Vol. X DICIEMBRE 1941 N° 3

MINISTERIO DEL INTERIOR
DEPARTAMENTO NACIONAL DE HIGIENE

REVISTA
DEL
INSTITUTO BACTERIOLOGICO
"DR. CARLOS G. MALBRAN"

Estudio de los virus de la epidemia de influenza ocurrida en la Argentina durante el año 1940

(Con 4 figuras)

Por A. SORDELLI, R. M. TAYLOR y A. S. PARODI

Actualmente se conocen dos virus capaces de producir influenza en el hombre; el primero descubierto en 1933 (1) y designado ahora como virus A (2) de la influenza, y el segundo aislado en 1940 (3, 4) que es conocido como virus B.*

A pesar de que existe una considerable variedad antigénica en las cepas del virus A (5, 6, 7, 8, 9) todas poseen un elemento antigénico común, de manera que después de la enfermedad producida por el virus A en el hombre, hay un aumento de anticuerpos de neutralización y de fijación del complemento para cualquiera de las cepas

De la Sección Virus del Instituto Bacteriológico, Buenos Aires. Estos estudios fueron subvencionados en parte por una donación de la International Health Division de la Fundación Rockefeller.

(*) El Dr. MAGILL nos ha informado personalmente que el virus independientemente aislado por él es antigénicamente similar al que describe el Dr. FRANCIS, y por lo tanto debe ser clasificado como un virus B.

(**) Estas referencias representan solamente las publicaciones más recientes.

del tipo A. El virus B es antigénicamente diferente y no produce ningún aumento de anticuerpos ni de inmunidad para el tipo A; de igual manera el virus A no produce anticuerpos ni inmunidad para el virus B ([10]). Sin embargo, la sintomatología de la enfermedad producida por los dos virus es prácticamente idéntica, con la sola diferencia si se quiere, que las formas producidas por el virus A son un poco más graves. Por consiguiente el diagnóstico diferencial sólo puede ser establecido en el laboratorio.

El virus A ha sido encontrado en regiones muy apartadas y muchas epidemias producidas por él han sido estudiadas y publicadas ([11], [12], [13], [14])(**). En cuanto al virus B que ha sido recientemente identificado, sólo tenemos un conocimiento imperfecto de su distribución y frecuencia.

Como hasta ahora no se han hecho estudios sobre los virus de la influenza en Sud América, nos ha parecido conveniente publicar nuestras observaciones sobre la epidemia ocurrida en la Argentina en el año 1940.

NUMERO DE CASOS DE «GRIPE» EN LA ESCUELA DE MECANICA DE LA ARMADA (Bs. AIRES) 1940

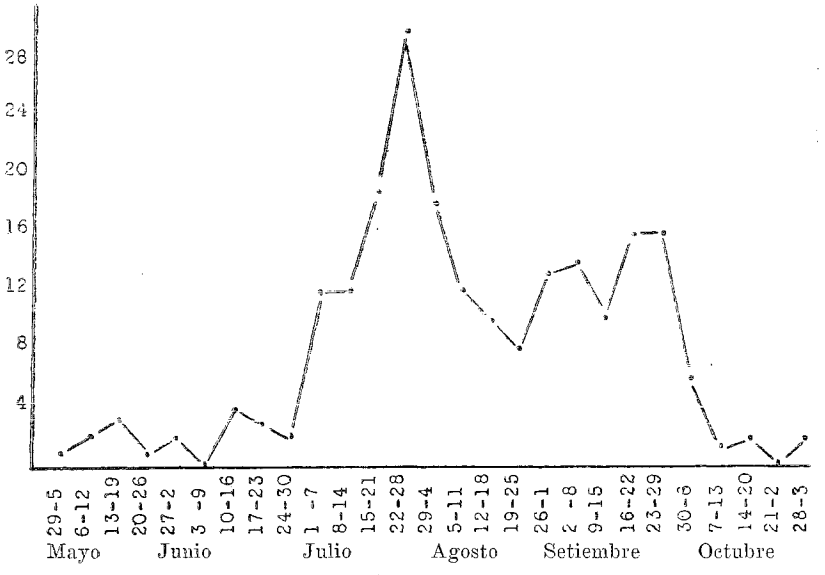

FIG. 1.

EPIDEMIOLOGÍA Y SINTOMATOLOGÍA. — En el mes de julio del año 1940 hubo un aumento brusco del número de casos de influenza según información obtenida de los hospitales y de médicos de la ciudad de Buenos Aires. Esta información fué confirmada por datos más exactos de dos regiones navales (Fig. 1 y 2). A pesar de que no se pudieron obtener datos de la población civil, es muy verosímil

que la epidemia haya sido muy extensa, pues ha sido posible establecer que ocurrió en localidades muy separadas. En cuanto a su origen y forma de diseminación no se las pudo determinar.

La sintomatología fué caracterizada por una rápida iniciación con cefálea y a veces con escalofríos, dolores musculares y articulares, postración, inyección de las membranas mucosas y algún escurrimiento nasal y fiebre de 38 a 39,5° (axilar). En general la forma no era grave y la fiebre no continuaba más allá del segundo o tercer día.

NUMERO DE CASOS DE «GRIPE» POR SEMANA EN EL HOSPITAL NAVAL DE PUERTO BELGRANO. 1940

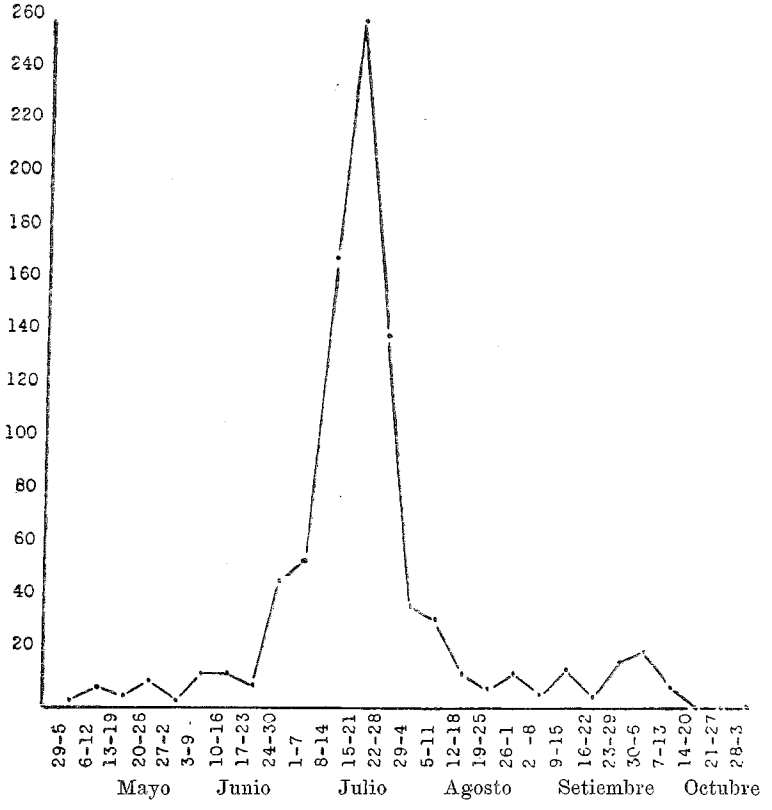

FIG. 2.

Sin embargo, coincidiendo con la epidemia como se puede ver en la figura 3, hubo un aumento rápido de muertes por bronco-neumonía en los hospitales municipales de Buenos Aires. La morbilidad de influenza que aparece en esa figura representa solamente los casos hospitalizados y constituye por lo tanto una fracción del número de casos ocurridos en la población civil. Demuestra, sin embargo, el carácter epidémico de la infección.

MORBILIDAD DE «GRIPE» Y MORTALIDAD DE NEUMONIA Y BRONCONEUMONIA. BUENOS AIRES, 1940

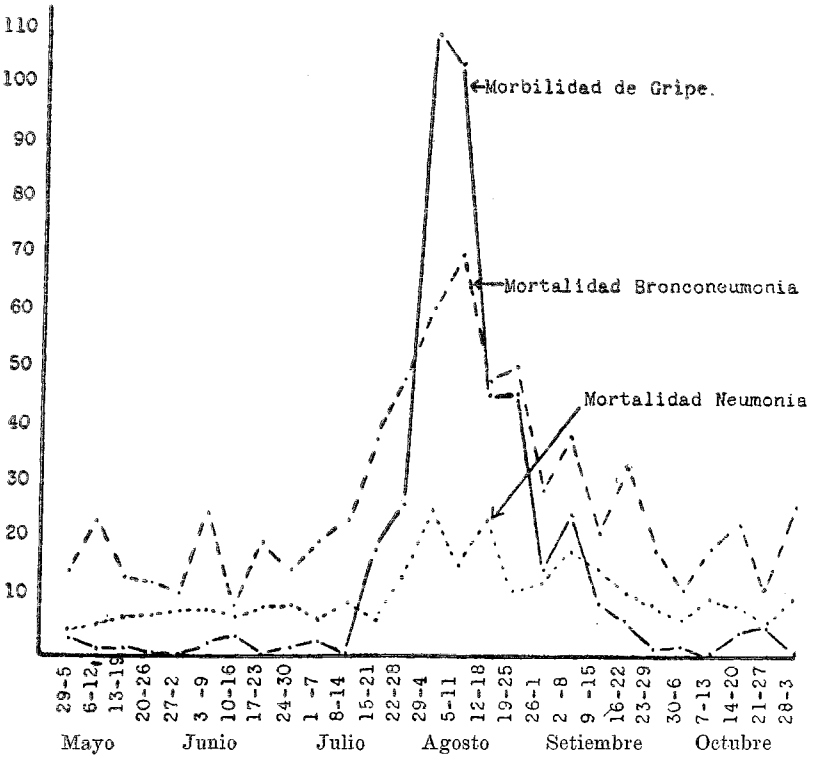

FIG. 3.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

MATERIAL. — Durante la faz activa de la epidemia fueron recogidos gárgaras y sangre de pacientes en el comienzo de la enfermedad, y dos semanas más tarde fué recogida una segunda muestra de sangre de 26 de las personas que habían padecido de influenza. Algunas semanas después de haber terminado la epidemia, se recogió sangre en el comienzo de la enfermedad, y en la convalecencia de tres individuos que presentaban síntomas de influenza. Por último, al terminar el invierno se obtuvo una muestra de sangre de 36 personas que habían padecido de influenza durante la epidemia, es decir, dos o tres meses antes.

Este material fué recogido en parte en la ciudad de Buenos Aires, y parte en Puerto Belgrano a 600 kilómetros hacia el Sud, y constituyó la base para los estudios experimentales.

MÉTODOS. — *Tests de neutralización.* — La acción neutralizante de los sueros sobre los virus fué establecida de la manera corriente ([15]). Cuatro diluciones distintas del suero eran mezcladas con una cantidad standard del virus y la mezcla administrada por vía intranasal a ratones. La dilución del virus era tal que 0.05 c. c. de la mezcla de partes iguales de suero y de virus contenía 100 D.L.M. de virus. Cuatro lauchas eran inoculadas con 0.05 c. c. de cada mezcla. El título del suero es la más alta dilución que protege el 50 % de los animales por un período de diez días. Sólo un aumento del título del suero de cuatro o más veces sobre el valor del suero del período agudo fué considerado como significativo. Fueron usados los tipos PR8 y uno aislado de un paciente de la epidemia de influenza ocurrida en la Argentina, como representante del tipo A, y la cepa Lee ([3]) como representante del tipo B.

Fijación del complemento. — El antígeno para la fijación del complemento fué preparado de pulmones ([16]) de ratones infectados o del corion alantoides de embriones ([17]) infectados con el virus. Los sueros fueron calentados por media hora a 55° empleando 0.2 de c. c. de las diluciones 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 y 1 : 32. Se usó 0.2 c. c. de complemento (2 unidades), 0.2 c. c. de suspensión del antígeno (en general con cuatro o más unidades fijadoras); los tubos fueron incubados por una hora en un baño de 37°. Al cabo de ese tiempo se añadió 0.25 (2 unidades) de hemolisina y 0.25 c. c. de una suspensión al 2.5 % de glóbulos centrifugados. Las lecturas fueron hechas a la media hora de incubación a 37°.

Identificación del virus en las gárgaras. — Se utilizó para esto indistintamente el aumento de anticuerpos en el suero de hurones o de *Cricetus* por instilación del líquido de gárgaras o por la adaptación del virus a los ratones, después de pasarlo por hurones o *Cricetus*.

Para el primer procedimiento los animales eran sangrados por punción del corazón e instilados con el líquido de gárgaras sin ningún tratamiento previo (1 c. c. para los hurones y 0.4 para los *Cricetus*). Esta instilación fué hecha con una anestesia superficial de éter. A las dos semanas fué obtenida una nueva muestra de sangre y con ésta y la primera se determinó la concentración de anticuerpos neutralizantes.

Para adaptar el virus a los ratones, los hurones y los *Cricetus* fueron instilados de la misma manera, pero sin sangría previa, sacrificándolos al cuarto o quinto día por anestesia clorofórmica. Los cornetes y los pulmones fueron obtenidos con precauciones de asep-

sia y con ambos fueron preparados suspensiones moliéndolas por separado en un mortero de porcelana con una pequeña cantidad de polvo de alundo y agregando aproximadamente cuatro volúmenes de caldo de cultivo (pH 7.4). Después de centrifugar la suspensión de los cornetes por sí sola, o mezclada con igual volumen de suspensión de pulmón, se instilaba el líquido a cuatro ratones en la dosis de 0.05 c.c. Al segundo y al tercer día se les instilaba de nuevo con una solución de 0.85 % de cloruro de sodio y se sacrificaban al cuarto o quinto día de la inoculación. Con los pulmones de estos ratones se preparaba una suspensión al 20 % que se pasaba a un segundo grupo de cuatro ratones y así sucesivamente hasta un quinto pasaje. Si aparecían las lesiones que produce el virus de influenza, se continuaban los pasajes hasta adaptar suficientemente el virus para poder practicar una titulación con un suero inmune conocido, que es el método utilizado para identificación definitiva.

RESULTADOS

Las pruebas de neutralización realizadas con sueros del período agudo y de la convalecencia de 26 personas que enfermaron durante el período epidémico, revelan que 22 de ellos han tenido un aumento de anticuerpos neutralizantes para el virus A de la influenza, uno para el virus B, uno para ambos virus, y dos en que no hubo aumento de anticuerpos para ninguno de los dos virus. Las tres personas que padecieron de influenza después que transcurrió el período epidémico, mostraron un aumento de anticuerpos para el virus B solamente.

Las reacciones de fijación de complemento estaban de acuerdo con las pruebas de neutralización, con la sola excepción de dos personas que revelaron aumento de anticuerpos de neutralización para el virus A y no fijaron el complemento con un antígeno preparado con el mismo virus que neutralizaban.

Los resultados de los diagnósticos suerológicos están expuestos en el cuadro Nº 4 en relación con el número de casos de influenza ocurridos en la población a la cual pertenecen los sujetos de los que se tomó el material.

La titulación de los sueros obtenidos durante setiembre y octubre de las 36 personas que habían padecido de influenza dos o tres meses antes, revela que muchos de ellos tenían un título relativamente alto para ambos virus A y B. Como se ignora el título del suero antes y durante el ataque de influenza, es imposible determinar con certeza el tipo de influenza que han padecido. Sin embar-

go, comparando los títulos de estas sangres con los de los sueros del estado agudo y de la convalecencia del grupo precedente, puede presumirse que una proporción muy alta (80 %) de estos 36 individuos han padecido una influenza del tipo A. También un considerable número (40 %) tuvo un título relativamente alto para el vi-

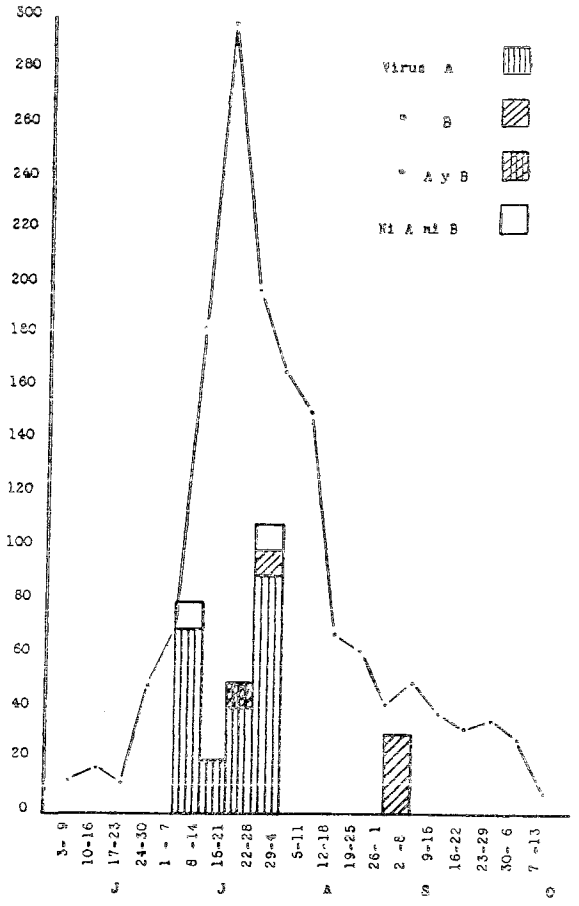

FIG. 4. — Cada cuadrado representa un caso de influenza diagnosticado suerológicamente según el tipo de virus.

rus B, lo que hace suponer que también muchos de ellos estuvieron sometidos a la infección por el virus B.

Los diagnósticos suerológicos fueron confirmados por la inoculación de hurones y *Cricetus* con once líquidos de gárgaras, de personas que revelaron un aumento de anticuerpos para el virus A. Diez de estos lavados produjeron en los animales un aumento de anti-

cuerpos para el virus A. De igual manera, la instilación del líquido de gárgaras obtenido del único paciente que de acuerdo al diagnóstico suerológico tuvo una infección por virus B, determinó la producción de anticuerpos para el virus B en los hurones y *Cricetus*.

Por otra parte, los virus de cinco casos diagnosticados suerológicamente como influenza A, han podido ser adaptados al ratón por pasaje en *Cricetus;* esos virus son neutralizados por un suero inmune del virus A (PR8). De manera análoga el virus de la influenza B pudo ser pasado a ratón y es neutralizado por el suero inmune de influenza B (cepa Lee).

En la actualidad se estudia con mayor precisión las vinculaciones antigénicas de estos virus entre sí y con relación a los otros conocidos de los grupos A y B.

DISCUSIÓN

A pesar de que el escaso número de muestras examinadas no justifica conclusiones categóricas, parece verosímil que la faz epidémica de la influenza en julio de 1940 fué debida principalmente al virus A. Parece también que el virus A está asociado con lo que se puede llamar influenza epidémica, tal como ha sido hallado en Europa central ([18]), especialmente cuando las epidemias tenían mucha extensión y relativa gravedad; el virus desaparece cuando la epidemia decrece.

En el hemisferio Norte la influenza A tiende a desarrollarse en un ciclo de dos años, y es de interés observar que siguiendo a la epidemia de julio en la Argentina ese tipo de virus fué identificado en Cuba, y en ese mismo invierno hubo en el hemisferio Norte una extensa epidemia de influenza A en los Estados Unidos y Europa ([19]). Además, los datos estadísticos indican que hubo una epidemia semejante en la Argentina durante julio de 1938 que precedió de un intervalo de cinco a seis meses una epidemia de influenza en el hemisferio Norte. Nada podemos decir acerca de esta sucesión cronológica, pues puede ser debida sólo al azar.

Aunque hubo algunas infecciones por virus B durante los meses de julio y agosto, no está probado que este tipo haya contribuído de manera importante a la onda epidémica. Ya han sido atribuídas epidemias al virus B y se ha dicho que ellas siguen un ciclo de cuatro años ([10]), pero nos parece más probable que este virus es el agente de algunos casos de la influenza estacional que se observa cada año en los meses de invierno. Esta opinión está basada no solamente en la falta de carácter epidémico de la influenza B en 1940

en la Argentina, sino también porque ya hemos hallado en este invierno del año 1941 infecciones por el virus B sin que el número de casos y la distribución de ellos pueda justificar la aplicación del término epidémico.

CONCLUSIONES

1. — Los virus A y B de la influenza fueron hallados en la Argentina durante el invierno de 1940.

2. — Parece que el virus A ha sido el agente principal de la faz epidémica aguda del mes de julio, mientras la influenza B estuvo distribuída durante un período más largo.

3. — Las características epidemiológicas de la influenza A y B y la relación cronológica de las epidemias de influenza A en los hemisferios del Norte y del Sud han sido consideradas.

* * *

Los autores agradecen al cuerpo médico de la Sanidad de la Armada y del Ejército así como a los técnicos del Instituto Bacteriológico, J. A. Zuccarini y E. A. Molinelli, la colaboración prestada para obtener muestras destinadas al estudio de laboratorio y algunos datos clínico-epidemiológicos.

BIBLIOGRAFIA

1. SMITH, W., ANDREWES, C. H. y LAIDLAW, P. P.: « A virus obtained from influenza patients ». *Lancet*, 1933, 2, 66.
2. HORSFALL, F. L., LENNETTE, E. H., RICKARD, E. R., ANDREWES, C. H., SMITH, W. y STUART-HARRIS, C. H.: « The nomenclature of influenza ». *Lancet*, 1940, 2, 413.
3. FRANCIS, T. JR.: « A new type of virus from epidemic influenza ». *Science*, 1940, 92, 405.
4. MAGILL, T. P.: « A virus from cases of influenza-like upper-respiratory infection ». *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 1940, 45, 162.
5. MAGILL, T. P. y FRANCIS, T. JR.: « Antigenic differences in strains of epidemic influenza virus ». I. « Cross-neutralization tests ». *Brit. J. Exp. Path.* 1938, 19, 273.
6. FRANCIS, T. JR. y MAGILL, T. P.: « Antigenic differences in strains of epidemic influenza virus. II. « Cross-immunization tests in mice ». *Brit. J. Exp. Path.* 1938, 19, 284.
7. SMITH, W. y ANDREWES, C. H.: « Serological races of influenza virus ». *Brit. J. of Exp. Path.* 1938, 19, 293.
8. TAYLOR, R. M., DREGUSS, M. y DE RITIS, F.: «Antigenic behaviour of certain Hungarian strains of epidemic influenza virus ». *Amer. J. of. Hyg.* 1940, 31, Sec. B, 36.

9. BURNET, F. M. y LUSH, D.: « Influenza virus strains isolated from the Melbourne 1939 epidemic ». *Australian J. Exp. Biol. and Med. Science,* 1940, 18, 49.
10. FRANCIS, T. JR.: « The problem of epidemic influenza ». *Transactions and Studies of the College of Physicians and Surgeons of Philadelphia.* Feb. 1941, 8, 218.
11. STUART-HARRIS, C. H., SMITH, W. y ANDREWES, C. H.: « The influenza epidemic of January-March 1939 ». *Lancet,* Feb. 1940, 205.
12. HORSFALL, F. L. JR., HAHN, R. G. y RICKARD, E. R.: « Four recent influenza epidemics; an experimental study ». *J. Clin. Invest.* 1940, 19, 379.
13. TAYLOR, R. M. y DREGUSS, M.: « Influenza virus studies during the 1939 epidemic in Central Europe ». *J. of Infec. Dis.* 1941, 68, 79.
14. BURNET, F. M., CADE, J. F. J. y LUSH, D.: « The serological response to influenza virus infections during an epidemic, with particular reference to subclinical infection ». *Med. J. of Australia,* 1940, March, 397.
15. HORSFALL, F. L. JR.: « Neutralization of epidemic influenza virus. The linear relatioship between the quantity of serum and the quantity of virus neutralized ». *J. Exp. Med.* 1939, 70, 209.
16. EATON, M. D. y RICKARD, E. R.: « Application of the complement fixation test to the study of epidemic influenza ». *Amer. J. of Hyg.* 1941, 33, Sec. B. 23.
17. NIGG, C., CROWLEY, J. H. y WILSON, D. E.: « On the use of chick embryo-cultures of influenza virus in complement fixation tests ». *Science,* 1940, 91, 603.
18. TAYLOR, R. M., PETRILLA, A. y DREGUSS, M.: « Certain broad epidemiological aspects of influenza ». *J. of Infec. Dis.* 1941, 68, 90.
19. Informes personales recibidos de los doctores F. L. HORSFALL JR., New York, M. EATON, San Francisco, EE. UU. de Norte América, y M. DREGUSS, Budapest, Hungría.