

ESTUDIO SEROEPIDEMIOLÓGICO EN LA ESPECIE HUMANA Y EN CERDOS DE LA NUEVA CEPA DE INFLUENZA DE TIPO PORCINO

M. P. Pérez Breña, C. López Galíndez, A. Liácer,
E. Nájera, E. Valle y R. Nájera¹

Un porcentaje alto (66.5%) de la población humana de más de 50 años, posee anticuerpos frente a Hsw1. Sin embargo, en el presente estudio se detectaron anticuerpos a títulos elevados en algunos sueros de jóvenes, aun cuando no se encontró ninguna evidencia de circulación de virus de influenza porcina entre los cerdos que se estudiaron procedentes de varias regiones de España.

Introducción

El Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta posee datos que indican infecciones esporádicas por virus de influenza porcina, en personas que tuvieron contactos con cerdos. En enero y febrero de 1976 se produjo el brote de Fort Dix (1) con el aislamiento de un virus de influenza tipo A, antigénicamente relacionado con el virus "clásico" de la influenza porcina. Esta fue la primera observación de transmisión interhumana de un virus de influenza animal en la naturaleza. En 1918 se produjo una terrible pandemia de influenza que causó la muerte de cerca de medio millón de personas en Estados Unidos y estimado en un número de 20 millones en el mundo (2). Numerosos investigadores relacionaron esta pandemia con virus porcino. Este hecho, unido a la teoría de Masurel y Marine (3), en el sentido de que el virus porcino podría volver a circular en un período de unos 70 años, (lo que situaría la reaparición hacia 1985), pu-

sieron un tinte dramático en los sucesos mencionados. Sin embargo, del comportamiento de la cepa A/New Jersey/8/76 en el grupo de personas que vivían en Fort Dix, parece deducirse que su capacidad de difusión no es muy grande (4). En efecto, de entre las 12,000 personas que formaban la base militar (en casi su totalidad jóvenes carentes o con niveles bajos de anticuerpos frente al virus tipo porcino), solo se confirmaron 12 casos de infección. Posteriormente, a través de un intenso estudio seroepidemiológico se llegó a la conclusión de que se habían producido unas 500 infecciones en total. En cambio, la cepa A/Victoria/3/75, que circulaba simultáneamente, continuó produciendo casos después de terminar el brote debido a la A/New Jersey/8/76, que había durado únicamente cuatro o cinco semanas.

En el memorandum redactado por la OMS (4) en abril de 1976 con ocasión de una consulta celebrada en Ginebra, Suiza, para revisar toda la información recogida hasta ese momento sobre la cepa A/New Jersey/8/76, se informa de estudios en los que se detectaron anticuerpos frente a esta cepa en un 5 a 8% de personas menores de 30 años. Se sugirió la explicación de que

¹ Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Majadahonda, Madrid, España.

fueran el resultado de respuestas heterotípicas.

Dada la posible importancia del problema, hemos tratado de conocer la situación epidemiológica en España, así como estudiar si las cepas porcinas han circulado entre los cerdos del país durante los últimos años.

Material y métodos

Recolección de sueros

Los sueros humanos se recibieron en número aproximado de 100 semanales desde abril de 1976 y alcanzaron hasta mayo de 1977, un total de 2,600 sueros. Provinieron de personas sanas entre los 18 y 65 años de edad, donantes de sangre del Instituto Nacional de Hematología de Madrid.

Los sueros de cerdo correspondieron fundamentalmente a animales hembras de más de cuatro años de edad, procedentes de 53 piaras de varias provincias españolas (Madrid, Salamanca, Guadalajara, Toledo, Ciudad Real, Badajoz, Córdoba y Sevilla).

Cepas utilizadas

Como antígenos para la prueba de inhibición de hemaglutinación (IH) se utilizaron: A/Mayo Clinic/103/74 (HswIN1), aislada de un paciente que murió en Minnesota en el otoño de 1974 a raíz de una neumonía complicada por insuficiencia respiratoria debida a la enfermedad de Hodgkin, A/Victoria/3/75 (H3N2); A/Hong Kong/1/68 (H3N2); A/England/12/64 (H2N2); A/England/1/51 (H1N1); A/PR/8/34 (H0N1) y B/Hong Kong/8/73 antigénicamente igual a la B/Hong Kong/5/72.

Para realizar la prueba de inhibición de la neuraminidasa (IN), se usaron como fuente de N1 y N2 las cepas A/PR/8/34

(H0N1), y X-31 (H3N2), recombinante de A/Hong Kong/68 y A/PR/8, respectivamente.²

Los antígenos en ambas pruebas consistieron en líquido alantoideo procedente de huevos de gallina embrionados, infectados en el décimo día de incubación con el virus correspondiente, y purificado por centrifugación diferencial.

Pruebas de inhibición de la hemaglutinación (IH)

Se realizaron por el micrométodo de Takatsy según modificación de la OMS (5) con microtitulador Cooke (Engineering Co., EUA), y se efectuó la separación de inhibidores inespecíficos con RDE.

Todos los porcentajes de positividad se calcularon sobre el número de sueros que dieron títulos mayores de 20 en IH.

Prueba de inhibición de la neuraminidasa (IN)

Se realizó según la técnica original de Warren (6), tal como la describen Aymard Henry et al. (7).

Respuestas heterotípicas

Para comprobar si los anticuerpos frente a A/New Jersey/8/76 en personas jóvenes eran el resultado de respuestas heterotípicas, se estudió el nivel de anticuerpos frente a todas las hemaglutininas humanas del tipo A, y frente a las de cepas B que circulan en la actualidad, en tres sueros de jóvenes, y en los de las personas mayores que presentaron títulos superiores a 80 frente a Hsw1.

² Todas las cepas fueron amablemente proporcionadas por la Dra. M. Pereira y el Dr. G. C. Schild de Londres.

CUADRO 1—Distribución por grupos de edad de los niveles de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IH) frente a la cepa A/Mayo Clinic/103/74 (Hsw1) en sueros humanos.^a

Grupos de edad	No. de sueros	Títulos IH frente a Hsw1						%
		<20	20	40	80	160	≥320	
< 30	1,349	1,336	9	2	1	1	—	0.96
30-34	220	219	—	1	—	—	—	0.45
35-39	214	205	7	1	1	—	—	4.2
40-44	206	196	6	2	2	—	—	4.85
45-49	185	157	16	8	2	2	—	15.13
50-54	179	85	39	35	9	7	4	52.51
55-59	156	43	30	28	26	15	14	72.43
60-65	91	15	15	25	18	7	11	83.51
Total	2,600	2,256	122	102	59	32	29	

^a La experiencia adquirida recientemente con el antígeno A/New Jersey/8/76 ha demostrado que este tiene más avidez por los anticuerpos que el A/Mayo Clinic/103/74.

Resultados

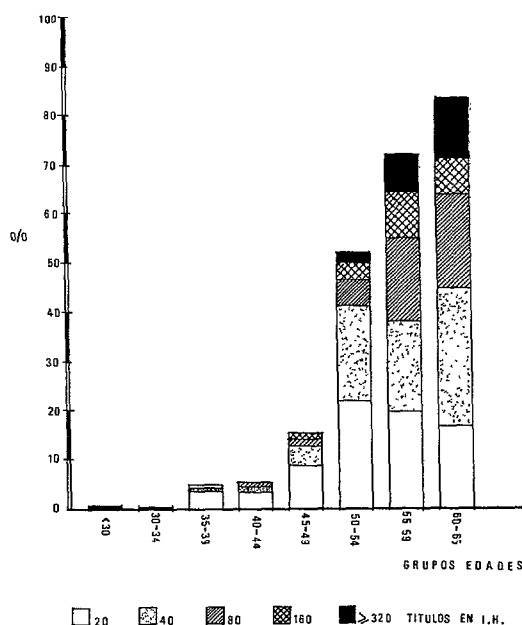
En el cuadro 1 aparecen los resultados de la distribución de los niveles de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación frente a la cepa A/Mayo Clinic/103/74 (Hsw1) en sueros humanos, según grupos de edad. En la figura 1 dichos resultados aparecen representados gráficamente.

Se observó que los porcentajes de seropositividad fueron más elevados en las edades por encima de los 50 años, con un predominio de los títulos altos. El grupo de edad inmediatamente anterior presentó un porcentaje sensiblemente menor, pero bastante superior al de los grupos más jóvenes. Por debajo de los 40 años de edad los porcentajes fueron bajos y los títulos también, excepto en el caso de tres sueros que procedían de personas jóvenes (21, 23 y 36 años), que presentaron títulos de 80, 160 y 80 respectivamente y en los que no existe evidencia de contacto previo con cerdos.³

Los resultados obtenidos con los sueros

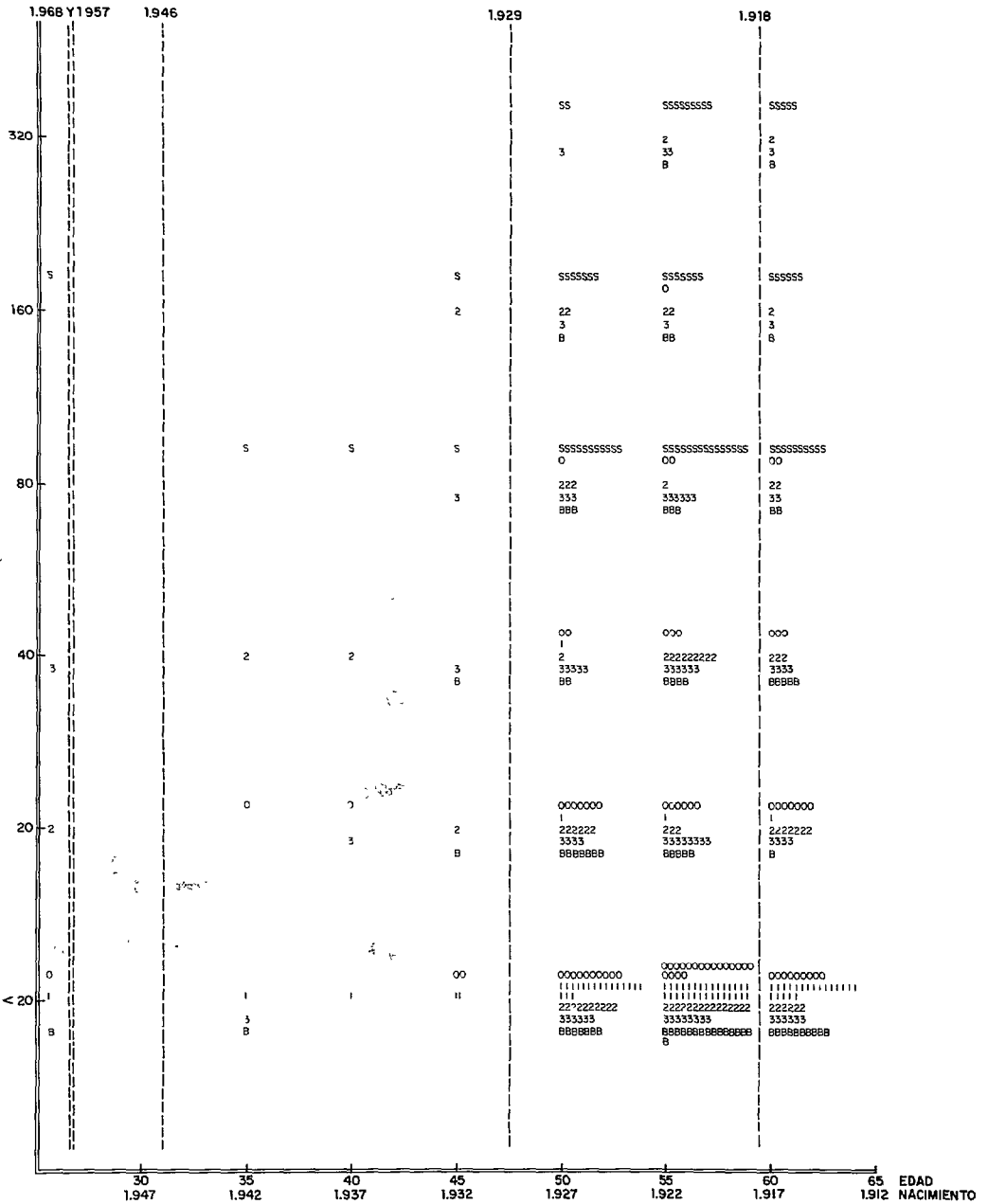
de cerdos se presentan en el cuadro 2. Entre los cerdos más viejos se encontraron anticuerpos frente a H3 en proporciones que están en completo acuerdo con los resultados que obtuvimos en 1973 (8), sobre sueros de cerdos de procedencia similar a

FIGURA 1—Porcentaje de sueros positivos por niveles de anticuerpos y grupos de edad.



³ Mientras se redactaba este trabajo se volvieron a detectar anticuerpos frente a Hsw1 a título alto en el suero de una persona de 20 años de edad.

FIGURA 2—Anticuerpos IH frente a distintas hemaglutininas en el suero de personas de edades diferentes.^a



^a H_{sw} ⊕; H₀ ⊙; H₁ ⊕; H₂ ⊕; H₃ ⊕; H_b ⊕

CUADRO 2—Distribución por grupos de edad de los niveles de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IH) frente a las cepas A/Mayo Clinic/103/74 (Hsw1), A/Hong Kong/1/68 (H3) y A/Victoria/3/75 (H3) en sueros de cerdo.

Grupos de edad	No. de sueros	A/Mayo Clinic/74		A/Hong Kong/68		A/Victoria/75	
		Positivos	%	Positivos	%	Positivos	%
Sin edad	13	0	-	0	-	0	-
1-2 años	111	0	-	0	-	0	-
≥ 4 años	189	0	-	22	11.6	26	13.7

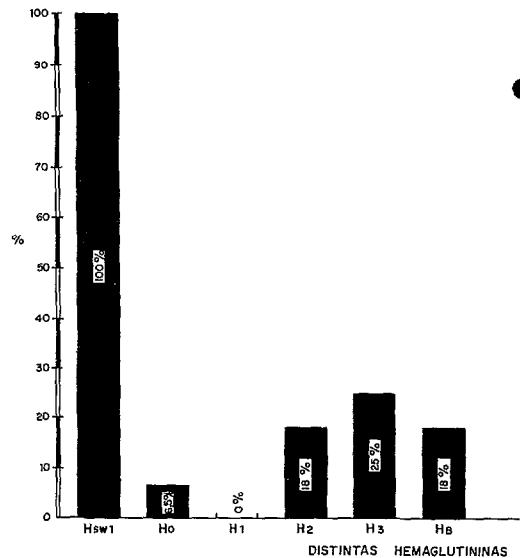
la de los que se estudiaron en el presente trabajo.

En el cuadro 3 se muestra el nivel de anticuerpos frente a todas las hemaglutininas humanas del tipo A y frente al tipo B de dos de los tres sueros de jóvenes mencionados, (ya que en el tercer caso no disponíamos de cantidad suficiente para hacer estas pruebas). Los resultados del estudio de 81 sueros correspondientes a 73 personas mayores se presentan en la figura 2. Se encontró que 77 de estos sueros presentaron niveles de anticuerpos frente a cualquiera de las hemaglutininas humanas H0, H1, H2, H3 y hemaglutinina del tipo B, no significativamente superiores a los que se presentaron frente a Hsw1.

La figura 3, muestra los porcentajes de sueros que presentaron títulos ≥ 80 en HAI frente a distintas hemaglutininas. Tomando el número de sueros seleccionados por sus títulos ≥ 80 frente a Hsw1, como el 100%, los porcentajes frente a las demás hemaglutininas fueron sensiblemente menores. Fue notable observar la ausencia total de anticuerpos a título alto frente a H1.

Para poder aportar otros datos a la discusión se realizó un estudio de anticuerpos inhibidores de la neuraminidasa, esco-

FIGURA 3—Porcentajes de sueros con título ≥ 80 frente a las distintas HA, en los sueros que presentaban títulos ≥ 80 frente a Hsw1 (tomado como 100%).



CUADRO 3—Resultados de las pruebas efectuadas sobre dos sueros de jóvenes que poseen anticuerpos frente a Hsw1 con título alto.

Suero No.	Edad	Títulos IH						Títulos IN	
		Hsw1	H0	H1	H2	H3	HB	N1	N2
27,609	23	160	(-)	(-)	20	40	(-)	10,000	20
28,504	36	80	20	20	40	(-)	(-)	(-)	30

CUADRO 4—Niveles y porcentajes de anticuerpos frente a N1 y N2 en sueros con título ≥ 160 frente a Hsw1.

Títulos IN	N1	%	N2	%
< 40	31	86	17	63
40-160	4	11	7	26
≥ 160	1	3	3	11
Total	36		27	

giendo para ello los 36 sueros con títulos ≥ 160 en IH frente a Hsw1, y aprovechando las diferencias entre las distintas cepas, (las cepas con Hsw1, H0 y H1, poseen N1, mientras que las cepas con H2 y H3 poseen N2). Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 4.

Discusión

El hecho de que los porcentajes de seropositividad fueran más elevados en el grupo de edad de 40 a 50 años, con predominio de títulos altos en las edades mayores (véase el cuadro 1), podría explicarse considerando que se trata de anticuerpos residuales inducidos por una infección primaria en la infancia y reactivados en posteriores infecciones por otras cepas gripales, ya que las personas mayores de 50 años habían nacido antes de 1927, es decir, dentro de la etapa de prevalencia del virus tipo porcino de 1918. Los porcentajes de los grupos de 40 a 44 años y de 45 a 49 años pueden representar infecciones residuales en los años de cambio de las cepas con hemaglutinina Hsw1 por las de H0. Estas infecciones residuales es probable que fueran disminuyendo en número a medida que avanzaban los años, en la década de 1930 a 1940, como lo demuestra la diferencia de porcentajes entre los dos grupos.

Aunque la mayoría de los anticuerpos que se detectaron en estos grupos de edad

hubieran tenido el origen que acabamos de señalar, no puede descartarse que en algunos casos provinieran de infecciones transmitidas directamente por cerdos enfermos a personas que estuvieron en estrecho contacto con ellos.

Por otra parte teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de los sueros de cerdo (véase el cuadro 2) en que se aprecia la inexistencia de anticuerpos frente a Hsw1, no parece probable que las personas jóvenes con títulos altos en la prueba de IH hayan podido infectarse a través de cerdos durante los últimos años. El alto nivel de anticuerpos frente a Hsw1 no puede justificarse como respuesta heterotípica como es posible comprobar en el cuadro 3.

Puesto que solo en los cerdos mayores de cuatro años se detectaron anticuerpos antigripales H3, esto parece indicar que la gripe padecida por los cerdos españoles en los últimos años no ha sido producida por un virus porcino "clásico", sino por cepas humanas variantes de la cepa A/Hong Kong/1/68 (H3N2), como han estudiado numerosos autores en otros países, y como informan Stuart-Harris y Schild (9), y en la actualidad no existe evidencia de la circulación de virus gripales en la población porcina.

En uno de los 77 sueros de personas mayores que presentaron anticuerpos frente a Hsw1, se pudieron estudiar dos muestras de un mismo individuo con un intervalo de tres meses, en el que la primera fue positiva solo a Hsw1 a título medio, y la segunda presentó un aumento en el nivel de anticuerpos a Hsw1 y fue también positiva a H3, lo que indicaría una seroconversión por infección por un virus tipo H3 y serviría de ilustración a la teoría del "pecado original". En otros casos se ha podido estudiar también un fenómeno similar, si bien, no con seroconversión, sí con refuerzo en el nivel de anticuerpos.

Considerando que todas las personas cuyos sueros se seleccionaron para la

prueba de inhibición de la neuraminidasa (véase el cuadro 4), fueron infectadas por un virus tipo porcino, el porcentaje de negatividad a N1 sugeriría que los anticuerpos frente a este antígeno han bajado a lo largo del tiempo, como correspondería a infecciones antiguas (86%). Los altos títulos de anticuerpos frente a Hsw1 estarían justificados como resultado del refuerzo provocado por infecciones posteriores con otras cepas:

a) En el caso de cepas poseedoras de H2 y H3 se puede observar la correspondencia del porcentaje de sueros con títulos ≥ 80 en inhibición de hemaglutinación frente a estas hemaglutininas (figura 3), con el de suero con títulos ≥ 40 en inhibición de la neuraminidasa frente a N2 (cuadro 4).

b) En otro grupo de sueros se encontraron anticuerpos antihemaglutinantes a nivel medio (entre 20 y 80) frente a varias cepas, lo que permite suponer la existencia de infecciones sucesivas cuyo resultado fue aumentar los anticuerpos frente a Hsw1.

En un porcentaje de sueros mucho menor (12%) se detectaron anticuerpos frente a N1 a título medio y alto. En alguno de estos casos se acompañaron de títulos altos frente a varias hemaglutininas y frente a N2, que justifican también el pensar en una acción de refuerzo. Sin embargo, hay tres casos (personas de 55, 52 y el joven de 23 años del cuadro 3) que no tuvieron títulos altos frente a ninguna de las hemaglutininas no porcinas, para los cuales no encontramos explicación. En estos casos, se puede apuntar la posibilidad de circulación de virus tipo porcino en pequeños brotes aislados que pudieran haber pasado desapercibidos, entre 1954 (fecha de nacimiento del más joven) y 1970 (fecha de nacimiento de los cerdos más viejos de nuestro estudio).

Teniendo en cuenta el insuficiente número de sueros estudiados en N1, los datos obtenidos no pueden ser de gran alcance, pero sí parecen apoyar las hipótesis deducidas del estudio de las hemaglutininas.

Resumen

Se han estudiado los niveles de anticuerpos frente a hemaglutinina de tipo Hsw1 en sueros humanos y porcinos para establecer la situación epidemiológica de la población de Madrid, respecto a la influenza humana de tipo porcino.

En la encuesta que se realizó sobre 2,600 sueros de personas entre los 18 y 65 años, y 313 sueros de cerdo procedentes de 53 piaras de distintas regiones del país, se observó que la distribución de anticuerpos por grupos de edad en los sueros humanos presentó un porcentaje de positividad (sueros de título superior a 20 en IH), del 55.5% en personas mayores de 50 años, mientras que en el grupo de menos de 30 años no llegó al 1%.

Los individuos con títulos de anticuerpos ≥ 80 frente a Hsw1, en general tuvieron anticuerpos frente a otras hemaglutininas y neuraminidasas humanas, lo que permite suponer que el nivel de anticuerpos frente a las cepas porcinas se ha ido reforzando por sucesivas infecciones gripales.

Existen algunos casos humanos que escapan a este esquema, para los que no se puede aportar ninguna explicación salvo apuntar la posibilidad de una infección a través de cerdos, anterior a 1970 (la fecha más lejana que abarca este estudio en los cerdos), ya que durante estos últimos años no se ha encontrado ninguna evidencia de circulación del virus entre ellos. □

Agradecimientos

Los autores agradecen a las Dras. Pereira y Chakraverty, del Laboratorio de Referencia de Virus, Colindale, Londres; al Dr. Schild (National Institute for Biological Standardization and Control, Hampstead, Londres); a los Drs. Bres y Asaad, de la Sección de Virus de la OMS en Ginebra, y al Dr. Dowle del Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta, por su ayuda en la comprobación de títulos de anticuerpos y

suministro de cepas y reactivos necesarios para este trabajo.

También quieren expresar su agradeci-

miento al Sr. Cubero, auxiliar de investigación, y a la Srta. Cruz, técnico de laboratorio.

REFERENCIAS

- (1) Centro para el Control de Enfermedades. Servicio de Salud Pública de EUA, Atlanta, Georgia. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 25:35, 1976.
- (2) Hattwick et al. La influenza pandémica y el virus de la influenza porcina. *Bol Of Sanit Panam* 82(2):120-121, 1977.
- (3) Masurel, N. y W. M. Marine. Recycling of Asian and Hong Kong influenza virus hemagglutinins in man. *Am J Epid* 107:44-49, 1973.
- (4) Organización Mundial de la Salud. The new A/New Jersey/76 influenza strain. Memorandum. *Bull WHO* 53:1-5, 1976.
- (5) Organización Mundial de la Salud y Centro para el Control de Enfermedades. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. Serie de Inmunología No. 6, 1975.
- (6) Warren, L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem* 234:1971-1975, 1959.
- (7) Aymard-Henry, M., M. T. Coleman W. R. Dondle, W. G. Laver, G. C. Schild, y R. G. Webster. Influenza virus neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures. *Bull WHO* 48:199-202, 1973.
- (8) Vicente, M, M. V. Fernández, M. P. Pérez Breña, E. Valle y R. Nájera. Antibodies against human types A and B influenza viruses in the sera of animals in Spain. *Bull WHO* 48:378-380, 1973.
- (9) Stuart-Harris, Ch. H. y G. C. Schild. *Influenza. The virus and the disease*. Londres: Edward Arnaud, Frome y London, 1976, pág. 79.

Seroepidemiologic study in humans and swine of a new strain of swine influenza (Summary)

Antibody titers produced by Hsw1 hemagglutinin were studied in human and swine sera to establish the epidemiologic situation in Madrid, as regards human cases of swine influenza.

Serum samples from 2,600 people between 18 and 65 years of age, and from 313 swine in 53 herds from different parts of the country were tested for antibodies. It was found that antibody distribution in human sera, according to age groups, showed a positivity percentage (titers higher than 20 for HI) of 55.5% among persons over 50 years of age, while in the group below 30 years it did not reach 1%.

Individuals with Hsw1 antibody titers ≥ 80 usually had antibodies to other human hemagglutinins and neuraminidases as well, which permits us to assume that antibody titers for swine strains have been strengthened by successive influenza infections.

There are some human cases that do not follow this pattern and cannot be explained, except by a probable infections transmitted by swine prior to 1970 (the earliest date in which swine were examined for this study), since in the last few years no evidence of virus presence among swine has been found.

Estudo seroepidemiológico da espécie humana e em suínos da nova Cepa de influenza de tipo porcino (Resumo)

Estudaram-se os níveis de anticorpos perante a hemaglutina de tipo Hsw1 em soros

humanos e porcinos para poder estabelecer a situação epidemiológica da população de Ma-

dri no referente à influenza humana de tipo porcino.

No inquérito feito em 2.600 soros de pessoas entre 18 e 65 anos de idade e 313 soros de porcos procedentes de 53 piaras de diversas regiões do país observou-se que a distribuição de anticorpos por grupos de idade nos soros humanos mostrou uma percentagem de positividade (soros de título superior a 20 em IH), de 55,5% em pessoas de mais de 50 anos, enquanto que, no grupo de pessoas de idade inferior a 30 anos não atingiu 1%.

Os indivíduos com títulos de anticorpos ≥ 80 perante Hsw1, em geral, tiveram anticorpos

perante outras hemaglutininas e neuraminidasas humanas, o que nos permite supor que o nível de anticorpos perante as estirpes porcinas se tem ido fortalecendo mediante infecções gripais sucessivas.

Há alguns casos humanos que saem fora desse esquema, para os quais não se pode oferecer nenhuma explicação, exceto indicar a possibilidade da existência de uma infecção através dos porcos, anterior a 1970 (a data mais longínqua que abrange o este estudo sobre os porcinos), já que durante estes últimos anos não se encontrou nenhuma evidência de circulação do vírus entre esses animais.

Etude séroépidémiologique chez l'humain et chez le porc de la nouvelle souche d'influenza de type porcine (Résumé)

Des sérums humains et porcins ont été étudiés pour y mesurer le taux d'anticorps dirigés contre l'hémagglutinine type Hsw1 afin d'établir la situation épidémiologique de la population madrilienne face à l'influenza humain de type porcine.

L'enquête a été faite sur 2600 sérums de personnes âgées entre 18 et 65 ans, et 313 sérums de porcs en provenance de 53 élevages de différentes régions du pays. Dans le cas des sérums humains, les anticorps sont distribués en tranches d'âge: les résultats sont positifs (sérums dont le titre est supérieur à 20 en HI) chez 55,5% des individus de plus de 50 ans, alors que moins de 1% des sujets du groupe de moins de 30 ans avait des résultats positifs.

Dans l'ensemble, les individus dont le titre d'anticorps anti-Hsw1 ≥ 80 avaient aussi des anticorps dirigés contre d'autres hémagglutinines et neuraminidases humaines. Ceci suggère que le titre d'anticorps contre les souches porcines s'est trouvé renforcé à la suite d'infections gripales successives.

Pour les cas humaines qui ne cadrent pas dans ce schéma, nous ne trouvons d'autre explication que celle d'une possible infection propagée par les porcs avant 1970 (date la plus reculée de notre étude sur les porcs), étant donné qu'il n'a été trouvé au cours des dernières années aucune évidence de circulation de virus chez ces animaux.