, organización y revisión de esta tesis.

INDICE

	No. de Pág.
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
III. Justificación y planteamiento del problema	4
IV. Objetivos	5
V. Marco teórico	6
VI. Diseño metodológico	19
VII. Resultados	25
VIII. Discusión de resultados	44
IX. Conclusiones	49
X. Recomendaciones	50
XI. Referencias bibliográficas	51
XII. Anexos	55

INTRODUCCION

Las enfermedades respiratorias causadas por virus constituyen uno de los principales problemas de salud pública en lactantes y niños menores, cada año el 3% de los niños menores de 1 año necesitan ser hospitalizados con infecciones de moderadas a severas del Tracto Respiratorio Inferior. Diferentes virus como influenza, parainfluenza, adenovirus, sincitial respiratorio, coronavirus meptaneumovirus y picornavirus entre otros representan los agentes etiológicos fundamentales de estas enfermedades (1). Los brotes de Influenza constituyen la principal causa de morbimortalidad de las enfermedades respiratorias.

La influenza es una infección viral que ataca el sistema respiratorio, incluyendo nariz, garganta, tubos bronquiales y pulmones. (1)

El término influenza fue introducido en Italia al inicio del siglo XV para describir una epidemia que fue atribuida a la influencia de las estrellas, dicho término fue adoptado por los ingleses en el siglo XVIII; durante el mismo período los franceses denominaron la enfermedad como *la grippe* (2, 3, 4).

En Nicaragua se reportan 1.5 millones de casos de IRAs por año correspondiendo a 230 mil casos por neumonía y se contabilizan entre 180 a 200 mortalidades por esta enfermedad (5)

Datos reportados por el sistema de vigilancia epidemiológica del país mostraron una tasa de mortalidad por las IRAs en el 2005 de 0.82 por 100 000 habitantes, en el 2006 una tasa correspondiente a 0.80 por 100 000 habitantes y en el 2007 una tasas de 0.84 por 100 000 habitantes. (5)

Además se observó un aumento en la tasa global de mortalidad por neumonía, contabilizando una para el 2006 de 7.85 por 100 000 habitantes y una de 8.15 por 100 000 habitantes para el 2007. (5)

Estas cifras demuestran que Nicaragua cuenta con un sistema de vigilancia bastante efectivo para la notificación obligatoria de las IRAs y neumonías, ya que éstas representan la primera causa de morbilidad y de consulta, sin embargo no existe todavía un sistema de vigilancia eficaz para la detección de influenza o síndrome de enfermedad como influenza.

En Nicaragua hasta la fecha no existía un laboratorio para determinar el agente etiológico de las infecciones respiratorias de origen viral, por lo que los brotes y epidemias sospechosos de Influenza no han sido adecuadamente caracterizados. Desde el 2004 en nuestro país se ha estado llevando a cabo un estudio donde se le ha dado seguimiento para Dengue a una cohorte de

aproximadamente 4000 niños entre 2 y 11 años de edad que habitan en el distrito 2 de la Ciudad de Managua en el área atendida por el Centro de Salud Sócrates Flores Vivas. En el presente estudio se aprovecha la organización de esta cohorte y la existencia del diagnóstico del laboratorio para determinar el agente etiológico y se realiza una caracterización clínica y epidemiológica de un brote de enfermedad respiratoria ocurrido en el distrito II de Managua entre los meses de junio y agosto del 2007.

Antecedentes:

En Nicaragua no existen antecedentes de estudios como el que se presenta donde se describen las características clínicas, epidemiológicas y de laboratorio de un brote de infecciones respiratorias.

Hasta la fecha se han reportado 2 estudios: El primero, en el servicio de neumología del Hospital Manuel de Jesús Rivera “La Mascota” el cual fue colaborador en una investigación con las fuerzas armadas de los Estados Unidos de Norteamérica; para determinar las cepas circulantes de influenza desde octubre del 2006 a junio del 2007 en niños con neumonía hospitalizados en dicha institución. En este estudio se enviaron 276 muestras de las cuales 74 fueron procesadas por aislamiento viral, contabilizándose 35 aislamientos positivos, y de los cuales 34 resultaron influenza A, obteniéndose las siguientes cepas:

A/H1/Victoria, A/H1/Washington, A/H1N1/Missouri.

Así mismo se pudieron identificar por pruebas rápidas influenza B, Parainfluenza 1, Parainfluenza 3, Adenovirus, HSV, RSV y coinfecciones como influenza A y RSV, así como Adenovirus y Parainfluenza 3. (6)

El segundo estudio, del que algunos resultados fueron mencionados en la introducción, fue una investigación retrospectiva de enfermedades similares a Influenza (ETI). Este estudio fue realizado por la Universidad de California, Berkeley, en el Centro de Salud Sócrates Flores y el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia del Ministerio de Salud (CNDR- MINSa) y el principal objetivo fue determinar la carga y estacionalidad de ILI en una cohorte pediátrica en Nicaragua. Se encontró una tasa de incidencia de 34.8 por 100 personas por años, y se demostró que en nuestro país ocurren dos picos en el año; uno durante los meses de junio y julio y otro de noviembre a diciembre (7).

Justificación:

Con el presente estudio se pretende fortalecer el diagnóstico virológico de influenza y otros virus respiratorios, y de esta manera apoyar a la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad, además de mejorar el conocimiento de las características clínicas y epidemiológicas de estas infecciones en el país, lo que aportará una herramienta útil que ayudará a tomar las medidas profilácticas y de control para disminuir la morbimortalidad de las IRAs en Nicaragua.

Planteamiento de problema:

Existe un alto índice de infecciones respiratorias en el país y de forma alarmante se incrementa año con año la tasa de mortalidad en nuestra población susceptible como son nuestros niños y adultos de la tercera edad. El desconocimiento de la etiología, epidemiología y la poca información clínica sobre estas entidades pueden estar contribuyendo a esta situación de emergencia sanitaria.

Objetivo general:

Caracterizar virológica, clínica y epidemiológicamente un brote de enfermedades respiratorias agudas ocurrido durante los meses de Junio a Agosto del 2007 en niños de dos a once años de edad en el distrito II de la ciudad de Managua.

Objetivos específicos:

1. Describir las características demográficas de la población afectada.
2. Identificar los principales virus de las vías respiratorias en muestras clínicas a través de pruebas de laboratorio.
3. Identificar el subtipo de virus de Influenza que podría estar circulando durante el brote.
4. Comparar un método de RT-PCR estandarizado en el laboratorio para subtipificar cepas aisladas de influenza con el método tradicional de inhibición de la Hemaglutinación.
5. Describir las manifestaciones clínicas predominantes del cuadro respiratorio de la población afectada.

MARCO TEORICO.

Dentro de la gran variedad de virus que causan enfermedades respiratorias se encuentran los que pertenecen a la familia Ortomixovirus; siendo el principal el virus de la Influenza y los correspondientes a la familia Paramixovirus representados por los Parainfluenza, sincitial respiratorio, sarampión, parotiditis y meptaneumovirus del cual se conoce poco. Estas dos familias se diferencian fundamentalmente en su estructura y patrones de replicación. (1, 8, 9).

Existen otros, como: adenovirus, picornavirus (rhinovirus y enterovirus) y coronavirus que también causan infecciones del tracto respiratorio, sin embargo esta revisión bibliográfica será dirigida fundamentalmente al virus de la influenza. (10, 11).

HISTORIA

La primera bien recordada pandemia ocurrió en 1580 y se creyó se originó en Asia; de ahí se dispersó a África y Europa. La mortalidad fue alta en algunas ciudades y la práctica de desangrar al paciente para reducir la fiebre aumentó aún más este número. (2).

No obstante fue Hipócrates en el año 412 a.C. quien describía lo que parece haber sido epidemias de influenza, las descripciones continuaron en Roma y en la Edad Media.

La primera descripción clara de influenza se atribuye al médico americano Robert Jonson, un facultativo de Filadelfia, quien describió una epidemia en 1793. Siguiendo esta descripción hay antecedentes de epidemias en los años de 1833, 1837, 1847, 1889-90 y en 1918.

Durante la primera guerra mundial, en la primavera de 1918, los rusos llegaron a un armisticio con Alemania, lo que permitió a esta última cerrar ese frente y concentrar más de un millón de hombres en la lucha en Francia. Estados Unidos recién entraba en esta guerra y su presencia aún no planteaba una ayuda real a los aliados. El avance alemán se hizo sentir, en muchos lugares las tropas germanas aventajaban en una proporción de 4 a 1 a las tropas aliadas. Se conquistaron 1.250 millas cuadradas en cuatro meses lo que era un gran avance en esta guerra de trincheras. En mayo habían llegado al río Marne poniendo a su artillería pesada a tiro de París. La población civil inició la evacuación de París. No fue el heroísmo de los aliados o la influencia de los americanos, sino que una epidemia, la que diezmó a las tropas germanas deteniendo el avance y permitiendo que el aparato bélico americano alcanzara la magnitud suficiente para cambiar el curso de la historia. Dicha epidemia, que afectó también a las tropas aliadas y al mundo en general, fue la influenza o gripe española, como es conocida. Su nombre no se debe a que haya surgido la epidemia en España

sino que simplemente porque, al ser España neutra en esta guerra, no existía impedimento en reportar públicamente una epidemia que en los otros países se consideraba información privilegiada.

La primera guerra mundial produjo una gran cantidad de muertes; sin embargo, se estima que la epidemia de influenza fue responsable de 20 a 40 millones de muertos en menos de un año, dos a cuatro veces más que el total de las muertes en cuatro años de guerra. Se calcula que un quinto de la población mundial fue infectada y que 2 a 3% de los infectados murieron.

A diferencia de otras epidemias, la pandemia de influenza de 1918-19, fue letal no sólo en ancianos y personas debilitadas, sino que también en adultos sanos. La mayoría de las pérdidas humanas de las tropas americanas en Europa no fue debida al fuego enemigo, la mayoría (casi 80%) de estos jóvenes murió por efecto de la influenza (43.000 soldados).

La Asociación Médica Americana (AMA) reportó que un tercio de la muerte de médicos fue fruto de la infección.

En 1918, el inspector de la oficina de industria animal de EE.UU. describió una enfermedad en cerdos, muy similar en sintomatología a la grave epidemia de influenza de los años 1918-19. Su observación no tuvo mucha repercusión, en especial por la gran oposición de los productores de carne de cerdo, quienes se sintieron amenazados. Diez años después, en 1928, se describió el paso de la infección de un cerdo a otro; sin embargo, no se logró evidenciar una etiología viral. El Dr. Richard Shope del Departamento de Patología Comparativa del Instituto Rockefeller en Princeton, fue el primero en reproducir la influenza en cerdos sanos, inoculando material obtenido de cerdos enfermos que había sido filtrado mediante la cámara de Pasteur-Chamberland siendo ésta la primera evidencia de una etiología viral de la influenza porcina.

En 1933, una nueva epidemia de influenza afectó a un porcentaje de los trabajadores de lo que es hoy GlaxoSmithKline, inesperadamente los hurones también enfermaron con síntomas como tos, estornudos y sibilancias, siendo el Dr. Wilson Smith quien tomara muestra de faringe de personas enfermas con estos síntomas y las pasó por el filtro de la cámara de Pasteur-Chamberland e inoculó en hurones sanos, comprobándose la infección en estos animales y el desarrollo de neumonías en ratones con dicho material infectado de los hurones, lo que demostró por primera vez que la etiología de la influenza humana era viral, a la vez que se cumplían los postulados de Koch. (12).

El virus de la influenza A se aisló en 1933 en hurones y el B en 1936, esto permitió la caracterización y desarrollo de vacunas inactivadas. Un tercer tipo de influenza, llamada influenza C, fue aislada de un hombre en 1949. (2).

Fue el científico australiano Maxfarlane Burneo, quien introdujo el uso de huevos fecundados como medio de cultivo y George Hirst quien introdujo la hemaglutinación como método diagnóstico para la infección por influenza, al

observar que el fluido de los embriones de pollo infectados con influenza podía aglutinar o agrupar las células rojas de los pollos, la cual desaparecía con calor, sugiriendo así la presencia de una enzima en el virus que causaba que el virus y la célula roja se disociara. (2)

Investigaciones siguientes a este hallazgo demostraron que la reacción de hemaglutinación pudo ser inhibida por anticuerpos específicos en el suero del hombre o animales infectados o vacunados con virus de influenza, de esta manera un método sencillo hizo posible distinguir entre diferentes cepas de influenza y para medir la respuesta inmunológica del cuerpo a una cepa conocida. (2).

En los pasados 100 años se tiene conocimiento de cinco grandes pandemias comenzando en:

1890 donde la cepa circulante fue **H2N8**.

1900 cuya cepa circulante fue **H3N8**.

1918 la cepa que circuló fue **H1N1**, llamada **influenza Española**, similar a la porcina y a la cual se le atribuyen aproximadamente más de 20 millones de muertes en todo el mundo y más de 500000 muertes reportadas en los Estados Unidos.

1957 la cepa circulante fue **H2N2**, conocida como influenza Asiática.

1968 la cepa circulante fue **H3N2**, llamada influenza de Hong Kong. (1,2).

EL VIRUS

Etiológicamente el virus de la influenza es un virus ARN de una sola hebra, es miembro de la familia de los Orthomyxovirus. Hay 3 tipos antigénicos básicos A, B, C, que son determinados por el material nuclear. El virus de la influenza tipo A tiene subtipos determinados por los antígenos de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Tanto los genomas del ARN de cadena sencilla de los virus de la Influenza A y B poseen ocho segmentos separados, sin embargo el virus de la Influenza C contiene siete segmentos del ARN y carecen de un gen para neuraminidasa (1,13).

Las diferencias antigénicas mostradas por dos de las proteínas estructurales internas, la nucleocapside (NP) y las proteínas de la matriz (M), sirven para dividir a los virus de la Influenza en los tipos A, B y C. Estas proteínas no muestran reactividad cruzada entre los tres tipos. Las variaciones antigénicas en las glucoproteínas de superficie HA y NA, se emplean para subtipificar a los virus. Las proteínas PB1, PB2, PA se unen al ARN viral y participan en la transcripción y replicación (1, 14).

El virus de la influenza A causa enfermedad moderada a grave. Infecta a animales (aves, cerdos) y humanos, afectando a todos los grupos de edad. El virus de influenza B afecta sólo a humanos, causa enfermedad más leve que el tipo A. El virus de influenza C no se ha asociado a epidemias, rara vez causa enfermedad en humanos.

Nomenclatura

La información estándar requerida para nombrar una cepa aislada comprende: tipo, huésped de origen (si es una cepa aislada en un animal), origen geográfico, número de cepa y año del aislamiento. La descripción antigénica de la HA y la NA se proporcionan para el tipo A. (1)

Hasta hoy se han recuperado 15 subtipos de HA (H1-H15) y nueve subtipos de NA (N1-N9) en muchas combinaciones diferentes en aves, animales o humanos, sin embargo se han recuperado tres subtipos HA (H1-H3) y dos NA (N1-N2) de humanos. (1,15)

Desviación y cambios antigénicos.

La hemaglutinina y la neuroaminidasa son antígenos que producen variaciones antigénicas independientes entre si.

La desviación antigénica es causada por la acumulación de mutaciones puntuales en el gen, las cuales producen cambios en aminoácidos de las proteínas.

El cambio antigénico refleja cambios drásticos en la secuencia de una proteína de la superficie viral, correspondientes a cambios demasiados grandes para ser explicados por mutaciones. Una variante debe sufrir dos o más mutaciones antes que surja una nueva cepa epidemiológicamente significativa. El mecanismo para el cambio es la predisposición genética entre los virus de la Influenza humana y la de origen aviar. Los virus de la Influenza B y C no muestran cambio antigénico, quizás debido a los pocos virus relacionados con animales (1,13).

Mecanismo de transmisión: Se transmite de persona a persona por contacto directo a través de secreciones respiratorias producidas por toser o estornudar, o a través de artículos contaminados recientemente. (16)

Período de incubación: Usualmente es de dos días, pero puede variar de 1 a 5 días, dependiendo de la magnitud de la dosis viral y del estado inmunológico del huésped. (16)

Período de transmisión: El paciente es infectante 24-48 horas antes del inicio de los síntomas hasta 4-5 días de la enfermedad, puede ser más largo en niños

pequeños e inmunocomprometidos. No existe estado de portador y muy raras veces se puede recuperar virus infectante en sangre (16).

Fuente de infección: Secreciones respiratorias de personas infectadas, que se escapan a la neutralización por algún anticuerpo IgA específico preexistente o a la inactivación por los inhibidores inespecíficos en las secreciones mucosas. (16)

Susceptibilidad y resistencia: Es universal y tipo específica.

Patogénesis en humanos:

El virus de influenza se replica en todas las células del tracto respiratorio, la replicación viral alcanza su mayor concentración 48 horas después de la infección, a partir de ese momento declina lentamente con muy poca producción de virus después de 6 a 8 días. Existe una correlación positiva entre la cantidad de virus producido y la severidad del cuadro clínico, los individuos con escasa producción de virus son generalmente asintomáticos o presentan síntomas menores del tracto respiratorio alto. En los niños naturalmente infectados los virus de la influenza son frecuentemente recuperados de 1 a 2 días después de iniciados los síntomas y pueden ser encontrados hasta 13 días después. (17, 18)

Patología:

El virus de la influenza A induce cambios patológicos en todo el tracto respiratorio, sin embargo los cambios patológicos más significativos están presentes en el tracto respiratorio inferior. En personas con influenza no complicada se ha observado inflamación aguda difusa de laringe, traquea y bronquios con inflamación de la mucosa y edema. Desde el primer día de iniciados los síntomas se observa descamación de las células ciliadas y productoras de mucus, exponiendo la membrana basal. Edema submucosa e hiperemia ocurre con una infiltración por neutrófilos y células mononucleares. El antígeno viral está presente predominantemente en células epiteliales y mononucleares pero es infrecuentemente encontrado en la capa de células basales. (17,19, 20)

En una neumonía primaria viral hay neumonía intersticial con marcada hiperemia e inflamación de la pared alveolar, la infiltración es predominantemente a células mononucleares y hay dilatación capilar y trombosis. Edema intralveolar y exudado están presentes, membranas hialinas cubren la pared alveolar y se acompañan de hemorragia intralveolar. Cambios necrotisantes pueden ocurrir con la pared del alveolo y bronquiolos. (17, 20,21).

A nivel celular el virus de la influenza detiene la síntesis de proteínas e induce apoptosis como un mecanismo adicional de destrucción celular. A partir del 3ero al 5to día de iniciados los síntomas se observan mitosis en la capa basal celular y comienza la regeneración del epitelio. Durante este tiempo los procesos

reparativos y destructivos pueden estar presentes simultáneamente. La resolución completa de la necrosis epitelial puede tomar hasta un mes, por lo que las anomalías de la función pulmonar persisten más allá del período asintomático de la fase aguda de la infección. (20)

Respuesta inmune:

Inespecífica:

El extremadamente corto período de incubación implica que la inmunidad inespecífica sea un componente importante.

El tracto respiratorio tiene una serie de mecanismos de protección contra la infección por influenza que incluye la capa de mucina, la acción ciliar y los inhibidores de proteasa que pueden prevenir la entrada a las células y la desnudación del virus. Una vez infectadas las células epiteliales citoquinas proinflamatorias como la interleucina 6 (IL-6) y el interferón alfa, son inducidos y liberados de estas células. La liberación de estas 2 citoquinas coincide con el momento de mayor sintomatología, producción de mucus, fiebre y carga viral. Otras citoquinas pueden o no aparecer como IL-8, IL-2 o TGF. Se piensa que el interferón juega un papel determinante en la recuperación de la infección. También es observado un incremento en la actividad de las células NK o células naturalmente asesinas. (22)

Específica:

Inmunidad humoral:

En un 80% de las infecciones, una respuesta de anticuerpos en el suero puede ser documentada, después de una infección primaria; anticuerpos IgG, IgA e IgM son detectados, mientras que la infección secundaria IgG e IgA predominan. Los anticuerpos en el suero cumplen un rol en la resistencia o en la recuperación de la influenza en humanos. (18,23, 24)

Durante la infección en humanos con influenza A se producen anticuerpos contra las proteínas HA, NA, NP y M. Los anticuerpos contra las glicoproteínas HA y NA están asociados en la resistencia de infección, no así las proteínas contra la M1 y NP. La transfusión pasiva de anticuerpos monoclonales contra la proteína M2 es protectora en ratones por lo que se está proponiendo una vacuna universal basada en el dominio extracelular de la proteína M2. (18, 24).

Aunque la inmunidad es de larga vida, la reinfección con cepas antigénicamente relacionadas puede ocurrir lo que indica que la inmunidad contra una sola infección puede ser incompleta. Dos mecanismos han sido identificados que pueden contribuir a la inmunidad incompleta.

- 1) Hay una gradual disminución en la cantidad total de IgG sérica, IgA local o de células secretoras de anticuerpos durante el primer año después de la primera infección.
- 2) Después de la infección con un subtipo nuevo del virus de la influenza, los anticuerpos generados reaccionan solamente con un número limitado de sitios antigénicos en la glicoproteína HA, mientras que después de varias infecciones los anticuerpos generados tienen un amplio rango de sitios específicos. (24)

Inmunidad celular:

El papel de la inmunidad celular ha sido bien definido en ratones pero no tan bien en humanos. Los linfocitos citotóxicos aparecen en individuos infectados o vacunados en los días 6 a 14 y desaparecen alrededor del día 21, ellos producen lisis en las células infectadas con influenza A y presentan un patrón de reactividad cruzada entre las diferentes cepas de influenza A no así con las cepas de influenza B. (25, 26, 27)

Los linfocitos colaboradores de tipo CD4 presentan 2 tipos de propiedades funcionales:

- 1) colaboran con las células B en la producción de anticuerpos y ayudan en la proliferación de linfocitos citotóxicos.
- 2) Pueden tener actividad citotóxica con un rango de especificidad antigénica similar a los linfocitos citotóxicos. (25, 26, 27)

Respuesta de anticuerpos de la mucosa:

Los anticuerpos neutralizantes en las secreciones nasales de los humanos son primariamente IgA, los cuales son localmente producidos. Los anticuerpos contra los HA y NA pueden ser detectados en las secreciones locales de forma fácil por lo que han sido estudiado con frecuencia, de esta forma los anticuerpos IgA son los mediadores primarios de la resistencia contra el virus de la influenza A en el tracto respiratorio superior, pueden actuar intracelularmente para inhibir la replicación del virus y probablemente participan activamente en la liberación del virus de las células epiteliales del tracto respiratorio. (18, 27, 28)

Durante la infección primaria IgA, IgG, anti HA han sido detectados en lavados nasales, siendo la IgA y la IgM la más frecuente. La mayoría de los HA específicos IgA e IgM son secretadas activamente a nivel local, mientras que la secreción local de IgG ha sido demostrada infrecuentemente. (18, 27, 28)

Los anticuerpos IgA locales estimulados por infección natural son detectables por 3 a 5 meses después de la infección. Después de una infección secundaria los anticuerpos predominantes también son IgA, la IgG parece ser predominantemente un trasudado a partir del suero. (18, 27, 28)

Efecto de la infección en la flora bacteriana y en la función de las células fagocíticas:

El virus de la influenza A no altera significativamente la flora bacteriana normal, sin embargo diferentes excepciones han sido reportadas. En pacientes con bronquitis crónica, la infección con el virus de la influenza A fue seguida por un incremento de la incidencia de colonización por *Streptococo neumoniae*. Durante una epidemia de meningitis meningocócica e influenza A, la infección por el virus de influenza A fue encontrada significativamente con infección o estado de portador de *Neisseria meningitidis*. Además células faríngeas de voluntarios experimentalmente infectados demostraron un incremento de la adherencia para bacterias patógenas durante la enfermedad aguda. (29)

La infección de leucocitos humanos polimorfonucleares (PMN) y mononucleares (MN) con virus de la Influenza in Vitro, deprimió la capacidad de estas células para responder a estímulos quimiotácticos. Durante la infección de humanos con el virus de la influenza A, PMN y MN obtenidos de sangre periféricas también exhibieron depresión de la quimiotaxis in Vitro. La infección de los macrófagos in Vitro puede inhibir la capacidad para ayudar o aumentar la respuestas proliferativas a mitógenos. Es posible que estas alteraciones relacionadas con la infección viral en la función de las células fagocíticas actúen conjuntamente con la destrucción del epitelio ciliado para facilitar las infecciones secundarias que pueden ocurrir durante la infección con el virus de la influenza. (29)

MANIFESTACIONES CLINICAS:

La gravedad de la enfermedad dependerá de la experiencia inmunológica previa, aproximadamente 50% de las personas infectadas desarrollará los síntomas clásicos de influenza. (16)

Inicialmente, la influenza puede parecer un resfriado común con secreción nasal, estornudos y dolor de garganta, que podría desarrollarse lentamente sin embargo la influenza tiene un inicio repentino y abrupto, otra diferencia descrita es que el resfriado común puede presentarse como una molestia pero con influenza la persona se siente peor a medida que pasa el tiempo. (16)

La influenza clásica se caracteriza por fiebre de inicio súbito y son más altas en niños (38° C) que en los adultos, con escalofríos, cefalea, malestar general, mialgias difusas y tos seca. Posteriormente signos respiratorios consistentes en dolor de garganta, congestión nasal y tos intensa. Puede haber infección y dolor conjuntival, dolor abdominal, náuseas y vómitos, los cuales son raros en adultos. En niños pequeños puede producir un cuadro séptico, crup o neumonía. Los síntomas sistémicos y la fiebre duran de 2 a 3 días, rara vez más de 5. No debe utilizarse aspirina en niños o adolescentes por el riesgo de desarrollar síndrome

de Reye. Los niños pueden presentar diarrea y vómitos sin embargo en los adultos estos signos son muy raros. (16)

Las complicaciones más frecuentes son la neumonía bacteriana secundaria, o viral primaria por virus de influenza, síndrome de Reye, miocarditis, agravamiento de la bronquitis crónica o de otras enfermedades pulmonares crónicas. La mortalidad reportada en EUA es de 0.5-1 por 1000 casos. La mayoría de las muertes se observan en personas mayores de 65 años. (16)

Factores de riesgo.

Recién nacidos, niños y personas mayores de 65 años son considerados de alto riesgo para las complicaciones de influenza, o una persona está en alto riesgo al presentar las siguientes características:

- Personas que habitan en albergues.
- Tiene un desorden crónico como diabetes o enfermedad cardíaca, renal o pulmonar.
- Tiene un sistema inmunológico débil causado por medicamentos o infección por HIV.
- Si está en su segundo o tercer trimestre de embarazo durante una estación de influenza.
- Personas que son trabajadores de la salud tienen mayores posibilidades de estar expuestos a adquirir el virus de influenza.
- Personas que están regularmente en contacto con recién nacidos y niños en lugares cerrados.

Los niños tienen mayor riesgo de adquirir el virus si ellos:

- Tienen asma u otra enfermedad crónica de las vías respiratorias.
- Tienen enfermedad cardiovascular.
- Están tomando medicamentos que comprometa el sistema inmunológico.
- Presentan enfermedades como anemia, infección por HIV, diabetes, enfermedad crónica del riñón, enfermedades crónicas del metabolismo o han tomado una terapia con aspirina por largo tiempo.

La vacuna contra la influenza es segura para los niños de 6 meses o más. Si el niño no se encuentra en riesgo de adquirir el virus pero vive con personas que si lo están, lo mas recomendable seria vacunar al niño, esta medida podría disminuir el riesgo de que el niño sea infectante para otros niños. (30)

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la influenza se basa en el aislamiento del virus, la identificación de los antígenos virales o de los ácidos nucleicos virales en las células del paciente o en la demostración de una respuesta inmunológica del paciente. (31, 32)

Los tipos de muestras más adecuados para el aislamiento viral son: los lavados nasales, las gárgaras y los frotis faríngeos, las cuales deben obtenerse en los primeros días de iniciados los síntomas. La muestra debe mantenerse a una temperatura de 4° C hasta su inoculación en el cultivo de células, debido a que la congelación y la descongelación reducen la capacidad para recuperar el virus, por el contrario si el tiempo de almacenamiento excede de cinco días, la muestra debe congelarse a -70° C. (31, 32)

Los huevos embrionados y células renales primarias de mono son los sistemas preferidos para aislar el virus de la influenza, aunque se pueden utilizar algunas líneas celulares continuas. Los cultivos de células inoculados se incuban en ausencia de suero, que a veces contiene factores inhibitorios virales inespecíficos y en presencia de tripsina, la cual activa la hemaglutinina de modo que la replicación del virus se propaga a través del cultivo. (31, 32)

Después de siete días se examina el líquido del cultivo en busca de los virus mediante hemaglutinación. Si los resultados son negativos se efectúa una resiembra a un cultivo fresco, este proceso puede ser necesario debido a que los virus primarios aislados con frecuencia presentan dificultad para crecer y son de crecimiento lento. (31, 32)

Los virus aislados se identifican por inhibición de la hemaglutinación, procedimiento por el cual se puede determinar con rapidez el tipo y el subtipo de virus, en esta técnica es necesario utilizar sueros de referencia de las cepas prevalentes en ese momento. La hemaglutinación por el nuevo virus aislado será inhibida por el antisuero al subtipo homólogo. (31, 32)

Se puede realizar la identificación directa del antígeno viral en las células exfoliadas de aspirados nasales con el uso de anticuerpos fluorescentes, esta prueba es rápida pero no es tan sensible como el aislamiento viral y no proporciona detalles completos acerca de la cepa viral y el virus aislado no es caracterizable. (31, 32)

También es posible el empleo de pruebas rápidas basadas en la detección del ARN de la influenza en las muestras clínicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Pruebas para confirmar el virus de influenza no se realizan en todos los pacientes, sin embargo si hay necesidad, un diagnóstico definitivo de influenza

puede ser confirmado por aislamiento viral o PCR, o una prueba de inmunofluorescencia directa o una prueba de ELISA. (31, 32)

El diagnóstico de influenza puede ser hecho retrospectivamente usando métodos serológicos como la prueba de inhibición de la hemaglutinación. Un incremento de 4 veces el título de anticuerpos demostrado entre la muestra aguda obtenida durante la enfermedad aguda y la muestra convaleciente obtenida de 10 a 14 días después de tomada la muestra aguda. (31, 32)

EPIDEMIOLOGIA

Los brotes de Influenza frecuentemente ocurren durante la estación de invierno. En los Estados Unidos de Norteamérica los brotes de Influenza comienzan usualmente en Octubre o Noviembre, sin embargo los meses donde se observa el pico del brote es de Diciembre a Marzo. (1)

La vigilancia realizada por el CDC muestra que cada año aproximadamente 114000 personas son hospitalizadas y 36000 mueren debido a la influenza en los Estados Unidos, estadísticas demuestran que la Influenza junto con la neumonía constituyen la sexta causa de muerte en dicho país. Las complicaciones con un alto índice de gravedad ocurren en personas de 65 años o más, sin embargo el mayor número de hospitalizados ocurre en los menores de 2 años. (1, 32)

La influenza Española de 1918 cobró la vida de más de 500 000 personas en los Estados Unidos y más de 20 millones alrededor del mundo. No obstante la influenza de 1968 a 1969, la llamada Hong Kong provocó un total de más de 34000 muertes en este país norteamericano. (2)

Los tres tipos de virus de Influenza muestran desviación antigénica, sin embargo, sólo la influenza A muestra cambio antigénico, quizás debido a que los tipos B y C se restringen a los humanos, en tanto que el virus de influenza A circula en poblaciones de animales y aves. Las cepas animales explican el cambio antigénico mediante el reordenamiento genético en los genes de la glucoproteína. El virus de la influenza A se ha recuperado de muchas aves acuáticas, especialmente patos; de aves domésticas como pavos, pollos, gansos y patos; de cerdos y equinos, e incluso de focas y ballenas (1)

Los análisis de la secuencia del virus de la influenza A aislados de muchos huéspedes en diferentes regiones del mundo apoyan la teoría de que todos los virus de la influenza en los mamíferos derivan del reservorio de influenza aviar. De los 15 subtipos de la HA observados en aves, solo unos pocos se han transferido a los mamíferos (H1, H2, H3 y H5 en humanos; H1 y H3 en cerdos; y H3 y H7 en equinos). El mismo patrón se conserva para la NA; se conocen nueve subtipos de la NA para aves, sólo dos de las cuales se encuentran en

humanos (N1, N2) .Los virus de la influenza no parecen ser objeto de cambio antigénico en las aves, quizás debido a su corta vida, esto significa que los genes causantes de las pandemias previas de influenza en humanos aún existan sin cambios en el reservorio de las aves acuáticas. (1).

La mayor parte de las infecciones por influenza en patos son avirulentas. Los virus de la influenza de los patos se multiplican en las células que revisten el intestino y se eliminan en grandes concentraciones en la materia fecal dentro del agua, donde permanecen viables por días o semanas. Siendo una posibilidad que la influenza aviar sea una infección de origen hídrico, transmitida de esta forma de las aves silvestres a las aves domésticas y a los cerdos. (1).

Los brotes de influenza suceden en ondas, aunque no hay una periodicidad regular en la aparición de las epidemias. La experiencia en cualquier año determinado refleja el juego entre la amplitud de la desviación antigénica del virus predominante y la disminución de la inmunidad de la población. El período entre las ondas epidémicas de la influenza A tiende a ser de 2 a 3 años; el período inter epidémico para el tipo B es más prolongado, de 3 a 6 años. Cada 10 a 40 años, cuando aparece un nuevo subtipo de influenza A, se produce una pandemia, como ha sido documentada la epidemia de 1918 (H1N1), 1957 (H2N2) y 1968 (H3N2).

En 1997, en Hong Kong, se presentó la primera infección documentada en humanos causada por el virus de la influenza A de aves (H5N1). La fuente fue un ave doméstica. En ese tiempo se reportaron aproximadamente 18 personas infectadas, de las cuales 6 murieron. Análisis demostraron que el virus no se transmitió de persona a persona puesto que las muestras de las personas estudiadas contenían los 8 segmentos de gen de ARN provenientes del virus avícola, lo que sugirió la necesidad de reclasificación entre los virus humanos y los virus avícolas. (2)

Los cerdos sirven como recipientes mezcladores para las clases intermedias de influenza, debido a que sus células contienen receptores reconocidos tanto para virus humano de influenza como para virus avícola.

Los niños en edad escolar son los vectores predominantes para la transmisión de la influenza, ya que el hacinamiento en las escuelas ayuda a la transmisión de los aerosoles de virus y de esta manera es transportado al seno familiar y el costo económico es estimado entre 1 a 3000 millones de dólares, según la magnitud de la epidemia. (1).

El aislamiento de un virus con una hemaglutinina alterada a finales de la primavera durante una epidemia mínima, indica una posible epidemia en el invierno siguiente, siendo esto un signo de alarma denominado “onda de alerta”, la cual precede a las epidemias de influenza A y B. (1).

Un brote de influenza empieza abruptamente, alcanzando un pico en un período de 2 a 3 semanas y dura alrededor de 2 a 3 meses. En la mayoría de los brotes hay un incremento de enfermedad febril respiratoria en niños seguida por un incremento de síndrome similar a influenza en adultos siendo esto el indicador más temprano de actividad de influenza. Durante muchos brotes, la tasa de ataque esta entre el 10 a 20% de la población susceptible, pero puede exceder durante una pandemia. Los brotes causados por influenza B son generalmente menos extensos y presentan una enfermedad menos severa, sin embargo la influenza B puede ser letal (32).

Debido a la alta tasa de ataque, influenza tiene un gran impacto social. Esta es la principal causa de ausentismo en los trabajos y en las escuelas. Durante un año de interpandemia, se pierden alrededor de 75 millones de días laborales y más de 50 millones de días laborales. En un año interpandémico hay más de 110000 hospitalizados. Sin embargo el número puede aumentar a 200000 o a más de 300000. La mortalidad por influenza asociada a neumonía ocurre principalmente en adultos, los cuales presentan problemas de salud que los ubican con un alto grado de riesgo para presentar complicaciones, motivo por lo cual se estima que el 50% de muertes durante una pandemia ocurren en los menores de 65 años (32).

DISEÑO METODOLOGICO:

1. Tipo de estudio:

Se realizó un estudio epidemiológico de corte transversal, en la población infantil con manifestaciones respiratorias que acudieron al Centro de salud Sócrates Flores Vivas del Distrito II de la Ciudad de Managua durante los meses de Junio a Agosto del 2007.

2. Descripción del área de estudio:

- **El distrito II de la ciudad de Managua limita al:**
- Norte: El lago Xolotlán
- Sur : Con el área de salud Altagracia
- Este : Con el área de salud Francisco Buitrago
- Oeste: Con el área de salud Francisco Morazán
- Cuenta con una extensión territorial de 9.37 km². La zona de la costa del lago es suelo arenoso.
 - Población: 62,077 habitantes. La población menor de 5 años representa el 13% del total y la menor de 15 años, el 33.5%. El C/Salud tiene un total de 17 barrios.
 - Asentamientos Humanos de Alto Riesgo: Hay un asentamiento al norte del barrio San Sebastián, llamado Manchester, ubicado a la orilla del Lago, teniendo como amenazas las inundaciones, con un total de 1,100 casas, tiene 87 pozos, de los cuales ninguno de ellos es útil para el consumo de agua.
 - Las actividades económicas se basan en la industria, comercio y a la pesca artesanal. El 69% de la población se encuentra en el desempleo.
 - Existen 19 escuelas distribuidas en el territorio con 12879 estudiantes de preescolar, primaria y secundaria.
 - El 99% de la población cuenta con agua potable y aproximadamente 1000 personas que no poseen letrinas.
 - Referente a los antecedentes epidemiológicos, son frecuente las enfermedades febriles como el dengue, malaria, cuadros respiratorios y diarreicos.
 - Es una área de alta prostitución, violencia intrafamiliar, alta proliferación de centros de acopio de plástico y material reciclable, numerosos expendios de drogas.

3. Universo

Constituido por 3800 niños de 2 a 11 años pertenecientes a una Cohorte de estudio y que habitan en el área del Centro de Salud Sócrates Flores Vivas del Distrito II de la ciudad de Managua.

a. Población estudiada

Constituida por 1074 niños con manifestaciones respiratorias que asistieron a 1474 consultas médicas durante los meses de Junio a Agosto del 2007.

Treinta y seis niños con síntomas sospechosos de dengue que acudieron a 98 consultas durante junio – agosto del 2007.

Treinta y seis niños con fiebre sin foco aparente que acudieron a 95 consultas durante junio – agosto del 2007

A todos los niños se les llenó un consentimiento informado con la firma de sus representantes legales. (Anexo No1).

Cada niño fue asistido por un médico contratado para atender a los integrantes de la cohorte, a cada uno de ellos se les realizó una consulta inicial y varias de seguimiento. Tanto en la consulta inicial como en las de seguimiento se les llenó un expediente clínico con todos los síntomas y signos que presentaron, los cuales posteriormente fueron introducidos en una base de datos (Access 2003).

b. Definiciones de casos:

- Niño con manifestaciones respiratorias: fiebre de comienzo abrupto, constatada por el personal de salud o referida por el paciente o acompañante mas uno de los siguientes síntomas: tos y/o rinorrea y/o dolor de garganta con menos de 5 días de evolución.
- Caso confirmado de virus de influenza: Caso con manifestaciones respiratoria en los cuales la técnica de RT-PCR resultó positiva a los virus de influenza A o B.

c. Obtención de material biológico:

Se realizó en el Centro de salud Sócrates Flores Vivas al 25% de las consultas médicas de forma aleatoria, durante los meses del estudio.

Niño con manifestaciones respiratorias: La obtención del material biológico consistió en hisopados nasofaríngeos tomado a cada participante con manifestaciones respiratorias, utilizando 2 hisopos de dacrón estériles, uno para la muestra de ambas fosas nasales y otro para la faringe; cada hisopo fue introducido en un tubo con 2 ml de medio de transporte y conservado a una temperatura de entre 2 a 8 grados centígrados para ser enviado al CNDR el mismo día en que se colectó la muestra. (Anexo 2).

La muestra de cada paciente se acompañó de una ficha que contiene información general y clínica (Anexo 3)

Niño con manifestaciones de dengue o con fiebre sin foco aparente: Se tomó una muestra de suero sanguíneo en los primeros cuatro días de la enfermedad, cuando el niño asistió a la primera consulta, y una segunda muestra dos o tres semanas después.

d. Recepción y almacenamiento del material biológico

Se realizó en el departamento de Virología del CNDR:

Muestra de hisopado nasofaríngeo:

- Cada muestra fue separada en 6 alícuotas: 2 alícuotas de 250 ul para aislamiento viral, 2 alícuotas de 140 ul para la realización del RT-PCR, constituyendo así las alícuotas de trabajo y 2 alícuotas de 620 ul para archivo.
- Las alícuotas fueron almacenadas a -70° C hasta su uso.
- La información de cada muestra es introducida en una base de datos.

Muestra de suero sanguíneo:

Muestra de fase aguda:

- Cada muestra de suero fue separada en 9 alícuotas: 1 alícuota de 200 ul para pruebas serológicas, 3 alícuotas de 100 ul para aislamiento viral, 3 alícuotas de 140 ul para la realización del RT-PCR, constituyendo así las alícuotas de trabajo y 2 alícuotas de 500 ul para alícuotas de archivo.

Muestra de fase convaleciente:

- Cada muestra de suero fue separada en 3 alícuotas: 1 alícuota de 200 ul para pruebas serológicas, constituyendo así la alícuota de trabajo y 2 alícuotas de 500 ul para alícuotas de archivo.

8. Reverso Transcripción – Reacción en Cadena de la polimerasa (RT-PCR) (33)

La técnica de RT-PCR para identificar Influenza A y B se le realizó a todas las muestras de exudado nasofaríngeo.

Extracción del ácido nucleico (34)

Se utilizó el kit comercial llamado QIAamp Viral RNA Mini Kit para 250 determinaciones catalogo No 52906.

La descripción de los procedimientos se puede ver en el Anexo 4

RT- PCR (33)

Los procedimientos se describen en el Anexo 4

e. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION VIRAL (35)

El aislamiento viral en cultivo de células se realizó a todas las muestras que resultaron positivas por RT- PCR, los procedimientos se describen en el Anexo 5

f. Aislamiento viral de otros virus respiratorios

Se inocularon 36 muestras negativas a Influenza por RT-PCR, en células de riñón de mono LLC-MK2 y de carcinoma laríngeo humano Hep-2. La logística fue similar a la utilizada en el aislamiento de influenza, solo que la identificación se realizó por IFD (Inmunofluorescencia Directa) y RT- PCR descrito en el Anexo 4.

10. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos generales y clínicos del paciente se introdujeron en base de datos Access 2003. El análisis estadístico se realizó en EPI INFO 2003 y en Stata versión 9. Las pruebas estadísticas realizadas fueron: frecuencias, modelos de regresión logística univariado. El análisis de los datos se presenta en tablas y gráficos.

11. Logística para el procesamiento de las muestras.

- Primer paso:

Se realizó un RT-PCR para identificar virus de influenza A o B en muestras de hisopados nasofaríngeos

- Segundo Paso:

Si la muestra resultó positiva para influenza A o B, se procedió a realizar Aislamiento Viral. En este caso se tomó una alícuota de muestra para ser tratada con antibiótico y ser inoculada en células MDCK.

Si por RT-PCR la muestra fue negativa para influenza, se realizó un RT-PCR en busca de otros virus respiratorios como VRS, Parainfluenza I, II y III.

Los virus aislados se identificaron por RT-PCR o por la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA).

Los resultados obtenidos por la técnica de RT-PCR y el aislamiento viral fueron reportados al sistema de vigilancia nacional del Ministerio de Salud Central Complejo Concepción Palacios.

Variables del estudio:

1. Edad
2. Sexo
3. Caso sospechoso de Manifestaciones Respiratorias
4. Síntomas y signos
5. Caso confirmado de Influenza
6. Mes del año
7. RT-PCR
8. Aislamiento viral
9. Inhibición de la Hemaglutinación

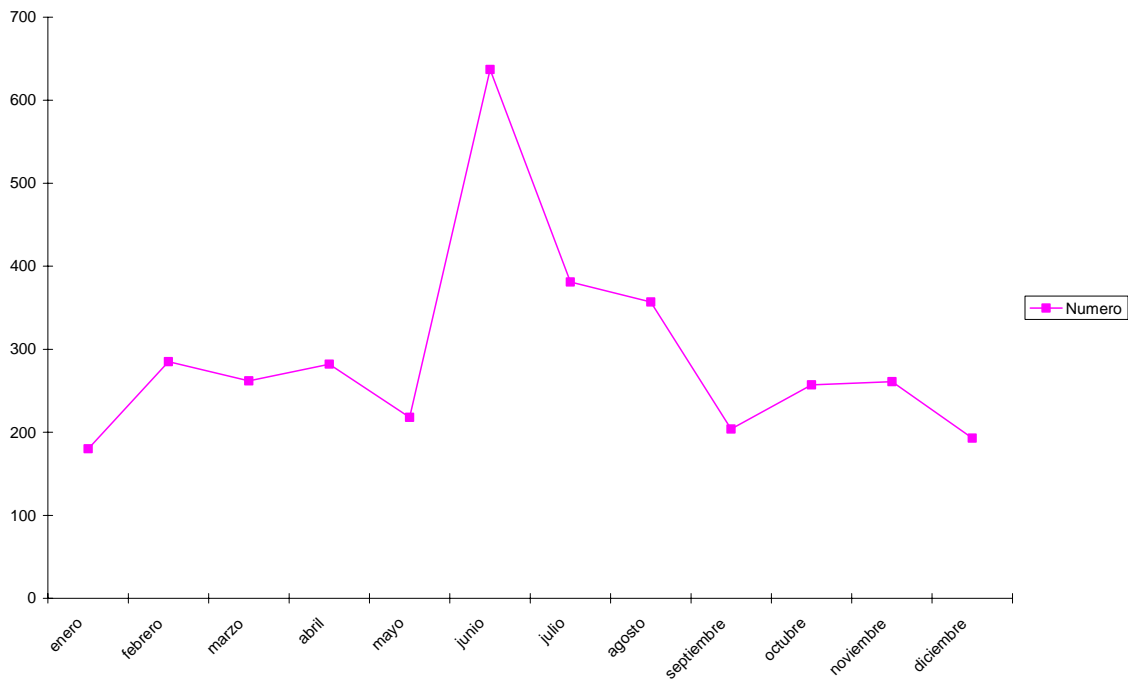
12. Operacionalización de variable.

Variable	Concepto	Dimensión	Indicador	Valor
Caso sospechoso de Manifestaciones Respiratorias	Aparición brusca de fiebre, Tos ,rinorrea, y/o Congestión nasal			SI, NO
Síntomas y signos	Manifestaciones clínicas adicionales que acompañaron al cuadro respiratorio			SI NO
Caso confirmado de Influenza	Paciente positivo a influenza A o B por RT-PCR			Positivo Negativo
Més del año	Período de tiempo de 30 días	Días	Cada mes	Junio Julio Agosto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	ARN presente	Influenza A Influenza B Parainfluenza 1 Parainfluenza 2 Parainfluenza 3 Sincitial respiratorio	Positivo Negativo
Aislamiento viral	Obtención de cepas virales a partir de la inoculación de muestras clínicas en cultivos celulares.		RT-PCR positivo, HA, Destrucción celular.	Positivo Negativo
Inhibición de la Hemaglutinación	Detección de anticuerpos contra el virus de la influenza en pacientes y cepas aisladas.	De 10 a 1280.	Inhibición de la hemaglutinación de eritrocitos de pavo	Títulos de anticuerpos.

RESULTADOS:

I. Datos generales, demográficos y epidemiológicos.

Gráfica 1: Número de consultas por manifestaciones respiratorias agudas. Distrito II de Managua, durante los meses del año 2007



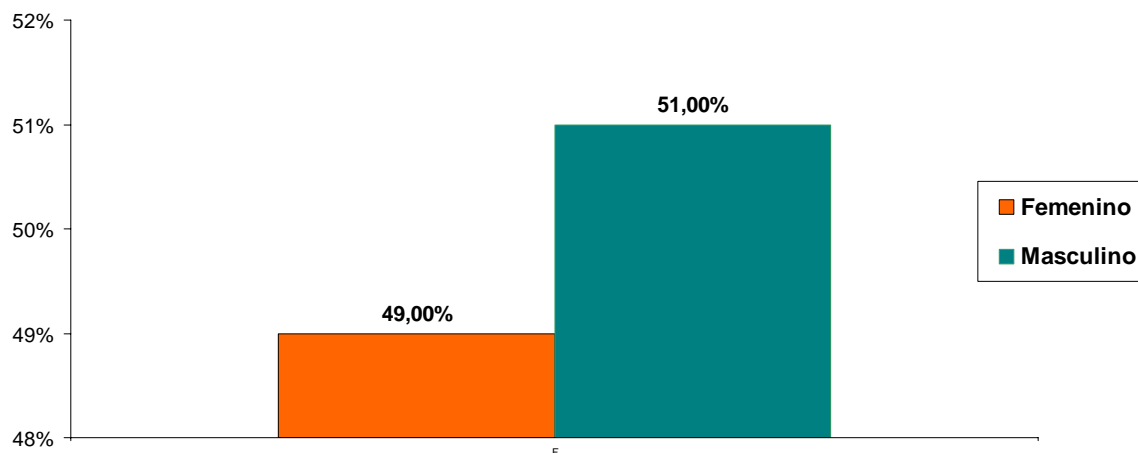
Durante los meses de Junio a Agosto del 2007 aumentó el número de niños que asistieron a consulta con manifestaciones respiratorias, según se observa en la gráfica 1, por dicha razón se tomó este período de tiempo para realizar el estudio.

Tabla 1: Distribución Porcentual por edad y sexo de los niños con manifestaciones respiratorias agudas. Distrito II de Managua, durante los meses del año 2007.

EDAD EN AÑOS	SEXO				TOTAL	
	F	(%)	M	(%)	Nº	(%)
2	50	45	61	55	111	10.3
3	90	53	80	47	170	15.8
4	74	50	73	50	147	13.7
5	58	46	69	54	127	11.8
6	46	42	64	58	110	10.2
7	60	54	52	46	112	10.4
8	54	59	38	41	92	8.6
9	26	36	46	64	72	6.7
10	40	53	35	47	75	7.0
11	28	48	30	52	58	5.4
Total	526	49	548	51	1074	100.0

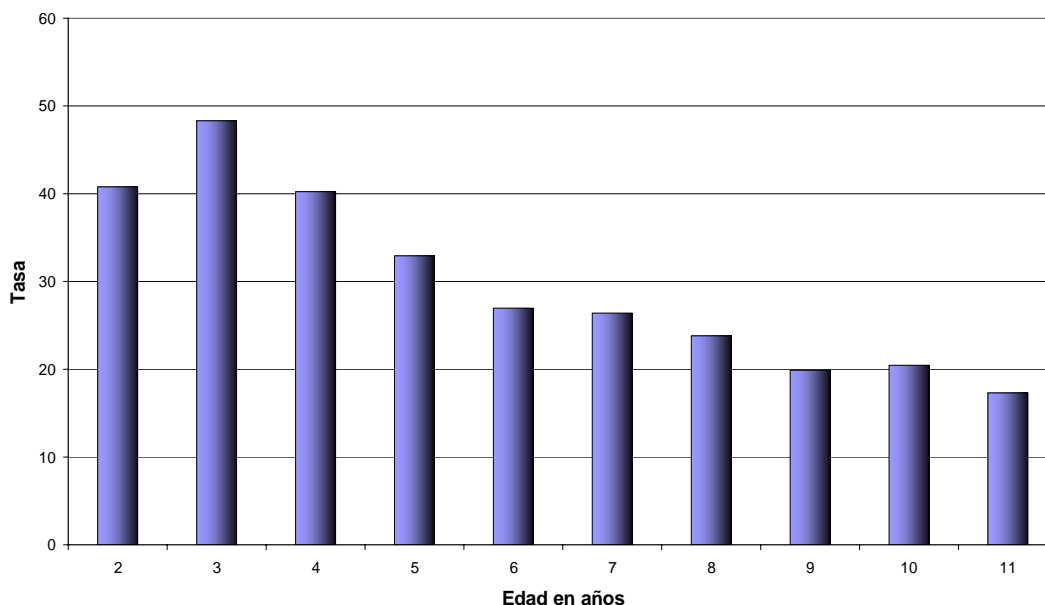
Fuente: Centro de Salud Sócrates Flores

Gráfica 2: Distribución porcentual de los niños con cuadro respiratorio agudo según el sexo. Distrito II de Managua, Junio – Agosto 2007



Fuente: Centro de Salud Sócrates Flores

Gráfica 3: Tasa de incidencia por 100 niños con manifestaciones respiratorias agudas según la edad. Distrito II de Managua, Junio – Agosto 2007.

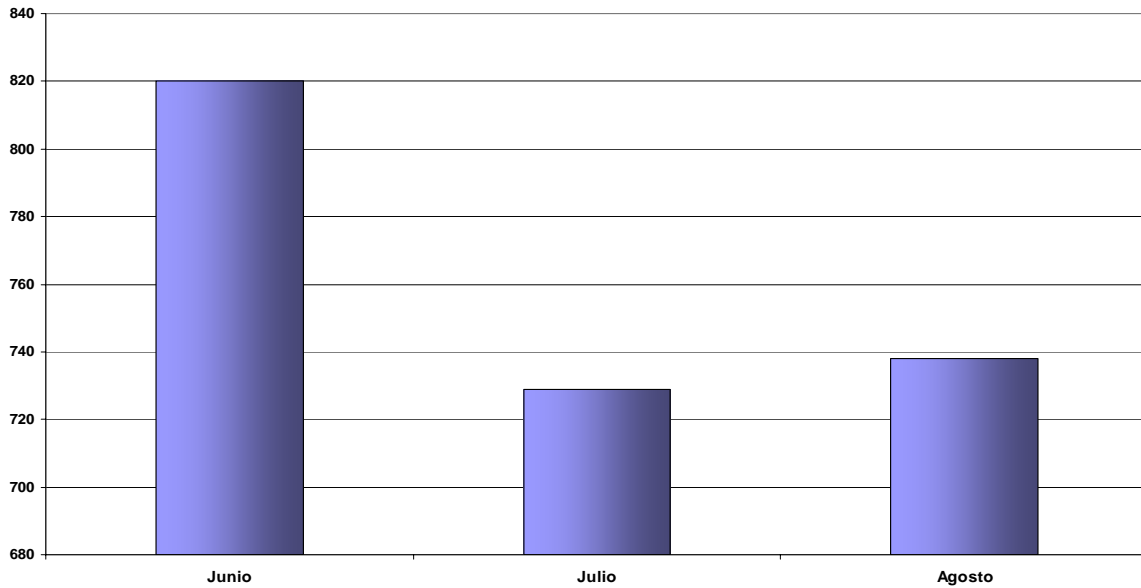


Fuente: Centro de Salud Sócrates Flores

Un total de 1074 niños comprendidos entre las edades de 2 a 11 años asistieron a consulta con manifestaciones respiratorias durante el período estudiado, de ellos 526 pertenecieron al sexo femenino (49%) y 548 (51%) al sexo masculino, (Gráfica 2). La tabla 1 muestra que los niños entre 2 y 7 años acudieron con más frecuencia a consulta por manifestaciones respiratorias. En general no hubo diferencia en los afectados según el sexo, a excepción de los niños con edad de 9 años donde el sexo femenino fue más afectado con un 64% frente a un 36% de los varones.

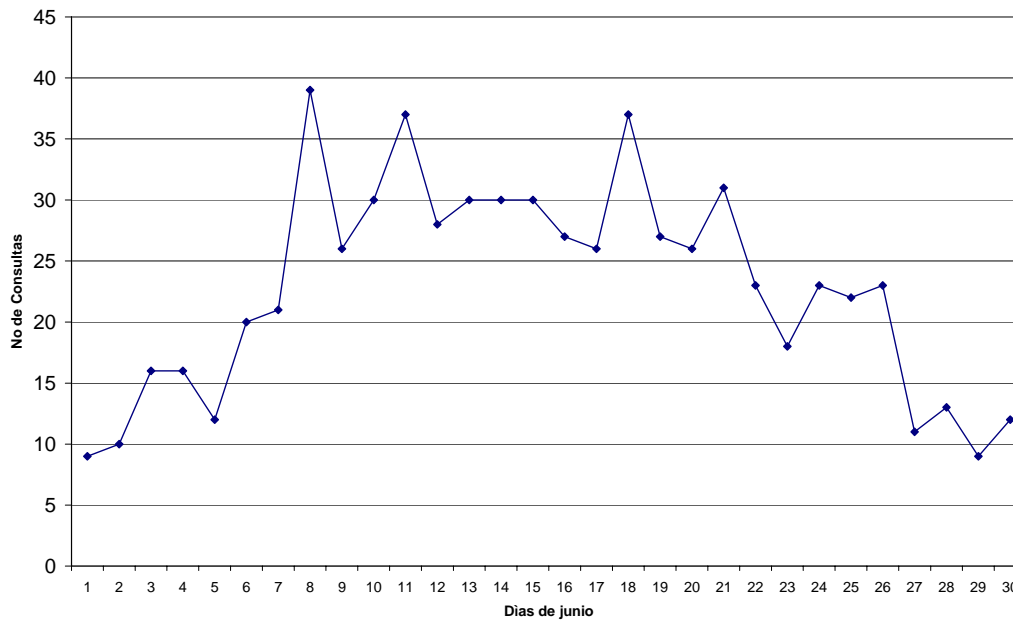
La Gráfica 3 muestra la tasa de incidencia por edad de los niños afectados, según se puede observar la tendencia fue hacia las edades más tempranas, siendo la edad de 3 años la más frecuentemente afectada con una tasa de 48.3 por cada 100 niños pertenecientes a la Cohorte. En este caso la tasa de incidencia fue calculada de acuerdo al número total de niños reclutados en la cohorte por cada año de edad.

Gráfica 4: Tasa de incidencia de niños con manifestaciones respiratorias por cada 1000 niños que asistieron a consulta por fiebre. Distrito II de Managua, Junio – Agosto 2007



Fuente: Centro de Salud Sócrates Flores

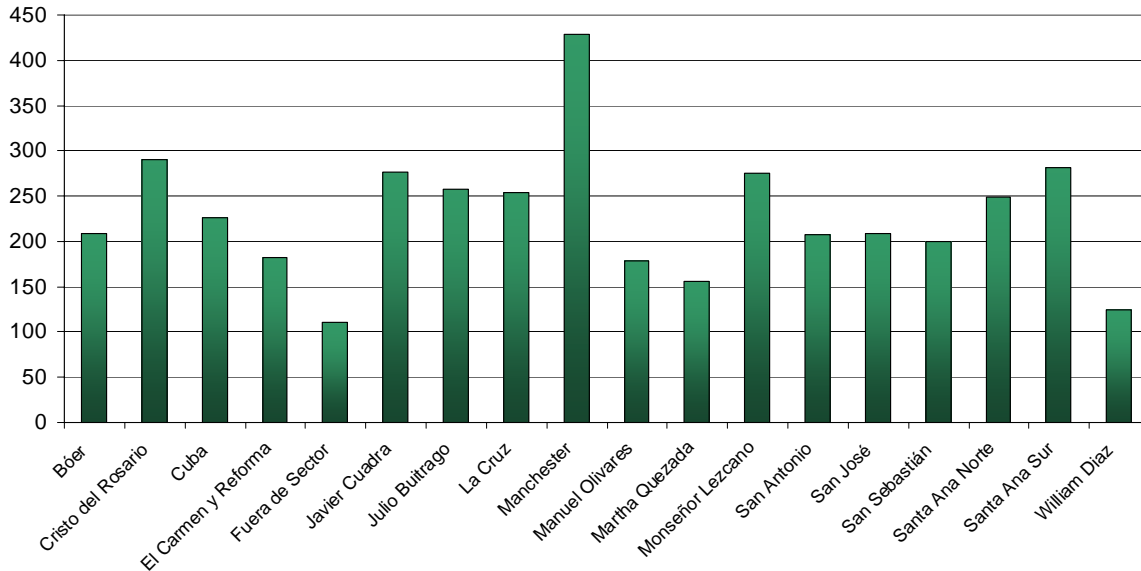
Gráfica 5: Número de consultas por día ocurrido en el distrito II de Managua durante el mes de Junio de 2007.



Fuente: Centro de Salud Sócrates Flores.

La tasa de incidencia por cada uno de los tres meses incluidos en el estudio es presentada en la Gráfica 4, se puede observar que durante el mes de junio el brote llegó a su punto más elevado con una tasa de incidencia de 820 niños por cada 1000 niños pertenecientes a la cohorte que asistieron a consulta, sin embargo específicamente dentro del mes de junio, entre los días 7 y 21, ocurrieron la mayoría de los casos según indica la Gráfica 5.

Gráfica 6: Tasa de incidencia por 1000 niños con manifestaciones respiratorias agudas por barrios del distrito II de Managua, Junio – Agosto de 2007.

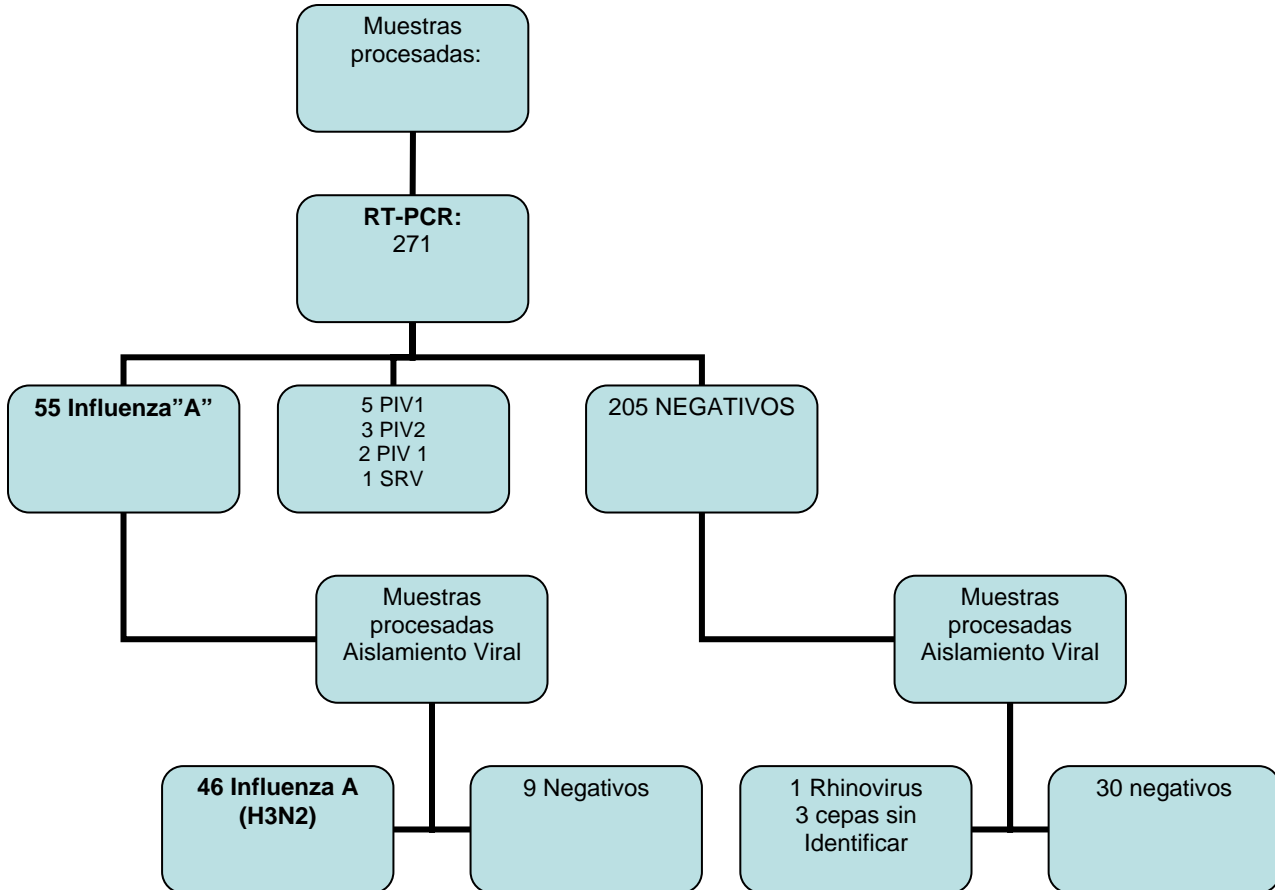


Fuente: Centro de Salud Sócrates Flores.

Como se muestra en la Gráfica 6 el barrio donde hubo mayor tasa de incidencia con manifestaciones respiratorias (429 por cada 1000 habitantes) fue el Manchester, seguido por otros barrios como Cristo del Rosario, Santa Ana Sur, Monseñor Lezcano y Javier Cuadra. Estos barrios están situados al norte y centro del distrito II de Managua. En el caso del Manchester es un barrio situado a orillas del Lago de Managua.

II- Datos de Laboratorio

Gráfica 7: Resultados de laboratorio de niños con cuadro respiratorio agudo ocurrido en el distrito II de Managua durante el periodo de Junio – Agosto de 2007.

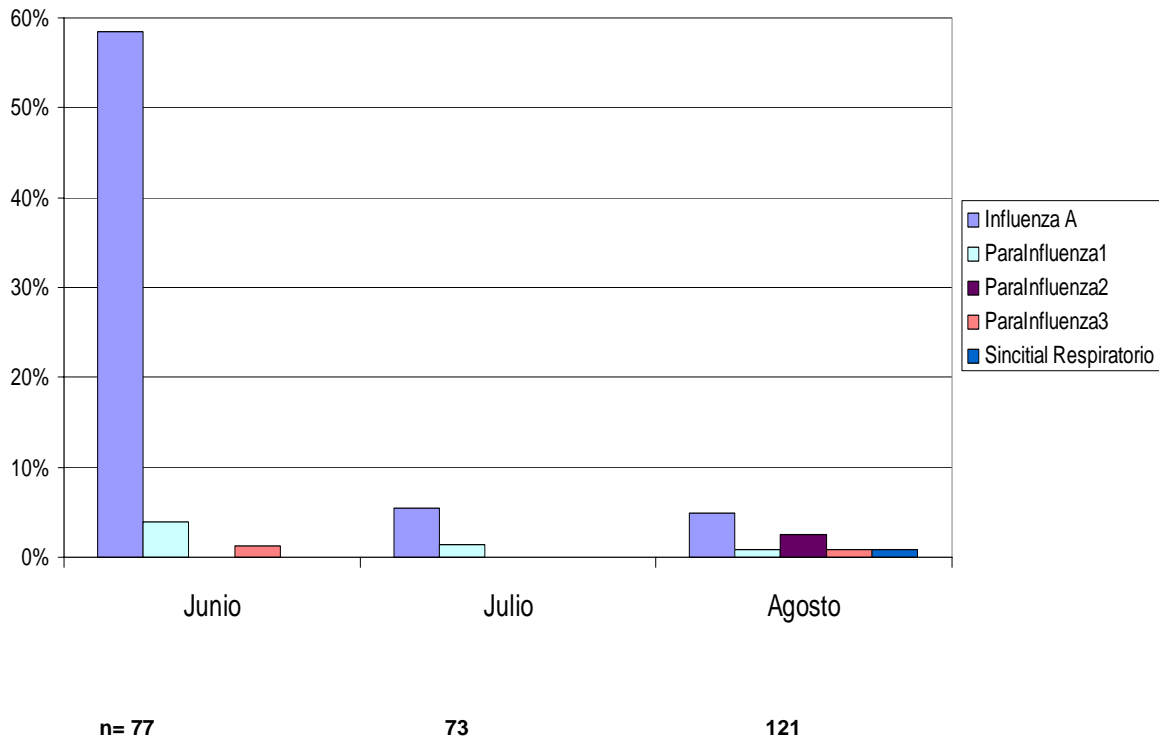


Fuente: Laboratorio Virología CNDR- MINSA

Los resultados obtenidos por el laboratorio son presentados en la Gráfica 7. Por RT-PCR se procesaron 271 muestras de hisopados nasofaríngeos resultando 55 muestras positivas para Influenza A lo que constituyó un 20% de positividad, además se identificaron otros virus como Parainfluenza 1, 2, 3 y Sincitial respiratorio.

De las 55 muestras positivas para Influenza A, 46 se lograron aislar y subtipificar como H3N2, lo que representó una tasa de aislamiento del 83%. También se logró aislar un Rinovirus y 3 cepas que aún no se han podido identificar.

Gráfica 8: Distribución de virus respiratorios por mes detectados por RT-PCR en muestras de niños con manifestaciones clínicas respiratorias en el Distrito II de Managua. Junio-Agosto 2007.



Fuente: Laboratorio Virología CNDR- MINSA

La distribución por mes de los virus identificados se presentan en la Gráfica 8. En el mes de junio, julio y agosto se procesaron 77, 73 y 121 muestras de hisopados nasofaríngeos, resultando el 58, 5.5 y 5% positivos para Influenza A respectivamente. Esta Gráfica demuestra que fue el virus de la influenza A, el principal agente causal del brote de enfermedades respiratorio ocurrido en este período.

Tabla 2: Identificación de cepas aisladas por IHA y RT – PCR en el brote de infecciones respiratorias agudas ocurrido en el distrito II de Managua, Junio – Agosto de 2007.

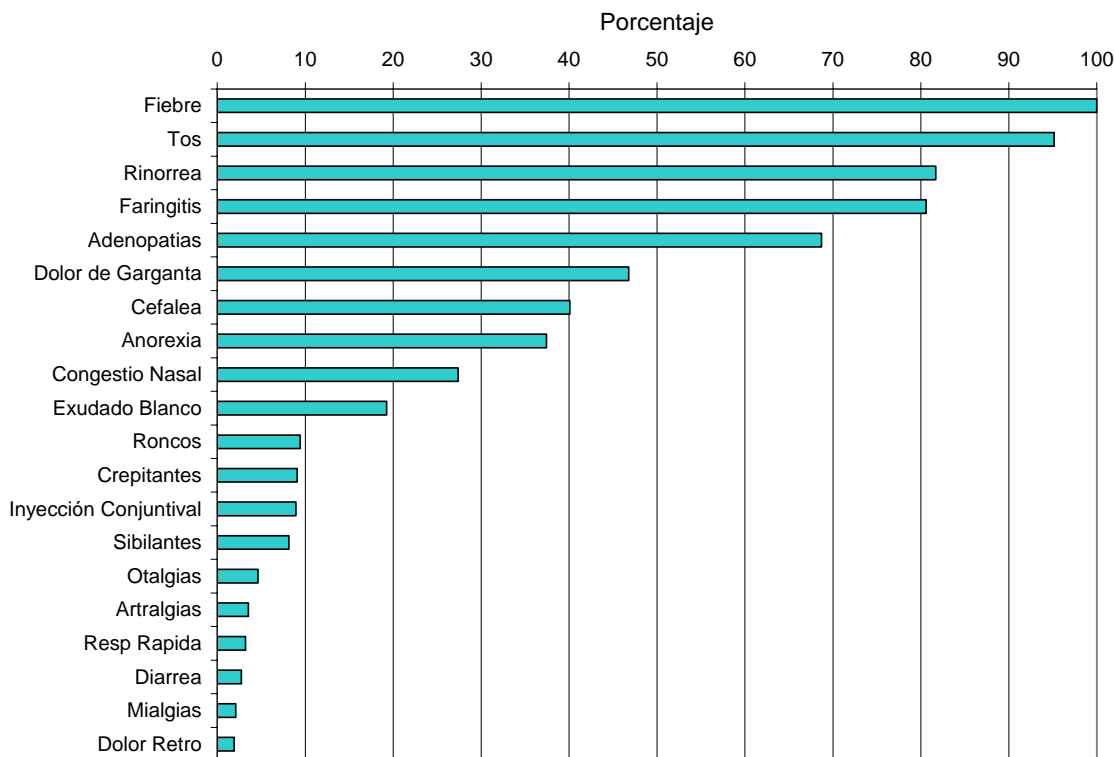
ID	IB HK	IA-H1N1 NC	control negativo	IA H3N2 Panamá/	IB Sichuan	Resultados RT-PCR
68	< 20	< 20	< 20	>1280	< 20	H3N2
490	< 20	< 20	< 20	1280	< 20	H3N2
1372	40	40	< 20	> 1280	160	H3N2
1499	320	80	< 20	>1280	160	H3N2
1508	< 20	< 20	< 20	1280	< 20	H3N2
1751	< 20	< 20	< 20	>1280	< 20	H3N2
1772	20	40	20	>1280	< 10	H3N2
1927	< 10	< 10	< 10	>1280	80	H3N2
2339	< 10	< 10	< 10	>1280	20	H3N2
2347	< 20	< 20	< 20	>1280	< 20	H3N2
3012	< 10	< 10	< 10	1280	80	H3N2
3092	< 10	< 10	< 10	>1280	80	H3N2
3339	< 20	< 20	< 20	640	< 20	H3N2
3556	< 10	< 10	< 10	1280	< 10	H3N2
4130	80	40	< 20	>1280	160	H3N2
4348	< 10	< 10	< 10	1280	40	H3N2
4367	< 20	< 20	< 20	>1280	80	H3N2
4469	< 10	< 10	< 10	1280	20	H3N2
4474	< 10	< 10	< 10	>1280	< 10	H3N2
4509	< 20	< 20	< 20	>1280	< 20	H3N2

Fuente: Laboratorio Virología CNDR- MINSa

Para la identificación del subtipo de cepas aisladas tradicionalmente se utiliza la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) con antisueros de referencia. En la tabla se puede observar la IHA realizada a 20 cepas de Influenza A aisladas durante el brote, en la misma se observa que los mayores títulos inhibidores se presentaron con el antisuero Influenza A/Panamá/H3N2, lo que indica que éste es el subtipo de las cepas aisladas. En este trabajo se ensayó un RT-PCR estandarizado en el laboratorio de Virología del CNDR para subtipificar cepas de Influenza, como se observa en la tabla, el RT-PCR coincidió en un 100 % con la IHA.

III- Cuadro Clínico del brote

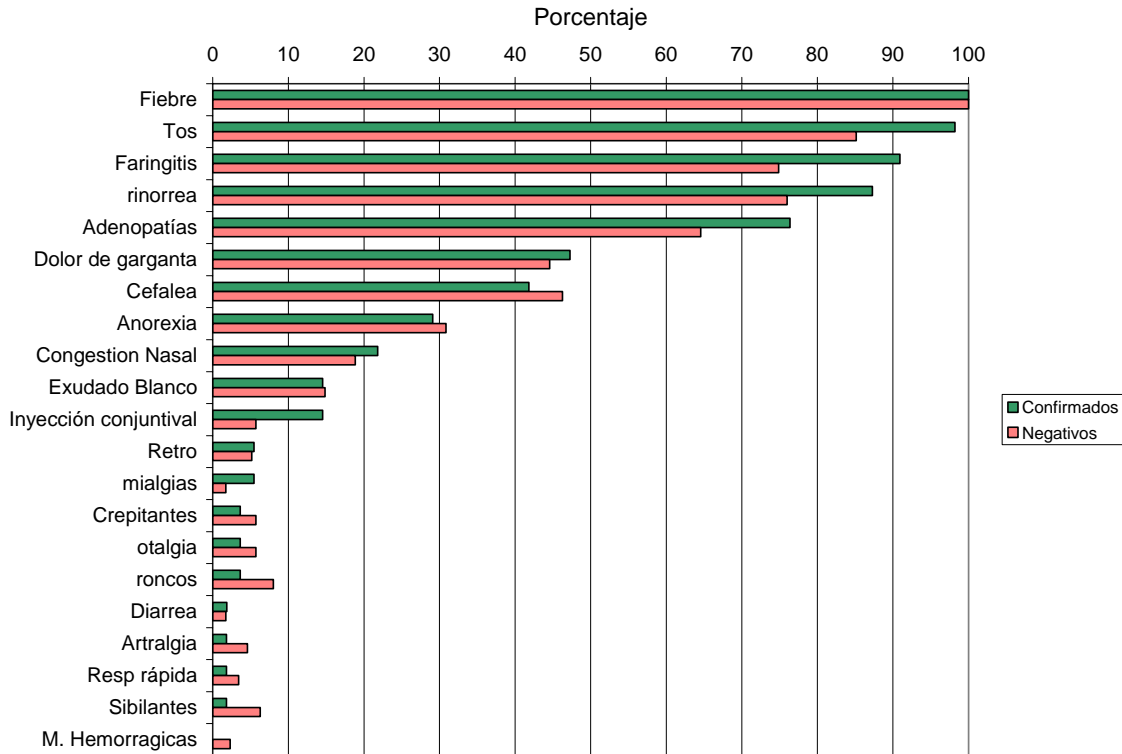
Gráfica 9: Distribución porcentual de los principales signos y síntomas en los niños con cuadro respiratorio agudo. Distrito II de Managua, Junio – Agosto de 2007.



Fuente: Centro de Salud Sócrates Flores

La fiebre, acompañada de tos, rinorrea, faringitis y adenopatías constituyeron los principales síntomas y signos observados en el Gráfico 9. Cada uno de ellos estuvo presente en más del 60% en aquellos niños afectados. Otros síntomas como el dolor de garganta, cefalea, anorexia y congestión nasal no fueron tan frecuentes y estuvieron presentes en menos del 50% de los niños estudiados durante el brote.

Gráfica 10: Distribución porcentual de los principales signos y síntomas en casos confirmados como influenza A y en casos negativos. Distrito II de Managua, Junio – Agosto de 2007.



Fuente: Centro de Salud Sócrates Flores

La Gráfica 10 muestra una comparación entre la sintomatología clínica en los casos que por laboratorio fueron confirmados como influenza A y aquellos niños que resultaron negativos. La tos, faringitis, rinorrea y adenopatías fueron más frecuentes en los casos confirmados, mientras que la cefalea, la anorexia predominaron ligeramente en los negativos.

Tabla 3: Determinación síntomas y signos con asociación estadísticamente significativa al diagnóstico clínico de influenza por análisis de regresión logística univariado. Distrito II de Managua, Junio-Agosto 2007.

Síntomas y signos	P
Faringitis	0,015
Tos	0,03
Inyección conjuntival	0,039
Rinorrea	0,08
Adenopatía	0,1
Mialgias	0,15
Sibilantes	0,22
Roncos	0,27
Artralgias	0,37
Otalgia	0,54
Crepitantes	0,54
Respiración rápida	0,55
Cefalea	0,56
Congestión nasal	0,62
dolor de garganta	0,72
Anorexia	0,8
Dolor Retroorbital	0,92
Exudado en la garganta	0,95

Fuente: Centro de Salud Sócrates Flores

Sin embargo al realizar un análisis univariado de regresión logística (tabla 3), donde cada variable fue analizada individualmente, así como la interacción entre ellas, se observó que solamente la tos, faringitis e inyección conjuntival resultaron con diferencia estadísticamente significativa entre los casos confirmados y negativos, al presentar $p < 0.05$.

Tabla 4: Evaluación de la definición de casos para el diagnóstico clínico de Influenza, ocurrido en el distrito II de Managua, Junio – Agosto de 2007.

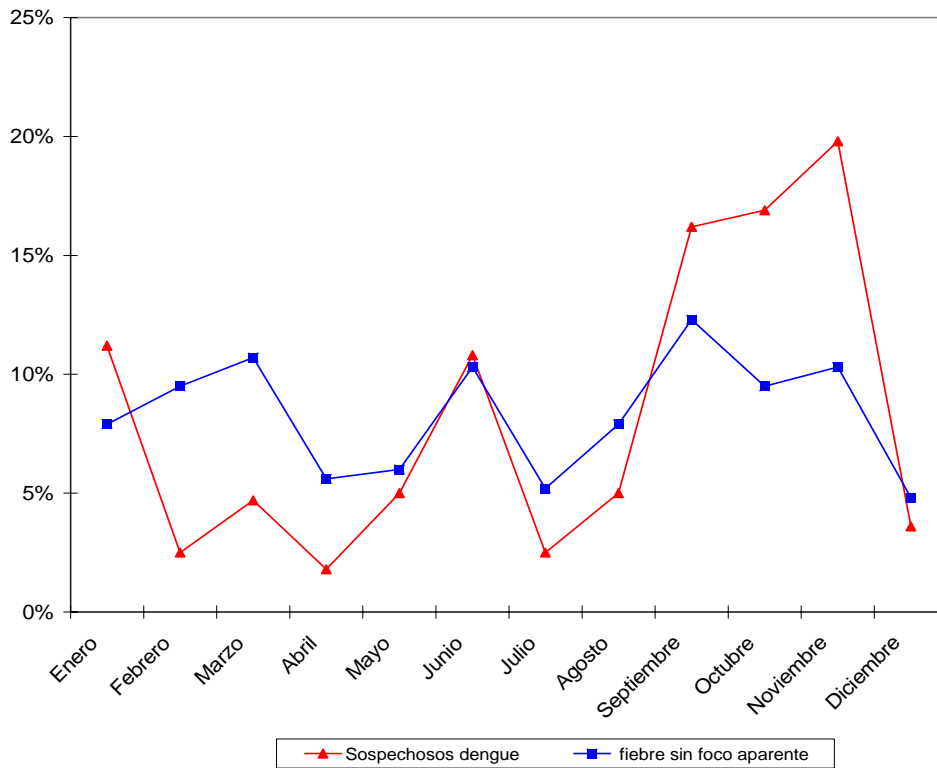
Síntomas y Signos	Sensibilidad (IC)	Especificidad. (IC)	VPP (IC)	VPN (IC).
Tres síntomas	12.7 (5.27-24.48)	97.3 (93.77-99.11)	58.3 (27.67- 84.83)	78.85 (72.96- 83.98)
Dos síntomas	78.18 (64.99-88.19)	39.13 (32.03-46.58)	27.74 (20.86- 35.50)	85.71 (76.38- 92.39)
Tos y Faringitis	89.09 (77.75-95.89)	35.43 (28.36-43.00)	30.25 (23.29 - 37.95)	91.18 (81.78 - 96.69)
Tos e Inyección conjuntival	14.55 (6.50-26.66)	96 (91.93 - 98.38)	53.33 (26.59 - 78.73)	78.14 (72.01- 83.47)
Faringitis e Inyección conjuntival	12.73 (5.27-24.48)	96 (91.93 - 98.38)	50 (23.04 - 76.96)	77.78 (71.64 - 83.14)

Fuente: Centro de Salud Sócrates Flores

Las tres manifestaciones clínicas que resultaron estadísticamente significativas fueron evaluadas como definición de caso para el diagnóstico clínico de Influenza. La tabla 4 muestra que al estar presente los 3 síntomas, la definición resulta altamente específica (especificidad 97.3%) y poco sensible (sensibilidad 12.7%). Cuando indistintamente se evalúa la presencia de 2 de las 3 manifestaciones clínicas aumenta la sensibilidad y disminuye la especificidad. No obstante se puede observar que es la combinación de tos y faringitis la que proporciona sensibilidad a la definición, mientras que las combinaciones de tos e

inyección conjuntival y faringitis e inyección conjuntival proporcionan especificidad.

Gráfica 11: Casos sospechosos de Dengue y casos de fiebre sin foco aparente. Distrito II de Managua durante los meses del 2007.



Fuente: Centro de Salud Sócrates Flores

Durante el mes de junio se observó un aumento en el reporte de casos sospechosos de dengue y fiebre sin foco aparente con respecto a los meses anteriores (Gráfica 11), interesantemente, todos ellos resultaron negativos a Dengue por pruebas de laboratorio.

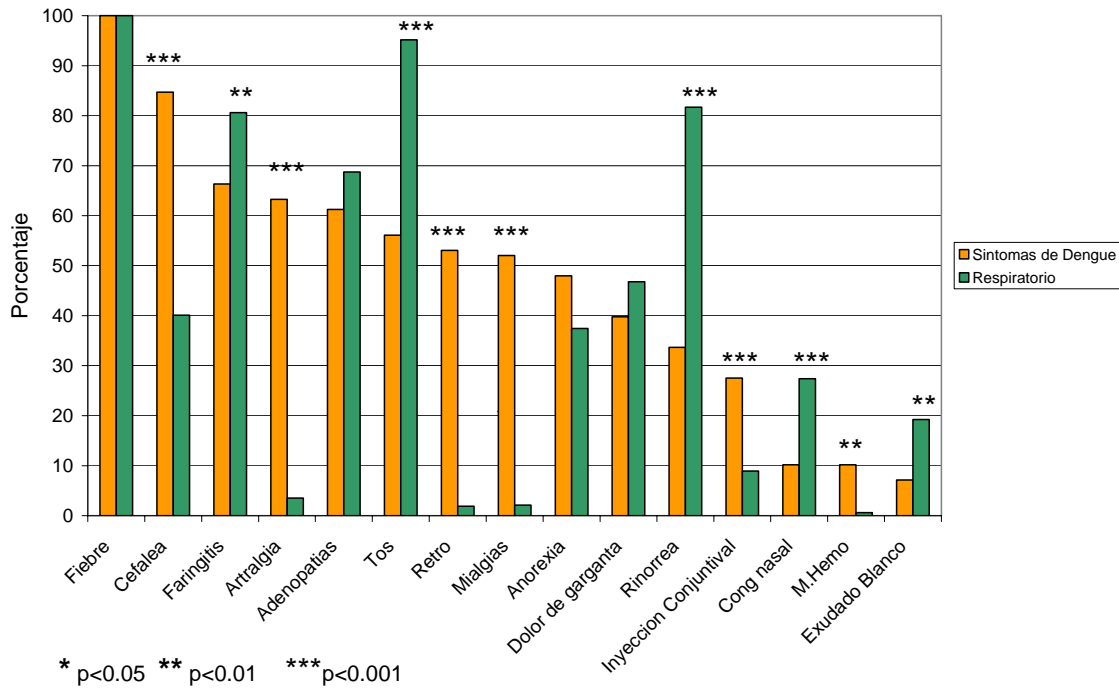
Como en estos niños la sospecha fue de dengue, el material biológico colectados de ellos fue suero sanguíneo en lugar de hisopado nasofaríngeo (muestra que se utiliza para el diagnóstico de Influenza). Las muestras fueron tomadas en dos momentos diferentes, uno en la fase aguda (cuatro primeros días de la enfermedad) y otra en fase de convalecencia (14 a 21 días después de tomada la primera muestra).

Setenta y dos niños fueron diagnosticados como casos sospechoso de dengue y con fiebre sin foco aparente, 36 de cada uno respectivamente, a todos ellos se le realizó una consulta inicial y varias de seguimientos al igual que a los niños con manifestaciones respiratorias. A las muestra de suero de cada uno de ellos se le realizó la técnica de Inhibición de la hemaglutinación (IHA) para diagnóstico de

Influenza, utilizando como antígeno una cepa de Influenza A aislada durante el brote, el 50% de los niños sospechosos de dengue y 33% de los que presentaron fiebre sin foco aparente resultaron positivos a Influenza A por IHA.

Aunque no fue un objetivo inicial del trabajo se presenta la caracterización clínica de estos atípicos cuadros clínicos debido a la importancia de estos hallazgos.

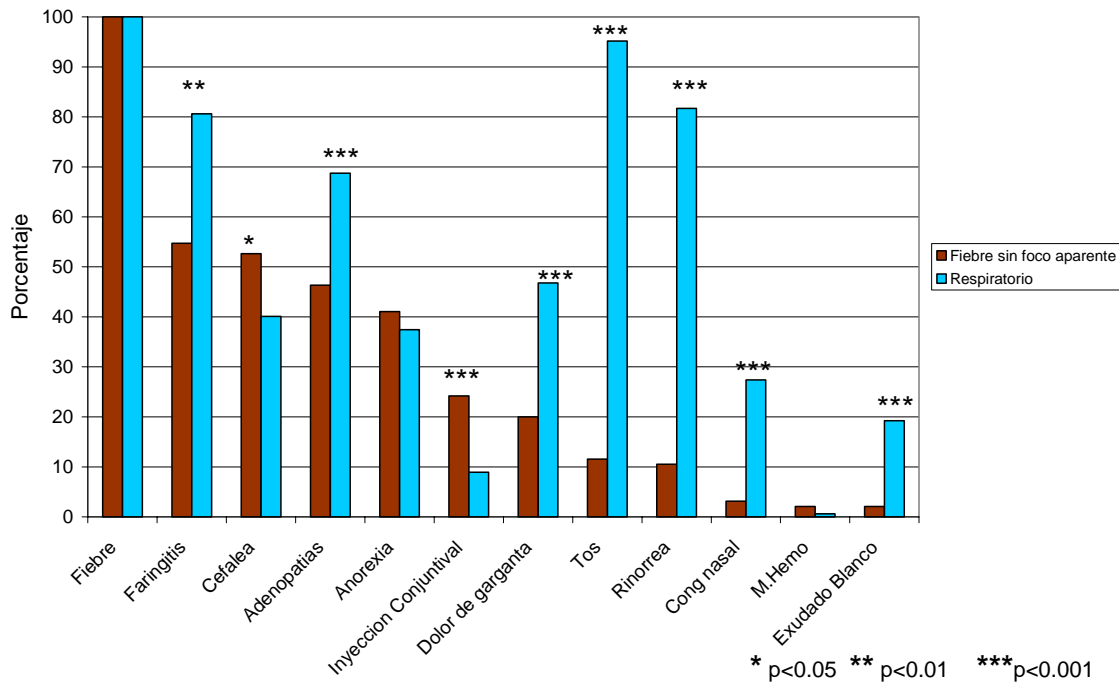
Gráfica 12: Comparación entre los principales síntomas y signos presentados por los niños con cuadro similar al dengue y las manifestaciones clínicas presentadas por los niños con cuadro respiratorio agudo. Distrito II de Managua, Junio – Agosto de 2007.



Fuente: Centro de Salud Sócrates Flores

En esta Gráfica se presentan los principales signos y síntomas que caracterizaron al cuadro similar al dengue, se puede observar que la fiebre, cefalea, faringitis, artralgia y adenopatías fueron las manifestaciones clínicas predominantes, también se muestra la comparación con el cuadro clínico respiratorio caracterizado en este estudio. Se observa que manifestaciones clínicas como cefalea, artralgia, dolor retroorbital, mialgias e inyección conjuntival fueron mas prevalentes en el cuadro similar al dengue que en el cuadro respiratorio, lo que fue estadísticamente significativo, lo contrario sucedió en el cuadro respiratorio donde la faringitis, la tos, rinorrea, y el exudado blanco en la faringe prevalecieron, también con significancia estadística.

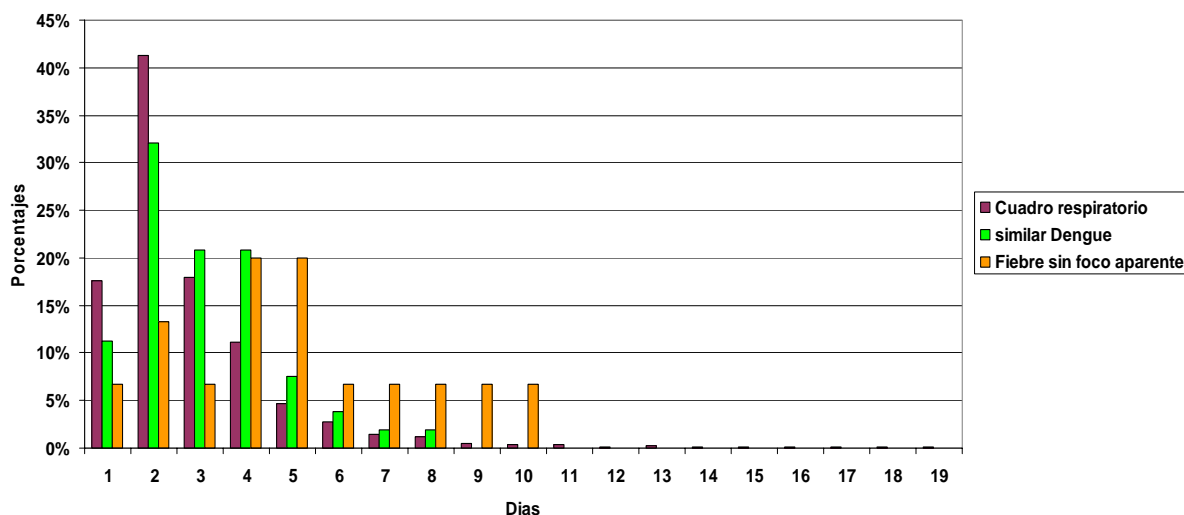
Gráfica 13: Comparación entre los principales síntomas y signos presentados por los niños con cuadro de fiebre sin foco aparente y las manifestaciones clínicas presentadas por los niños con cuadro respiratorio agudo. Distrito II de Managua, Junio – Agosto de 2007.



Fuente: Centro de Salud Sócrates Flores

El cuadro sin foco aparente se caracterizó como su nombre lo indica, por fiebre, y menor presencia de síntomas generales como faringitis, cefalea, adenopatías y anorexia que no permitió a los médicos llegar a un diagnóstico definitivo. La Gráfica 13 muestra que los síntomas que caracterizaron al brote de infección respiratoria aguda, como son: tos, rinorrea, entre otros, estuvieron prácticamente ausente en este cuadro sin foco aparente.

Gráfica 14: Días transcurridos para la aparición de síntomas respiratorios agudos, en pacientes con tres cuadros clínicos: a) cuadro respiratorio, b) cuadro similar al dengue, y c) fiebre sin foco aparente. Distrito II de Managua, Junio – Agosto del 2007.



Cuadro clínico	Media	Desviación estándar
Respiratorio	2.8	2.6
Similar dengue	3	1.54
Fiebre sin foco aparente	6	4.35

Fuente: Centro de Salud Sócrates Flores

El momento de aparición de los síntomas respiratorios es mostrado en la Gráfica 14, en la misma se observa que tanto en el cuadro respiratorio como en el cuadro con manifestaciones similares al dengue, los síntomas respiratorios aparecen en los tres primeros días, no así en el cuadro de fiebre sin foco aparente donde las manifestaciones respiratorias aparecieron de forma tardía con un promedio de 6 días.

DISCUSION:

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son actualmente un problema de salud, debido a la diversidad de agentes etiológicos que las causan, por lo que se ha referido que la gravedad de las mismas varía de un país a otro, siendo motivo de consulta e ingresos en un gran número de pacientes afectados. (36,37). Numerosos virus están involucrados en la producción de enfermedades respiratorias, sin embargo el virus de la Influenza por su importancia epidemiológica constituye el principal objetivo de los sistemas nacionales e internacionales de vigilancia epidemiológica. En 1947 se estableció la Red Mundial de Vigilancia de la Influenza de OMS, en la actualidad hay 116 Centros Nacionales contra la Influenza con laboratorios en 87 países y 4 Centros colaboradores de OMS, cuyos objetivos son: Vigilar los virus de la influenza que están circulando y hacer recomendaciones anuales sobre la composición de la vacuna, detectar oportunamente cepas inusuales de Influenza que sea una potencial causante de Pandemia y proporcionar cepas prototípicas para la vacuna (38).

Con la aparición de las cepas de Influenza aviar H5N1 y su transmisión al hombre a través del contacto con aves infectadas, una alerta mundial se ha activado, con el peligro adicional de que hace 40 años que no aparece una cepa pandémica de Influenza A. (39, 40, 41).

En Nicaragua existe vigilancia sindrómica para la neumonía, sin embargo la vigilancia contra el virus de la Influenza es todavía incipiente. A pesar de que el Laboratorio de Virología del CNDR ha estado haciendo un esfuerzo por estabilizar el diagnóstico de la influenza desde el 2003, no es hasta el 2007 y con el presente estudio que se logra este objetivo. Debido a esto no existe un conocimiento adecuado de la epidemiología de la Influenza en el país.

Desde el año 2004 se estableció en el área del centro de salud Sócrates Flores una Cohorte de aproximadamente 4000 niños entre las edades de 2 a 11 años, todos los eventos de salud de estos niños son estrictamente controlados a través de todo un sistema constituido por médicos, enfermeros, laboratoristas, informáticos y digitadores entre otros. La organización de esta Cohorte ha sido aprovechada para realizar diferentes estudios. En un estudio retrospectivo realizado con el objetivo de conocer las características estacionales de los brotes de enfermedades respiratorias en la Cohorte, se observó que existieron al menos 2 picos de alta incidencia en los años 2005 y 2006, el primero durante los meses de Junio a Julio y el segundo en Noviembre a Diciembre del 2006. (7).

En el 2007 se observó nuevamente en el mes de Junio un aumento de la incidencia de enfermedades respiratorias en los niños de la Cohorte, este estudio describe las características demográficas, epidemiológicas, clínicas y por primera vez en el país se utilizan los resultados de laboratorio para el estudio de un brote de enfermedades respiratorias. El grupo de edad estudiado es de 2

a 11 años de edad (composición de la Cohorte), es cierto que no se abarcan otros grupos de edades pero son los niños los que mayormente son afectados por estas enfermedades (42, 43). En este estudio fueron los grupos de edades más tempranas los que más frecuentemente se enfermaron lo que coincide con lo reportado por otros autores. Brownstein y col en un estudio de infecciones respiratorias en niños y adultos demostraron que la tasa de infección en las edades entre 3 y 4 años servía como factor predictor de la tasa de enfermedad en adultos (44).

Con respecto a la distribución geográfica del brote, los primeros casos fueron localizados en la parte suroeste del sector, desplazándose rápidamente al norte, siendo el barrio Manchester el que más alta tasa de incidencia tuvo. Este es un barrio de alto riesgo, debido a las inundaciones al que esta expuesto por presentar una ubicación cerca del Lago de Managua, y carecer en su totalidad de agua potable, aunque cuenta con 87 pozos pero ninguno de ellos funciona por lo que tiene muy pocas condiciones higiénicas sanitarias lo que facilita la propagación del virus.

El brote de enfermedades respiratorias que ocurrió en Junio del 2007 fue causado fundamentalmente por el virus de Influenza A subtipo H3N2 como fue confirmado por el laboratorio. Este resultado constituyó un logro importante para la salud pública del país ya que desde hacía aproximadamente cuatro años se estaba tratando de estandarizar este diagnóstico en el laboratorio de Virología del CNDR con resultados infructuosos por diferentes circunstancias. La estandarización del diagnóstico de influenza y otros virus respiratorios representa una importante herramienta para el sistema de vigilancia epidemiológica porque además de permitir la aplicación de medidas oportunas para combatir los brotes ayudará a evitar el uso indiscriminado de antibióticos en las enfermedades respiratorias.

Además de la detección del virus de la influenza A y otros virus respiratorios por RT-PCR se lograron aislar y subtipificar 32 cepas de Influenza A H3N2, las que fueron enviadas al CDC de Atlanta, quien confirmó el diagnóstico realizado en Nicaragua. Por primera vez, el país se incluyó en la red mundial de Influenza, lo cual estaba siendo reclamado por las autoridades sanitarias internacionales, ya que hasta el momento se desconocía qué cepas circulaban en el país.

Las cepas circulantes fueron confirmadas como A/Brisbane/10/2007, una nueva variante genética de la cepa A/Wisconsin/67/2005 la cual será recomendada para la vacuna del 2008 en el Hemisferio Occidental.

Dentro del estudio se incluyó la comparación de un RT-PCR múltiplex para subtipificar cepas de Influenza A, con el método estándar de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA), lo que resultó en un 100% de concordancia. El RT-PCR, presenta ciertas ventajas sobre la IHA, ésta última, es un técnica compleja, consumidora de tiempo, que necesita sangre de diferentes especies animales o

humano del grupo O y además necesita de un proceso previo de tratamiento de la muestra. El RT-PCR obvia todos estos pasos y es una técnica que ha demostrado presentar excelente sensibilidad y especificidad, como lo han reportado diferentes autores. T Mokhtari-Azad y col demostraron en un estudio realizado en Teherán, que el PCR fue más sensible que el aislamiento viral para detectar influenza A y B. Carrazo y col reportaron la aplicación de un RT-PCR para detectar influenza A y B con una sensibilidad del 92.3% y especificidad del 98.5% comparada con el aislamiento viral, mientras que Takao y col reportaron la utilidad del PCR para detectar co-infecciones de influenza A y B (45,46, 47).

Además del virus de la influenza A, también fueron detectados Parainfluenza 1, 2 y 3 y Sincicial Respiratorio, pero en mucha menor escala. El laboratorio de Virología próximamente incorporará el diagnóstico de otros virus, también por RT-PCR, como Adenovirus y Meptaneumovirus, lo que permitirá responder al interrogante de que si estos virus también están circulando en el país.

Los brotes epidémicos de Influenza se caracterizan por diferentes manifestaciones clínicas. En el presente estudio los principales síntomas y signos fueron fiebre, tos, rinorrea y faringitis. Ros Arana y col en un estudio de 4 brotes en Zaragoza, España observaron como síntomas más frecuentes; la fiebre, tos, rinorrea y vómitos, también fueron importante faringitis, tonsilitis y otitis (48) mientras que en el presente estudio el vómito, tonsilitis y otitis no constituyeron síntomas y signos importantes. Nicholson K en su estudio (49) reporta como principales manifestaciones clínicas, tos no productiva, cefalea, mialgias, malestar general, dolor de garganta, anorexia, estornudo y rinorrea. Es llamativo que la cefalea y mialgias no representaron síntomas importantes en el presente estudio, la cefalea se observó en el 40% de los afectados y mialgias en menos del 10%. Además de Nicholson, cefalea y mialgias son también reportadas como manifestaciones importantes por otros investigadores (50, 51). Existe la posibilidad de que como en este estudios fueron los niños menores de 5 años los que mayoritariamente enfermaron, ellos todavía no pueden manifestar con claridad los síntomas y signos que los afectan, razón por la cual la cefalea y mialgias no constituyeron manifestaciones importantes.

Debido a la diversidad de manifestaciones clínicas es importante una definición de casos que sea útil para diferenciar clínicamente las infecciones causadas por los virus de la Influenza de otros virus respiratorios. Esto es un objetivo importante que se han trazado diferentes investigadores e instituciones. El protocolo genérico diseñado por OMS para la vigilancia epidemiológica de la influenza plantea como definición de caso: La aparición súbita de fiebre y tos o dolor de garganta y ausencia de otras causas (38). Pensamos que esta definición es bastante inespecífica, en este estudio, el dolor de garganta por si solo no constituyó un síntoma importante, lo contrario del dolor y enrojecimiento de garganta al cual se le denominó faringitis.

Los síntomas y signos con diferencia estadísticamente significativa entre los casos confirmados de influenza y los negativos fueron la tos, faringitis e inyección conjuntival, lo que constituyó nuestra definición para intentar diagnosticar clínicamente la infección por el virus de la influenza. Llama la atención que la inyección conjuntival a pesar de no constituir un signo frecuente de las manifestaciones clínicas del brote, sí resultó estadísticamente significativo en los casos diagnosticados como influenza.

La definición se evaluó analizando la presencia de los 3 síntomas o cuando se presentaron 2 de las 3 manifestaciones, lo que significa que cuando se encontró fiebre (estuvo presente en el 100% de los casos) mas tos, faringitis e inyección conjuntival solamente se lograría identificar el 12.7% de los casos de influenza (sensibilidad), sin embargo la ausencia de estos 3 síntomas y signos significaría que solamente el 3% de estos pacientes estarían infectados con el virus de la influenza (especificidad). No obstante si estuvo presente la fiebre mas dos de los tres síntomas y signos del modelo, entonces se podría captar el 78% de los casos y el 89% cuando esos síntomas y signos fueran la tos y la faringitis. En estos casos la definición es muy sensible pero poco específico por lo que tendría un elevado número de casos falsos positivos.

Friedman y Attia evaluaron un modelo constituido por tos, dolor de cabeza y faringitis, el cual tuvo una sensibilidad y especificidad de 80 y 78% respectivamente (52), mientras que para Monto y col el modelo fue representado por tos y fiebre, ellos reportaron un VPP de 79% y $p < 0.001$. (53). Pensamos que si este modelo es evaluado con un mayor número de casos positivos, se podría observar una mejor eficiencia del mismo.

Un fenómeno interesante fue observado, los datos mostraron que además de los casos con manifestaciones respiratorias durante el mes de Junio del 2007, también aumentaron los reportes de dengue y fiebre sin foco aparente en los niños de la Cohorte. La negatividad a dengue en estos casos por pruebas de laboratorio llamó la atención por lo que se decidió realizar IHA para detectar anticuerpos contra el virus de la influenza A en los sueros pareados que habían sido tomados para el diagnóstico de dengue. El 50% de los casos sospechosos de dengue y el 33% de los casos con fiebre sin foco aparente resultaron positivos, al detectarse un aumento de anticuerpos específicos contra el virus de la influenza A.

A pesar de que este hallazgo no fue parte de los objetivos del estudio, por su importancia se decidió analizarlo e incluirlo en el presente trabajo. Indudablemente estos niños fueron afectados por dos cuadros clínicos diferentes (Gráfica 12 y 13). El cuadro, al cual los médicos diagnosticaron como dengue, a pesar de caracterizarse por fiebre en el 100% de los casos presentó síntomas y signos con diferencias estadísticamente significativas al cuadro clínico respiratorio objetivo de este estudio. Estos síntomas fueron cefalea, artralgia, dolor retroorbital entre otros, que hicieron pensar en un diagnóstico de dengue,

por el contrario, la tos, faringitis y rinorrea no estuvieron presentes con la frecuencia del cuadro respiratorio los cuales también fueron estadísticamente significativos. Este cuadro clínico debe ser objetivo de futuros estudio más profundos ya que no encontramos reportes similares en la literatura.

El cuadro de fiebre sin foco aparente sí ha sido reportado por otros autores Benito-Fernández y col (54), lo reportó en una evaluación de prueba rápida de influenza A y B en 206 niños de 0 a 36 meses de edad con fiebre sin foco aparente, el 40% de ellos resultaron positivos para influenza. En nuestro estudio este cuadro clínico se caracterizó fundamentalmente por ausencia de tos y otras manifestaciones respiratorias, que en los casos en los que se manifestaron se presentaron tardíamente.

Este estudio constituye la base para futuras investigaciones que contribuyan al mejor conocimiento de la epidemiología de la influenza y otros virus respiratorios en Nicaragua, y al fortalecimiento del sistema de vigilancia epidemiológica del país, para que el mismo se encuentre preparado para detectar oportunamente y enfrentar a futuras epidemias y pandemias.

CONCLUSIONES:

- 1- Los niños menores de cinco años fueron los más afectados por el cuadro respiratorio en la población estudiada con una tasa de incidencia por encima del 40%.
- 2- No hubo diferencia significativa con respecto al sexo de los niños afectados.
- 3- Los barrios al norte y centro del distrito II de la Ciudad de Managua fueron los más afectados con tasa de incidencia por encima de 250 por cada 1000 habitantes.
- 4- El brote fue causado fundamentalmente por el virus de la influenza A, y además otros virus fueron detectados como son: Parainfluenza 1, 2, 3, Sincitial respiratorio y Rinovirus.
- 5- El subtipo del virus de la Influenza A fue H3N2 el cual fue aislado en el laboratorio de Virología del CNDR y confirmado por el CDC de Atlanta.
- 6- Las cepas aisladas corresponden a la variante, A/Brisbane/10/2007, la que ha sido recomendada para la composición de la vacuna del 2008 del Hemisferio occidental.
- 7- El RT-PCR estandarizado en el laboratorio de Virología coincidió en un 100% con la IHA (prueba de referencia) en la subtipificación de cepas aisladas de Influenza A H3N2.
- 8- Fiebre (100%), tos (95.2%), rinorrea (81.7%), faringitis (80.6%) y adenopatías (68.7%) fueron las manifestaciones clínicas predominantes en el cuadro respiratorio.
- 9- La faringitis, tos, e inyección conjuntival constituyeron las manifestaciones clínicas con diferencia estadísticamente significativas.
- 10- La faringitis, tos e inyección conjuntival constituyeron un modelo multivariado que resultó ser estadísticamente significativo para diferenciar los casos confirmados de influenza de los casos negativos
- 11- El modelo estadístico presentó alta especificidad cuando se evaluaron los tres signos y una elevada sensibilidad cuando estuvieron presente la tos y la faringitis, sin embargo la especificidad disminuyó.
- 12- Además del cuadro respiratorio se presentaron otros dos cuadros con diferentes manifestaciones clínicas, uno donde predominaron la tos, cefalea, artralgia, mialgias, dolor retroorbital que puede confundirse con dengue y el otro caracterizado por fiebre sin foco aparente y ausencia de manifestaciones respiratorias que se presentaron tardíamente en el escaso número que lo manifestaron.

RECOMENDACIONES

Se sugiere hacer investigaciones más amplias de otros virus respiratorios como los Adenovirus, Picornavirus, Enterovirus, Meptaneumovirus.

Estabilizar y proporcionar sostenibilidad a la vigilancia epidemiológica de las enfermedades respiratorias.

Realizar futuras investigaciones referentes a cuadro similar al dengue y fiebre sin un foco aparente.

Evaluar la definición de casos para diagnosticar clínicamente los casos de influenza con una muestra de mayor tamaño

Participar en la formulación de la vacuna anual de Influenza con el envío de cepas aisladas y subtipificadas de Influenza virus al CDC de Atlanta.

.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. Manual Moderno. 17ª edición. 2001, cap 39, pag 570.
2. Ayora G (1999): Influenza: Historia de una enfermedad. Rev. Biomed, 10, 57- 61
3. Kreiser, C.M. 2006. "1918 Spanish influenza outbreak: the enemy within." *American History Magazine*, December. Accessed on December 19, 2006.
4. Potter, C.W. 2001. "A history of influenza." *Journal of Applied Microbiology*, 91(4):572.
5. Datos suministrados por Sistema Nicaraguense de Vigilancia Epidemiológica Nacional (SISNIVEN).
6. Datos suministrados por U.S. Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine – West Fort Lewis, Washington (USACHPPM).
7. Gordon A, Ortega O, Kuan G, Reeingold A, Saborio S, Balmaseda A, Harris E (2008) Burden and Seasonality of Influenza like illness in a pediatric cohorte in Nicaragua: sent to Clin Inf Dis.
8. Brouard J, Vabret A, Nimal-Cuvillon D, Bach N, Bessièrè A, Arion A, Freymuth (2007) Epidemiology of acute upper and lower respiratory tract infections in children] Rev Prat. Oct 31; 57(16):1759-66.
9. Cheng VC, Wu AK, Cheung CH, Lau SK, Woo PC, Chan KH, Li KS, Ip IK, Dunn EL, Lee RA, Yam LY, Yuen KY. Outbreak of human metapneumovirus infection in psychiatric inpatients: implications for directly observed use of alcohol hand rub in prevention of nosocomial outbreaks Hosp Infect. 2007 Dec;67(4):336-43. Epub 2007 Nov 19.
10. Sivan AV, Lee T, Binn LN, Gaydos JC. Adenovirus-associated acute respiratory disease in healthy adolescents and adults: a literature review. Mil Med. 2007 Nov; 172(11):1198-203.
11. Brownlee JW, Turner RB. (2008). New developments in the epidemiology and clinical spectrum of rhinovirus infections. Curr Opin Pediatr. Feb; 20(1):67-71.
12. Acuña L. G. (2004) Influenza: Historia y amenazas. Rev Chil Infect; 21 (2): 162-164.
13. Fornek JL, Korth MJ, Katze MG (2007). Use of functional genomics to understand influenza-host interactions. Adv Virus Res. 2007; 70:81-100.
14. Ferraris O, Lina B. (2008) Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. J Clin Virol. Jan;41(1):13-9.
15. Landolt GA, Olsen CW (2007). Up to new tricks - a review of cross-species transmission of influenza A viruses. Anim Health Res Jun; 8(1):1-21.
16. Biblioteca Virtual de Salud, México En: www.bvs.isps.mx

17. Taubenberger JK, Morens DM. (2007) The Pathology of Influenza Virus Infections. *Annu Rev Pathol.* 2007 Oct 15
18. Murphy BR, Clements ML. (1989). The systemic and mucosal immune response of humans to influenza A virus. In: Mestecky J, McGhee JR, eds. *Current topics microbiology and immunology.* New York: Springer-Verlag, 146:107–116.
19. Berg RA, Yolken RH, Rennard SI, et al. (1980) New enzyme immunoassays for measurement of influenza A/Victoria/3/75 virus in nasal washes: A preliminary report. *Lancet* 1:851–853.
20. Hinshaw VS, Olsen CW, Dybdahl-Sissoko N, et al. (1994) Apoptosis: A mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J Virol* 68:3667–3673.
21. Blau DM, Compans RW (1996). Polarization of viral entry and release in epithelial cells. *Semin Virol*; 7:245–253.
22. Hayden FG, Scott FR, Lobo MC, et al (1998). Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection: Relation to symptom formation and host defense. *J Clin Invest*; 101:643–649.
23. García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, et al (1998). Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*; 252:324–330.
24. Ahmed R, Oldstone MB, Palese P (2007). Protective immunity and susceptibility to infectious diseases: lessons from the 1918 influenza pandemic. *Nat Immunol.* Nov; 8(11):1188-93.
25. García-Sastre A, Durbin RK, Zheng H, et al (1998) The role of interferon in influenza virus tissue tropism. *J Virol*; 72:8550–8558.
26. Lewis DE, Gilbert BE, Knight V (1986). Influenza virus infection induces functional alterations in peripheral blood lymphocytes. *J Immunol*; 137:3777–3781.
27. Takahashi Y (2007). Memory B cells in systemic and mucosal immune response: implications for successful vaccination. *Biosci Biotechnology Biochem.* Oct;71(10):2358-66
28. Brown TA, Murphy BR, Radl J, et al (1985) Subclass distribution and molecular form of immunoglobulin A hemagglutinin antibodies in sera and nasal secretions after experimental secondary infection with influenza A virus in humans. *J Clin Microbiol* 22:259–264.
29. Abramson JS, Mills EL. (1988) Depression of neutrophil function induced by viruses and its role in secondary microbial infections. *Rev Infect Dis* 1988; 10:326–341.
30. Murray CS et al: (2006). Influenza virus. *Microbiology* 3rd Ed Chapter 56
31. Navarro-Marí JM, Pérez-Ruiz M. (2007) Respiratory viruses: old and new. Review of diagnostic methods. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* Oct;25
32. Som 208 Microbiology Syllabus (2007) Orthomyxoviridae – Influenza viruses.

33. Technical Bulletin. Access RT-PCR System Influenza and respiratory virus
34. QIAamp Viral RNA Mini Handbook for purification of viral RNA from plasma, serum cell-free body fluids and cell-culture supernatants. Second Edition 2005
35. Manual de Procedimientos para el diagnostico de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral. IPK. Nov 2003
36. Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. (1998) Multiplex PCR for typing and subtyping Influenza and Respiratory viruses. *Jclin Microb Oct*, 2990 – 2995
37. González Ochoa E. (1999) Metodología para un estudio epidemiológico sobre infecciones respiratorias agudas. *Rev. Cubana Med. Trop*;44(2):83-91.
38. Benquiqui Y. Prioridades en la salud infantil. *Noticias sobre IRA 1998-1999*;25(2):5-6.
39. OPS-CDC. (2006). Protocolo genérico para vigilancia de la Influenza.
40. Chutinimitkul S, Payungporn S, Chieochansin T, Suwannakarn K, Theamboonlers A, Poovorawan Y. (2006). The spread of avian influenza H5N1 virus; a pandemic threat to mankind. *J Med Assoc Thai. Sep*; 89 Suppl 3:S218-33. Review
41. Mumford E, Bishop J, Hendrickx S, Embarek PB, Perdue M (2007). Avian influenza H5N1: risks at the human-animal interface. *Food Nutr Bull. Jun*;28(2 Suppl):S357-63.
42. Babakir-Mina M, Balestra E, Perno CF, Aquaro S. (2007) Influenza virus (H5N1): a pandemic risk? *New Microbiol. Apr*;30(2):65-78. Review.
43. Gruber C, Keil T, Kulig M, Roll S, Wahn U, Whan V (2007) History of respiratory infection in the first 12 yr among children from a birth cohort. *Pediatr Allergy Immunol* . Dec 21
44. Floret D. (2007): Influenza in children. *Rev Prat. Nov 15*: 57(17) 1895-9
45. Brownstein JS, Mandl KD (2008): Pediatric population size is associated local timing and rate of influenza and other acute respiratory infections among adults. *Ann Emerg Med* mar 26.
46. Mokhtari-Azad T, Rezaie-Khollari F, Nadji AR, Salimi V, Noroozbabaie Z, Naseri M, Mirzaie AR, Saadatmand Z, Gouya MM, Esteghamati AR, Hamkar R (2007). Comparison of multiplex nested RT-PCR with virus isolation for detection of influenza viruses A and B. *Iranian J Publ Health, Vol. 36, # 3*,pp. 1-7.
47. Carraro E, Neto DF, Benfica D, SittaPerosa AH, Granato CF, Bellei NC. (2007). Applications of a duplex reverse transcription polymerase chain reaction and direct immunofluorescence assay in comparison with virus isolation for detection of influenza A and B. *Diagn Microbiol Infect Dis. Jan, 57 (1)*: 53-7.

48. Takao S, Hara M, Kakuta O, Shimazu Y, Kuwayama M, Fukuda S, Miyazaki K. (2005) Eleven cases of co-infection with influenza type A and type B suspected by use of a rapid diagnostic kit and confirmed by RT-PCR and virus isolation. *Kansenshogaku Zasshi* Nov, 79 (11): 877-86
49. Ros Aranal I, Navarra Vicente B, Lavilla Fernandez MJ, De Juan Martin F, Bouthelier Moreno M, Omeñac Teres M, Ciria Calavia L. (2008) Clinical characteristic and management of children hospitalized for influenza in four epidemic season (2002 – 2006). *An Pediatr (Barc)* Jan, 68 (1): 24-9
50. Nicholson KG (1992) Clinical features of influenza. *Semin Respir Infect.* Mar. 7(1): 26-37.
51. Harper S, Klimov A, Uyeki T and Fukuda K. (2002). *Influenza. Clin Lab Med.* 22: 863-82
52. Heyman D. (2004) *Control of communicable disease manual 18a ed American Public Health association.* Washington DC.
53. Friedman MJ, Attia MW. (2004). Clinical predictors of influenza in children. *Arch Pediatr Adolesc Med* Apr, 158 (4): 291-4
54. Monto AS, Gravenstein S, Elliott M, Colopy M, Schweinle J. (2000) Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Arch Intern. Med.* Nov 27, 160 (21): 3243-7
55. Benito-Fernandez J, Vazquez-Ronco MA, Morteruel-Aizkuren E, Mintegui-Raso S, Sanchez-Etxaniz J, Fernandez-Landaluce A. (2006) Impacto of rapid viral testing for influenza A and B viruses management of febrile infant without signs of focal infection. *Pediatr Infect Dis J,* Dec, 25 (12): 1153-7

ANEXOS

ANEXO 1: Carta de consentimiento



CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACION



Investigador Principal:

Eva Harris, PhD; División de Enfermedades Infecciosas, Escuela de Salud Pública

Coordinadores del Estudio:

Eva Harris, PhD; División de Enfermedades Infecciosas, Escuela de Salud Pública, Universidad de California, Berkeley

Dr. Angel Balmaseda, Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, Ministerio de Salud, Managua, Nicaragua

Dr. Alcides González, Centro Nacional de Diagnostico y Referencia, Ministerio de Salud, Managua, Nicaragua

Dr. Juan José Amador, Dirección de Salud Ambiental y Epidemiología, Ministerio de Salud, Managua, Nicaragua

Dr. Guillermina Kuan, Centro de Salud Sócrates Flores Vivas, Ministerio de Salud, Managua, Nicaragua

Aubree Gordon, MPH, Escuela de Salud Pública, Universidad de California, Berkeley

Nicole Fitzpatrick, MPH, Instituto de Ciencias Sostenibles, Managua, Nicaragua

Título:

Estudio de Cohorte Pediátrico de Enfermedad Respiratoria en Nicaragua.

Ud. ha consentido para que su niño participe en nuestro estudio de cohorte para investigar dengue. Como parte de este estudio, estaremos recolectando información relacionada a las visitas médicas de tu niño. Cómo se puede imaginar, su niño se puede enfermar con otras enfermedades distintas de dengue durante el curso del estudio. Nos gustaría estudiar estas otras enfermedades. Desde que nosotros estamos dando seguimiento al estado de salud de tu niño, nos es mucho más fácil investigar otras enfermedades en niños de la cohorte; por lo tanto, solamente niños en la cohorte están siendo invitados para participar en este estudio. Como usted sabe, hay muchas enfermedades que afectan la salud de los niños en Nicaragua. El conocer más a cerca de la carga de estas enfermedades y sus causas nos ayudará a prevenirlas en Nicaragua. Nos gustaría usar información que está siendo o ha sido recolectada en la cohorte de dengue, así como muestras hemáticas que han sido colectadas para saber más acerca de las enfermedades que afectan la salud de tu niño.

Nos gustaría también tener su permiso para recolectar muestras de la nariz y la boca de su niño, para conocer cuantos episodios de gripes y resfriados ha tenido tu niño durante el curso del estudio de cohorte, y nos gustaría investigar que causa estas enfermedades. A diferencia del dengue, uno solamente puede realizar pruebas para enfermedades respiratorias con secreción bucal o moco nasal, por lo tanto con el objetivo de realizarles pruebas tomaremos muestra de saliva o moco nasal cuando su niño se enferme, usando un hisopo para boca y nariz. Las muestras serán colectadas en el Centro de Salud y procesadas en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia.

Participar en este estudio no involucrará toma de muestras hemáticas adicionales. La única diferencia de participar en el estudio de cohorte de dengue es que colectaremos una muestra respiratoria; todos los otros procedimientos son exactamente los mismos. Nosotros usaremos los resultados de la prueba de la muestra respiratoria y la información que ya hemos recolectado en el estudio de cohorte para investigar las gripes y resfriados en tu niño. Los riesgos asociados con tomar esta muestra son mínimos e incluyen sensación no confortable o sensación de cosquilleo y raramente sangrado de nariz. Esta muestra es tomada rutinariamente cuando el centro de salud puede ofrecer pruebas para enfermedades respiratorias.

Si Ud. elige participar, la muestra de tu niño será probada para encontrar virus que causan la gripe y resfriado, lo cual nos ayudará a diagnosticar sus enfermedades. Adicionalmente, la información que obtengamos nos ayudará a comprender mejor las gripes y resfriados y como afectan a los niños en Nicaragua. Esta información podría conducir a más medidas preventivas como programas educacionales y disponibilidad de vacunas adicionales para los niños nicaragüenses.

Así mismo como en el estudio de dengue, toda la información y los resultados asociados con el estudio se mantendrán de forma confidencial. Solamente el personal medico podrá tener acceso al nombre de su niño, en algunas otras ocasiones su niño y/o sus muestras serán identificadas usando un código.

No se le pagará por participar en este estudio. La participación en este estudio es voluntaria y Ud. puede decidir retirar a su niño del estudio cuando Ud. lo desee. Sí Ud. decide terminar su participación, Ud. necesita informar a la enfermera en el C/S Sócrates Flores u otro personal del estudio.

El equipo del estudio puede decidir retirar la participación de su niño del estudio en cualquier momento, inclusive sí Ud. quiere que continúe participando en el estudio. Esto podría suceder sí:

- Su niño es retirado del estudio de cohorte
- El estudio de investigación es terminado por cualquier razón.

Sí Ud. tiene preguntas, comentarios o preocupaciones relacionadas a este estudio, por favor contactar a Dra. Guillermina Kuan en el Centro de Salud Sócrates Flores, teléfono 266-0841 (correo electrónico drakuan@yahoo.com.mx) o al Dr. Angel Balmaseda en el CNDR, teléfono 289-7723 (correo electrónico virologia@minsa.gob.ni).

En el evento improbable que su niño sufra daño como resultado de su participación en este estudio, tendrá disponible cuidado médico. Dependiendo en algunos factores, los costos de estos cuidados pueden ser cubiertos por el proyecto. Sí Ud. tiene preguntas relacionadas a esta aseveración, o sí tiene alguna pregunta sobre sus derechos como sujeto de investigación, favor contactar al Dr. Alberto Montoya del Ministerio de Salud al 289-7723 (parasitologia@minsa.gob.ni) o al Comité de Protección de Sujetos Humanos de la Universidad de California, Berkeley, 2150 Shattuck Avenue Suite 313, Berkeley, CA 94704-5940, número telefónico (510) 642-7461, correo electrónico: subjects@berkeley.edu.

Consentimiento del Sujeto:

Todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha informado que la participación de mi niño en este estudio es voluntaria. El/ella puede retirarse del estudio en cualquier momento.

Doy permiso que las muestras respiratorias sean usadas en este estudio. También permito que los investigadores usen la información recogida en los expedientes clínicos de mi niño y las muestras hemáticas colectadas a través del Estudio de Cohorte Pediátrica de Dengue en Nicaragua para estudiar otras enfermedades además de dengue.

Nombre del Sujeto

Código del Estudio

Nombre del Padre/Tutor

Firma del Padre/Tutor

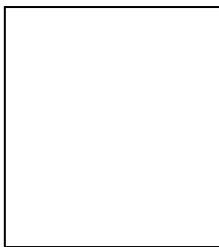
Fecha

En el caso que el padre/responsable legal es analfabeto:

Firma del Testigo

Fecha

Huella Digital del Padre/Tutor



Nombre de la persona que explicó este estudio

Fecha

ANEXO 2: Toma de la muestra para hisopados nasofaríngeos.

Se utilizan hisopos de teflón dacrón (comerciales) estériles, de esta manera el raspado de las células epiteliales de las mucosas es de mejor calidad, obteniéndose un mayor número de células. Una vez raspadas las mucosas nasales y faríngeas, los hisopos se sumergen inmediatamente en dos a tres ml de medio de transporte viral en tubos plásticos de tapa de rosca cerrados herméticamente y rotulados. (35).

Preparación del medio de transporte para virus respiratorios.

NaCl (Sodium Chloride) Fisher Scientific S271-3 al 0.9%.

BSA (Albumin from bovine serum minimum 98%) SIGMA A 7906 al 1%.

Antibiótico y antimicótico solución estabilizada 100x SIGMA al 1 %.(35).

ANEXO 3: Ficha de notificación para casos sospechosos de Influenza y otros virus respiratorios.



**Ministerio de Salud
C/S Sócrates Flores Vivas
SILAIS MANAGUA**



FICHA DE NOTIFICACIÓN SISTEMA DE VIGILANCIA CENTINELA INFLUENZA Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS

Caso sospechoso:

- Si No Un participante del cohorte con presencia de fiebre mayor de 37.8 C, mas uno de los siguientes: tos y/o rinorrea y/o dolor de garganta menos de 5 días de evolución.
- Si No Un participante del cohorte con antecedente de fiebre >37, tos y/o rinorrea y/o dolor de garganta de menos de 5 días de evolución

Identificación:

Nombre de paciente: _____
 Código del Cohorte: _____
 Edad: _____ Años
 Sexo: Masculino Femenino
 Dirección: _____
 Barrio: _____
 Departamento: _____

Fecha de inicio de síntomas: ___/___/___
 Fecha de toma de muestra: ___/___/___
 Isopado: Si ___ No ___ SNG: Si ___ No ___
 Hora de toma de muestra: _____ AM o PM

Sintomatología:

Temperatura mas alta: _____ °C Temperatura al momento del examen: _____ °C

SI	NO	D		SI	NO	D	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Fiebre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cefalea
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Rinorrea	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dolor al tragar
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dolor de garganta	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Mialgia
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Conjuntivitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dificultad respiratoria
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dolor de oído	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Malestar general
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Vomito	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tos

Diagnóstico Clínico: _____
 Médico: _____
 Código de Médico: _____

ANEXO 4. Procedimientos en la extracción del ácido nucleico de la muestra a partir de hisopados nasofaríngeos:

1. En un vial de 1.5 ml que contiene carrier ARN añadir 560 ul de buffer de lisis ya preparado.
2. Añadir 140 ul de suero, plasma, orina, sobrenadante de cultivo, y material biológico, etc y mezclar por vortex durante 15 segundos.
3. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos(15-25 grados)
4. Dar un golpe de centrifuga.
5. Añadir 560 ul de etanol al 99.9% y mezclar por vortex durante 15 segundos.
6. Aplicar 630 ul de la solución de la etapa cinco a la columna, cerrar la tapa y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.
7. Después pasar la columna a un tubo colector de 2ml limpio y descartar el tubo que contiene el filtrado.
8. Repetir paso 6.
9. Abrir con cuidado la columna y añadir 500 ul de buffer AW-1, cerrar y centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm. Después pase la columna a un tubo colector limpio y descarte el tubo que contiene el filtrado.
10. Abrir la columna y añadir 500 ul de buffer AW-2 cerrar y centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos, si aun quedan restos de buffer AW-2 volver a centrifugar para eliminarlo.
11. Pasar la columna a un tubo limpio de 1.5 ml, abrirla y añadir 60 ul de buffer de elusión (AVE) e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
12. Centrifugar 1 minuto a 8000 rpm. Descarte la columna y guardar el eluido que contiene el ARN. (manual kit de QIAamp Viral ARN Mini Kit).

RT- PCR

Las concentraciones de trabajo de los primers del forward y la reverso, son las siguientes:

- Influenza A y B se trabaja a 10 pmol/ul.
- Parainfluenza 1-3 y SRV se trabaja a 20 pmol/ul.

Reactivos:	concentración	volumen
• DEPC H2O.....		11.50 ul
• Promega 5x "green "buffer.....		5 ul
• DNTP mix.....10 mM		0.50 ul
• Forward/ reverse primer.....		2.50 ul
• MgSo4.....25 mM		2.0 ul
• AMV RT.....5U/ul		0.50 ul
• Tfl DNA polymerase..... 5U/ul		0.50 ul
• Muestra (ARN)		5 ul

TERMOCICLAGE:

CICLO	TEMPERATURA	TIEMPO (MINUTOS)	ACCION
1	48C	45	REVERSOTRANSCRIPCION
1	94C	2	DESNATURALIZACION
5	94C	30 SEGUNDOS	DESNATURALIZACION
5	54C	1	ANNELING
5	72C	2	EXTENCION
30	94C	30 SEGUNDOS	DESNATURALIZACION
	54C	30 SEGUNDOS	ANNELING
	72C	45 SEGUNDOS	EXTENSION
1	72C	7	EXTENSION
	4C	FOREVER	MANTENIMIENTO

POST- PCR:

1- PREPARACION DE GEL DE AGAROSA.

MEDIDA DEL GEL	DEL	Buffer de TBE 1X	Agarosa	Tiempo de fusión
Largo		100 ml	2.0 g	1 min y 30 seg.
Mediano		85 ml	1.7 g	1 min y 30 seg.
Pequeño		50 ml	1.0g	1 min y 50 seg.

2- Agregar bromuro de etidio (EtBr).

MEDIDA DEL GEL	CANTIDAD DE EtBr
Largo	6 ul
Mediano	5.1 ul
Pequeño	3 ul

3- Agregar los productos amplificados o amplicones.

MEDIDA DEL GEL	VOLTAGE	TIEMPO DE CORRIDA
Largo	125 V	1 hora y 15 minutos
Mediano	125 V	1 hora y 15 minutos
Pequeño	125 V	53 minutos

INTERPRETACION:

VIRUS	Talla del amplicón en pares de bases (bp)
INFLUENZA A	192
INFLUENZA B	241
RSV	380
HPIV 1	317
HPIV 2	203
HPIV 3	102

ANEXO 5: AISLAMIENTO E IDENTIFICACION VIRAL

- **Tratamiento de las muestras.**

- Agitar todas las muestras, con el agitador antes de empezar a prepararlas, hasta mezclar bien.
- Colocarlas dentro de un termo con hielo en el orden en que serán procesadas dentro de la campana.
- Añadir solución de antibiótico al 1%.
- Centrifugar a 3500 rpm por 40 minutos a 4° C.
- Colocar dentro del termo con hielo evitando remover el sedimento.

- **Siembra y cosecha de las células.**

1. Partir de un frasco de cultivo (25 cm cúbico o 75 cm cúbico) de una semana de sembrado.
2. Preparar el medio de cultivo.
3. Desprender las células con solución de Tripsina –EDTA (0.25% y 0.02%) y adicionar al medio preparado a razón de 250 000 cel/ml.
4. Incubar los tubos en plano inclinado a 37° C durante 48 o 72 horas. La placa se incuba a 37C. Al cabo de este tiempo debe estar cubierta la monocapa y los tubos listos para inocular.

- **Aislamiento viral.**

Este procedimiento debe ser realizado en un gabinete de seguridad clase II.

- **Inoculación de los tubos de cultivo de tejidos:**

2. Utilizar monocapas recientes y confluentes en los tubos que se utilizaran para la inoculación.
3. Chequear al microscopio con una magnificación de 40x.
4. Eliminar el medio de cultivo de los tubos y lavar la monocapa con 1ml del medio D- MEM sin suero fetal bovino.
5. Inoculación en los tubos de cultivo:
6. Inocular 200 ul de la muestra por cada 2cm de monocapa celular, usando pipetas estériles.
7. Añadir 200 ul de medio completo a los tubos que serán los controles.
8. Centrifugar a 2000 rpm por 45 minutos a temperatura ambiente. De no poderse realizar la adsorción por centrifugación, dejar a temperatura ambiente 1 hora.
9. Añadir 3 ml de medio de mantenimiento D-MEM, sin suero y con tripsina.

10. Incubar a 37C.
11. Observar al microscopio diariamente para verificar alguna manifestación de efecto citopático (E.P).
12. Las muestras con ECP son congeladas y descongeladas y tituladas por Hemaglutinación (HA) o identificadas por RT-PCR
13. Si no se produce efecto citopático a los 7 días, las células son congeladas, descongeladas e inoculadas en un nuevo tubo
14. Se realiza el mismo procedimiento durante 7 días adicionales, congelando, descongelando titulando por HA o identificando el virus por RT-PCR si hay ECP. De no producirse el ECP se repite nuevamente el paso No 12.
15. Los tubos sin ECP, finalmente se les realiza HA o RT-PCR

- **Titulación de cepas aisladas por HA**

Para la realización de HA se utilizaron eritrocitos de Pavo (ver extracción de eritrocitos en Manual del IPK)

- Preparar solución al 0.5% de eritrocitos en solución de PBS pH 7.2
 - Adicionar 50 ul de PBS a los pozos desde el numero 2 al 12
 - Adicionar 100 ul de cada cepa aislada al primer pozo
 - Realizar diluciones al doble de cada cepa, transfiriendo 50 ul desde el primer al ultimo pozo
 - Añadir 50 ul de la solución al 0.5% de eritrocitos.
 - Incubar a temperatura ambiente por 30 -60 minutos
 - Interpretación: El titulo de de una cepa es la ultima dilución donde exista hemaglutinación

- Identificación de cepas aisladas por RT-PCR : La identificación se realizó por un RT-PCR estandarizado en el laboratorio.(36)
 - Extracción del Acido Nucleico : Se realiza de la misma forma que se describió anteriormente (anexo 4), utilizando el Kit comercial QUIAGEN
 - RT-PCR (36):

Primers utilizados en el primer PCR:

AHI A: CAGATGCAGACACAATATGT.

AHI FII: AAACCGGCAATGGCTCCAAA.

AH3 A: CAGATTGAAGTGACTAATGC.

AH3 DII: GTTTCTCTGGTACATTCCGC.

Primers utilizados en el nested PCR:

AHI B: ATAGGCTACCATGCGAACAA.

AHI EII: CTTAGTCCTGTAACCATCCT.

AH3 B: AGCAAAGCTTTCAGCAACTG.

AH3 CII: GCTTCCATTTGGAGTGATGC.

, Reactivos primer PCR:

Descripción	Concentración	ul/tubo	No de tubo	Vol. final
Buffer 10x		2.5		
Dntps	5mM	1		
MgCl ₂		3.6		
Taq polimerasa	5 U	0.3		
H ₂ O		6.475		
AMV-RT		0.2		
Betaine		3.175		
TMAC		0.75		
AHI A	5 pmol	0.5		
AHI FII	5 pmol	0.5		
AH3 A	5 pmol	0.5		
AH3 DII	5 pmol	0.5		

, Reactivos Nested PCR:

Descripción	Concentración	ul/tubo	No de tubo	Vol. final
Buffer 10x		2.5		
Dntps	5mM	1		
MgCl ₂		3.6		
Taq polimerasa	5 U	0.3		
H ₂ O		6.675		
Betaine		3.175		
TMAC		0.75		
AHI B	25 pmol	0.5		
AHI EII	25 pmol	0.5		
AH3 B	25 pmol	0.5		
AH3 CII	25 pmol	0.5		

TERMOCICLAGE DEL PRIMER PCR:

CICLO	TEMPERATURA	TIEMPO (MINUTOS)	ACCION
1	42C	60	REVERSOTRANSCRIPCION
1	94C	2	DESNATURALIZACION
35	94C	1	DESNATURALIZACION
	50C	1	HIBRIDACION
	72C	1	EXTENCION
	4C	Forever	

TERMOCICLAGE DEL NESTED- PCR:

CICLO	TEMPERATURA	TIEMPO (MINUTOS)	ACCION
35	94C	1	DESNATURALIZACION
	60C	1	HIBRIDACION
	72C	1	EXTENCION
	4C	Forever	

- Post PCR: La detección de los productos amplificados se realizó de la misma forma anteriormente descrita.

INTERPRETACION

VIRUS	Talla del amplicón en pares de bases (bp)
INFLUENZA A(H1N1)	1015
INFLUENZA A(H3N2)	883
NESTED PCR	
INFLUENZA A(H1N1)	944
INFLUENZA A(H3N2)	591

- **Identificación de cepas aisladas por Inhibición de la Hemaglutinación (IHA)**

Se utilizó del Kit de reactivos brindado por la OMS.

Este kit es preparado con las cepas vacunales seleccionados para cada temporada y contiene reactivos para la identificación de los virus de influenza tipo A, subtipos A (H1N1) y A (H3N2) e influenza tipo B, así como reactivos para el diagnóstico serológico.

Los antisueros de referencia utilizados en la identificación de los aislamientos son preparados en carneros, mediante un esquema de inyecciones múltiples con HA purificados de las cepas vacunales o en pollos por inoculación intravenosa con virus multiplicados en huevos embrionados. Los controles de antígenos consisten el líquido alantoideo inactivado con beta-propiolactona.

- **Tratamiento con EDR (enzima destructora de receptores) de los antisueros:** Este se realiza con el objetivo de eliminar las hemaglutininas inespecíficas presentes en el suero
 - Añadir 3 volúmenes de EDR a un volumen de suero (25 ul de suero más 75 ul de EDR), mezclar bien.
 - Incubar en baño de agua o incubadora de 37 grados centígrados, durante toda la noche (aproximadamente 16 a 18 horas).
 - Incubar en baño de agua a 56 C durante 30 minutos para inactivar el resto de EDR.
 - Dejar enfriar a temperatura ambiente.
 - Añadir 6 volúmenes (150 ul) de solución salina normal (0.85% NaCl).
 - Los sueros tratados se encuentran en una dilución final de 1:10
 - De no ser probados inmediatamente, congelarlos hasta su uso a -20 C.

- Identificación de aislamientos a partir de muestras clínicas por IHA.
 - Rotular las placas de microtitulación (poliestireno de 96 pozos fondo en U) según la cantidad de aislamientos a identificar.
 - Añadir 25 ul de PBS a los pozos desde el segundo hasta el último pozo cada columna numerada.
 - Añadir 50 ul de cada anti suero de referencia tratado al primer pozo de la columna seleccionada. Realizar diluciones al doble de cada pozo.
 - Añadir 25 ul del antígeno a todos los pozos.
 - Agite suavemente o mezcle de forma manual.
 - Cubrir la placa evitando la evaporación.

- Colocar las placas a temperatura ambiente (22 a 25°C) por un tiempo aproximado entre 30 y 45 minutos. Fijarse en el botón del control de eritrocitos que estén sedimentando totalmente.
- Anotar los resultados obtenidos.
- Si ocurre una reacción antígeno – anticuerpo (se inhibe la hemaglutinación de los eritrocitos)
- El título de IHA es el recíproco de la última dilución de antisuero que inhiba completamente la hemaglutinación.

Prueba de inhibición de la hemaglutinación a sueros tratados de muestras clínicas: Se realiza de la misma forma que la identificación de las cepas aisladas utilizando sueros de pacientes en lugar de los antisueros de referencias