

ARTÍCULOS ORIGINALES

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”

Contribución del Laboratorio Nacional de Influenza al enfrentamiento de la influenza pandémica 2009 en Cuba

Belsy Acosta Herrera,^I Alexander Piñón Ramos,^{II} Odalys Valdés Ramírez,^{III} Clara Savón Valdés,^{IV} María Guadalupe Guzmán Tirado,^V Alina Llop Hernández,^{VI} Amely Arencibia García,^{VII} Elias Guilarte García,^{VIII} Grehete González Muñoz,^{IX} Guelsys González Báez,^X Suset Oropesa Fernández,^{XI} Bárbara Hernández Espinosa,^{XII} Ángel Goyenechea Hernández,^{XIII} Vivian Kourí Cardellá,^{XIV} Luis Morier Díaz,^{XV} María Josefa Llanes Cordero,^{XVI} Nilvia Herrada Rodríguez^{XVII}

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: las infecciones respiratorias agudas son consideradas la causa más importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Estas infecciones adquieren mayor significación asociadas a eventos epidémicos y pandémicos ocasionados por los virus influenza. La necesidad de una vigilancia mundial para los virus influenza fue reconocida en 1947 y condujo a la creación de la Red

-
- ^I Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Auxiliar. Asistente. Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Influenza, Departamento de Virología, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK). La Habana, Cuba.
- ^{II} Licenciado en Microbiología. Máster en Virología. Investigador Agregado. Instructor. Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Influenza. Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.
- ^{III} Doctora en Ciencias de la Salud. Investigadora Titular. Instructora. Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios, Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.
- ^{IV} Doctora en Ciencias Biológicas. Investigadora Titular. Profesora Titular. Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios, Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.
- ^V Doctora en Ciencias. Investigadora Titular. Profesora Titular. Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.
- ^{VI} Doctora en Ciencias Médicas. Investigadora Titular. Profesora Titular. Subdirección de Microbiología, IPK. La Habana, Cuba.
- ^{VII} Licenciada en Microbiología. Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Influenza, Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.
- ^{VIII} Especialista de I Grado en Medicina General Integral. Residente de Microbiología. Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.
- ^{IX} Licenciada en Microbiología. Máster en Virología. Investigadora Auxiliar. Instructora. Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios, Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.
- ^X Técnico de Laboratorio. Técnico Auxiliar Docente. Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios, Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.
- ^{XI} Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Auxiliar. Profesora Auxiliar. Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Influenza, Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.
- ^{XII} Técnica de Laboratorio. Técnica Auxiliar Docente. Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Influenza, Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.
- ^{XIII} Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Titular. Profesor Titular. Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios, Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.
- ^{XIV} Especialista de II Grado en Microbiología. Doctora en Ciencias de la Salud. Investigadora Titular. Profesora Auxiliar. Laboratorio Nacional de ITS, Departamento de Virología, IPK. La Habana, Cuba.
- ^{XV} Licenciado en Microbiología. Máster en Virología. Investigador Auxiliar. Profesor Auxiliar. Departamento de Aseguramiento Científico y Técnico, Subdirección de Microbiología, IPK. La Habana, Cuba.
- ^{XVI} Especialista de II Grado en Epidemiología. Asistente. Programa Nacional de Infecciones Respiratorias Agudas, Ministerio de Salud Pública. La Habana, Cuba.
- ^{XVII} Técnica de Laboratorio. Departamento de Aseguramiento Científico y Técnico, Subdirección de Microbiología, IPK. La Habana, Cuba.

Global de Vigilancia de los virus influenza por la Organización Mundial de la Salud. El Centro Nacional de Influenza de Cuba pertenece a esta red desde 1975. En el mes de abril de 2009 fue reconocido un nuevo virus influenza A (H1N1) de origen porcino que circulaban en humanos, identificado como el agente causal de la primera pandemia del siglo XXI por la Organización Mundial de la Salud. OBJETIVO: llevar a cabo la vigilancia nacional del nuevo virus pandémico. MÉTODOS: el Centro Nacional de Influenza de Cuba desarrolló y organizó un diagrama de diagnóstico para la confirmación en casos sospechosos de infección por este virus. Se emplearon diferentes ensayos de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa para el tipado y subtipado de los virus influenza A. RESULTADOS: entre abril y diciembre de 2009, un total de 6 900 muestras clínicas respiratorias fueron procesadas mediante el diagrama diagnóstico nacional y 980 casos fueron confirmados y notificados a las autoridades nacionales de salud y la Organización Panamericana de la Salud. Los rinovirus humanos resultaron otro de los agentes etiológicos de infecciones respiratorias agudas detectados con frecuencia. CONCLUSIÓN: mediante la estrategia nacional de vigilancia de laboratorio fue posible llevar a cabo un monitoreo efectivo de la circulación de los virus influenza y otros virus respiratorios para alertar a las autoridades nacionales de salud, con vistas a enfrentar la influenza pandémica 2009.

Palabras clave: influenza pandémica, diagnóstico molecular, vigilancia de laboratorio.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) de etiología viral constituyen un problema de salud mundial por producir un índice elevado de morbilidad y mortalidad, que alcanzan valores extremos durante situaciones epidémicas y adquieren el carácter de catástrofe social, económica y humana durante episodios pandémicos atribuibles a los virus influenza. Para la vigilancia de estos virus, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en los últimos años ha orientado a todas las naciones a trabajar de modo coordinado en la preparación para enfrentar una impredecible pandemia por el virus aviar influenza A (H5N1) que ha ocasionado según reporte de la OMS hasta el 18 de octubre de 2010, 507 casos humanos confirmados y 302 fallecidos. Existe el compromiso por parte de la comunidad científica internacional de perfeccionar oportunamente los sistemas nacionales de vigilancia que permitan obtener entre sus resultados más importantes el relacionado con la detección de un nuevo virus influenza antes del comienzo de una pandemia, lo cual garantiza disponer de tiempo para organizar una respuesta efectiva de los servicios de salud.¹⁻³

La Red Global de vigilancia de la influenza creada en 1952 bajo el liderazgo de la OMS esta constituida por los reconocidos Centros Nacionales de Influenza (CNI), a los que se atribuye entre otras tareas la responsabilidad de desarrollar y realizar actualizaciones periódicas de ensayos diagnósticos sensibles y específicos, que garanticen el monitoreo seguro de la circulación de estos virus; el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para los virus influenza, localizado en el Instituto

de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) en Cuba, es reconocido como CNI desde 1975. El IPK ha trabajado de modo activo en el cumplimiento de los términos de referencia establecidos por las OMS para los CNI; desde 2005, de conjunto con el Programa Nacional de Prevención de Control de las IRA del Ministerio de Salud Pública, participa en las actividades de implementación del Plan Nacional para el enfrentamiento de la influenza A (H5N1), particularmente en lo que concierne al fortalecimiento del diagnóstico de los virus respiratorios (virus convencionales y pandémicos).⁴

El 25 de abril de 2009 un evento epidemiológico inusitado conduce a la directora general de la OMS a declarar *emergencia de salud pública de preocupación internacional* al notificarse en México y EE. UU. casos humanos confirmados de infección por un nuevo virus influenza de origen porcino, que se denominó inicialmente influenza A (H1N1) porcina y hoy día es conocido como influenza A (H1N1) pandémica. Este virus fue identificado como un complejo mosaico de combinación de segmentos de genes de origen aviar, humano y porcino, nunca visto hasta la actualidad. Entre el 27 y el 29 de abril, la OMS elevó de fase 3 a fase 4 y, posteriormente, de fase 4 a fase 5, el nivel de alerta pandémica, y el 11 de junio se produce la declaración final de fase 6 pandémica.

En Cuba, el gobierno y las autoridades nacionales de salud pública, como parte de sus esfuerzos en materia de salud, ponen en ejecución un Plan de enfrentamiento para la influenza pandémica 2009 y como parte de este plan el 26 de abril el LNR del IPK comienza la elaboración e implementación de una estrategia de vigilancia de laboratorio teniendo en cuenta las orientaciones

del organismo internacional, la situación epidemiológica nacional e internacional y los recursos disponibles. El objetivo del presente trabajo es dar a conocer la contribución de una estrategia de diagnóstico molecular del LNR en Cuba y los principales resultados que garantizaron la confirmación oportuna de casos sospechosos de infección por el nuevo virus. Esto permitió a las autoridades de salud implementar acciones de prevención y control para mitigar el impacto de un desastre sanitario como se le atribuye a una pandemia por influenza.

MÉTODOS

El 26 de abril el Laboratorio Nacional de Referencia de virus influenza, confeccionó un documento guía titulado “Indicaciones de colecta de muestras clínicas para diagnóstico virológico de influenza porcina A (H1N1)”, teniendo en cuenta los conocimientos previos sobre los virus influenza estacionales y la poca información disponible en esa fecha sobre el nuevo agente viral descubierto. Este material se distribuyó de forma inmediata a la Red Nacional de Laboratorios de Microbiología. Estas indicaciones se acompañaron de la introducción de un nuevo “Modelo de colecta de muestra para diagnóstico microbiológico” y el inicio de una primera etapa de implementación del sistema nacional de transporte de muestras para diagnóstico microbiológico en el sistema nacional de salud, que garantizó el envío en condiciones seguras de las muestras para diagnóstico al LNR.

Muestras: entre el 28 de abril y el 30 de diciembre de 2009, como parte de la vigilancia de la influenza pandémica 2009 en Cuba, el LNR procesó un total de 6 900 muestras clínicas (exudado nasofaríngeo, aspirado bronquial, muestras de necropsia de pulmón) procedentes de pacientes que cumplieron los criterios de definición de caso sospechoso de infección por el virus influenza A (H1N1) pandémico incluido dentro del Plan Nacional de enfrentamiento a este virus, disponible en la red de servicios de salud de todo el país.

Todas las muestras fueron tomadas por profesionales capacitados de los Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología y colectadas en 3 mL de medio de transporte para virus

(*Copan Innovation*). Las muestras fueron dispensadas y procesadas de manera inmediata. Una alícuota de cada muestra fue conservada en congelación a - 80 °C para otros procedimientos diagnósticos.

Extracción de ácidos nucleicos: el ARN se extrajo a partir de las muestras clínicas con el empleo del estuche QIAamp Viral RNA (QIAGEN Ref 52906) de forma manual y automatizada, utilizando el QIAcube (QIAGEN).

Amplificación de ácidos nucleicos: se diseñó un primer esquema de diagnóstico con el empleo de protocolos de ensayos de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (TR-RCP) múltiple, previamente publicados e introducidos en el laboratorio durante los últimos años, que permiten el diagnóstico diferencial de 16 agentes diferentes causales de IRA.⁴⁻⁹ También fue incluido un protocolo diagnóstico recomendado por la OMS para la amplificación de un segmento del gen de la matriz (M) de los virus influenza A.^{10,11} Al mismo tiempo se comenzó a realizar el diseño, estandarización e introducción de un protocolo nacional específico de TR-RCP para el nuevo virus pandémico.

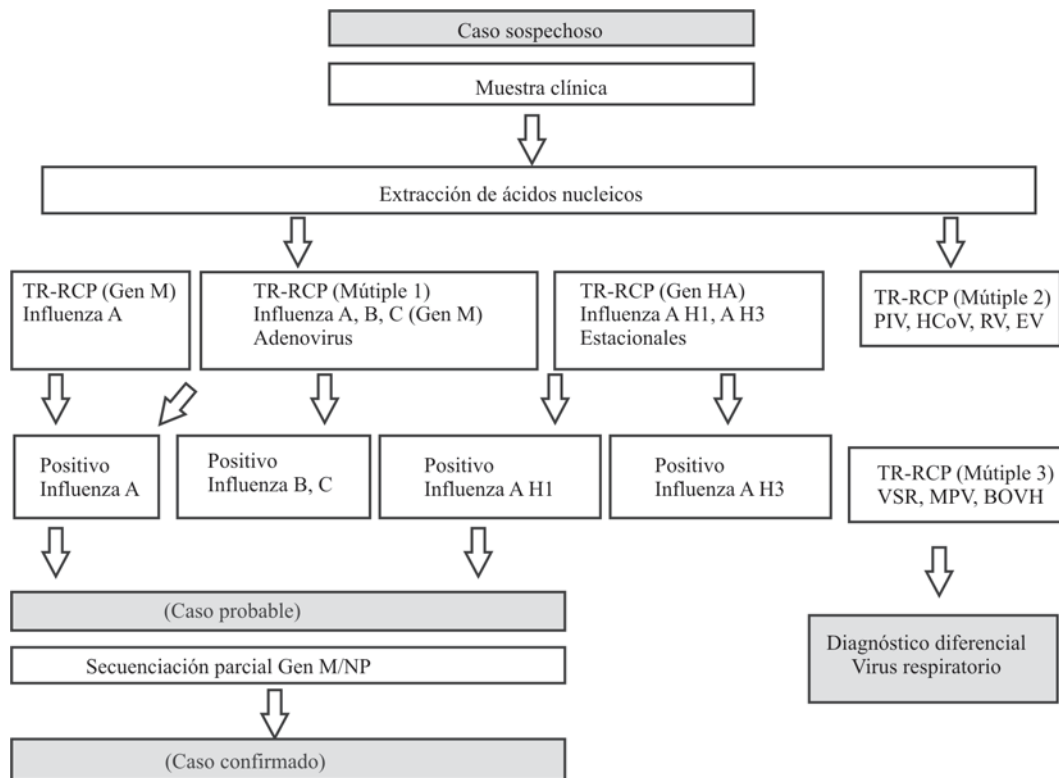
Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los ensayos: se evaluó la capacidad de las herramientas diagnósticas disponibles en el laboratorio para la detección del nuevo virus, mediante el análisis de la sensibilidad y especificidad de los cebadores específicos para el tipado [(gen nucleoproteína (NP), gen M)] y subtipado [gen de la hemaglutinina (HA)] de los virus influenza A disponibles. Se realizaron múltiples alineamientos de la secuencia de los cebadores con la secuencia ya publicada por la OMS del virus prototipo influenza A/California/04/2009 H1N1 pdm, en la base de datos Epiflu Database mediante el programa CLUSTAL X (version 1.83). Este análisis condujo a la confección de la propuesta de un primer esquema de diagnóstico molecular, para la identificación del nuevo virus que posibilitaba amplificar un segmento del gen NP, del gen M y del gen HA y que además incluía el diagnóstico diferencial con virus influenza A estacionales y otros virus respiratorios (influenza C, virus sincitial respiratorio humano A y B, adenovirus, virus parainfluenza humano 1, 2, 3, 4a y 4b, enterovirus, rinovirus, metapneumovirus humano, bocavirus humano y coronavirus humanos OC43 y 229E).⁴⁻¹⁰

Confirmación de los resultados: para la confirmación final de los casos sospechosos fue realizada la secuenciación nucleotídica a partir de los productos amplificados de un segmento del gen M, NP y HA. Los productos amplificados fueron purificados con el estuche comercial de *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de secuencia se realizó con el estuche comercial *Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Kit* (Beckman Coulter), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Actualización del esquema de trabajo: se llevó a cabo la actualización permanente del esquema de diagnóstico de laboratorio que determinó el empleo de un total de 4 esquemas de trabajo. El último de ellos empleó un protocolo de RCP en tiempo real específico para el nuevo virus recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta y distribuido a través de la OMS a todos los CNI.¹²

RESULTADOS

La sorprendente emergencia del nuevo virus influenza A H1N1 pdm en abril de 2009 puso en tensión a la comunidad científica internacional y los sistemas nacionales de salud alrededor del mundo. Ante este acontecimiento, varios especialistas del LNR del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" se dieron a la tarea de elaborar un algoritmo de trabajo rápido y seguro para la vigilancia de laboratorio, que fue actualizado sistemáticamente teniendo como base la situación epidemiológica nacional, los recursos disponibles y las orientaciones de la OMS. El primer esquema de diagnóstico se inició el 26 de abril y fue posible tras obtener resultados positivos en la evaluación de la especificidad para el nuevo virus de los juegos de cebadores disponibles para la amplificación de segmentos de los genes NP, M y HA que formaban parte de los protocolos empleados en la vigilancia de laboratorio de los virus influenza en Cuba.^{5,8-10} En la figura 1



TR-RCP: transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa; PIV: parainfluenza virus; HCoV: coronavirus humanos; RV: rinovirus; EV: enterovirus; VSR: virus sincitial respiratorio; MPV: metapneumovirus humano; BOVH: bocavirus humano.

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", 2009.

Fig. 1. Primer esquema de diagnóstico para el procesamiento de casos sospechosos de influenza A (H1N1) pandémica en Cuba. 26 de abril al 16 de junio de 2009.

se puede observar cómo quedó constituido el primer esquema de trabajo, se destaca que la confirmación fue realizada mediante secuenciación nucleotídica (datos no mostrados).

El 28 de abril se inicia la recepción por el LNR de las primeras muestras clínicas de casos sospechosos de infección por el virus influenza A H1N1 pdm, que permitirían evaluar la sensibilidad y especificidad del primer esquema de diagnóstico implementado. El 4 de mayo es recibida la muestra del primer caso sospechoso que resultó confirmado el 7 de mayo y determinó la alerta a las autoridades nacionales de salud para la puesta en marcha de las acciones de prevención y control incluidas en el plan nacional de enfrentamiento.

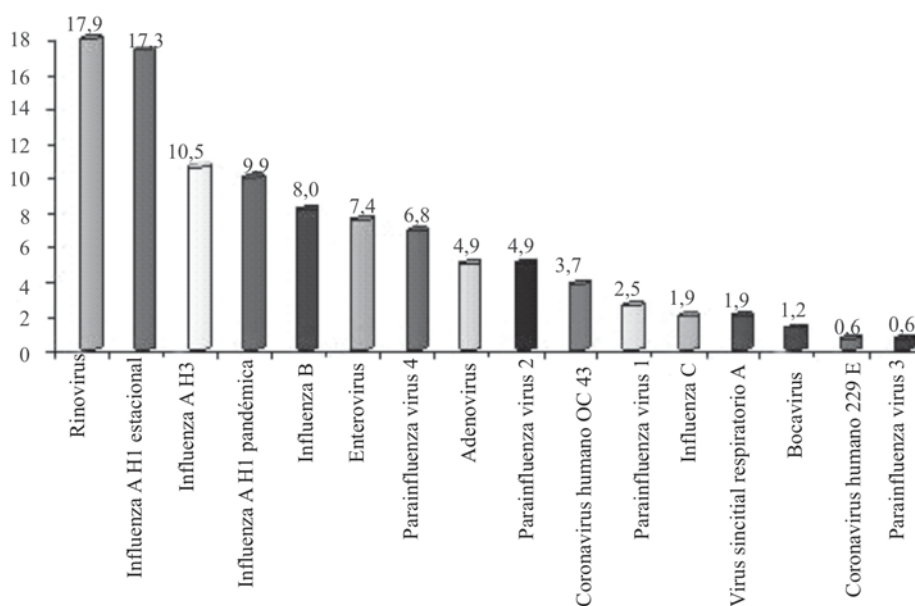
La aplicación del diagnóstico molecular diferencial con otros virus respiratorios permitió detectar 16 agentes que circulaban en Cuba y causaban casos esporádicos, brotes de IRA y pacientes con IRA grave. Como puede apreciarse en la figura 2 en las primeras fases de alerta pandémica es evidente un predominio de la positividad para rinovirus y virus influenza estacionales, y el cuarto lugar lo ocupa el nuevo virus pandémico.

La continuidad del monitoreo de la circulación de los virus influenza y otros virus respiratorios

demonstró en una fase posterior (fase pandémica) un desplazamiento de la circulación del rinovirus por el virus pandémico, al detectarse una mayor positividad (Fig. 3).

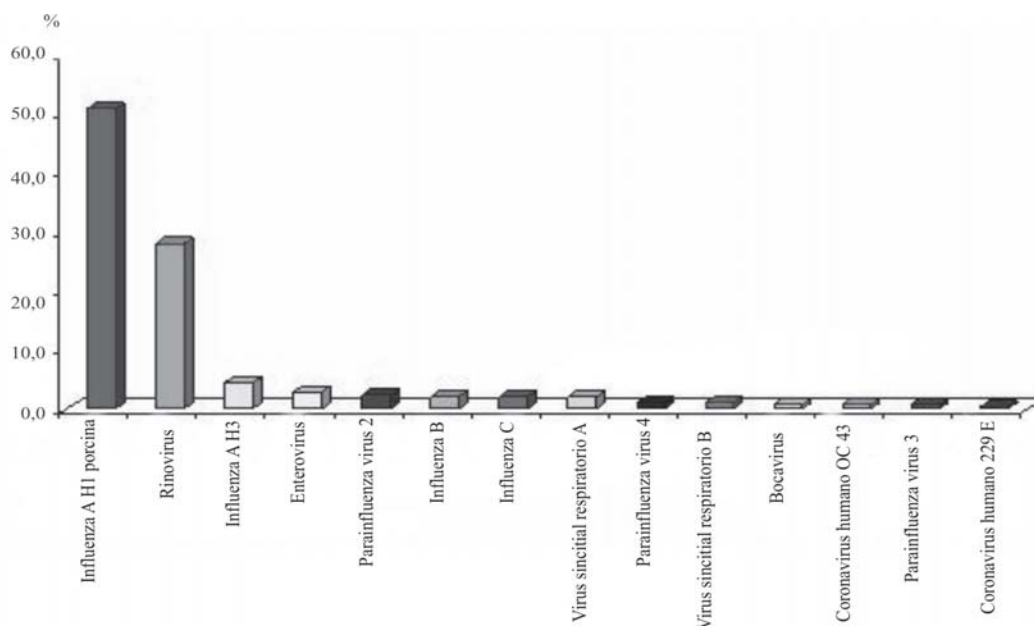
Como resultado del esfuerzo y apoyo de las autoridades nacionales de salud y el gobierno cubano a la actividad de vigilancia de laboratorio, así como la contribución de los organismos internacionales de salud (OPS/OMS) durante esta emergencia, el LNR recibió recursos importantes de última tecnología, consistentes en equipos automatizados (extractor automático de ácidos nucleicos y equipo de RCP en tiempo real) que formaron parte de un cuarto esquema de trabajo. La implementación de un ensayo de RCP en tiempo real empleando el protocolo recomendado por la OMS incrementó la sensibilidad del diagnóstico y se acortó a un período de tiempo no mayor de 24 h.^{11,12}

En la figura 4 se muestra el comportamiento de los porcentajes de positividad a virus influenza estacionales y el nuevo virus pandémico en el período comprendido entre las semanas epidemiológicas 17 a la 52. Es de notar que el mayor número de casos confirmados en Cuba ocurrió entre las semanas 38 a la 41, período en el que fueron diagnosticados 298 casos, lo cual



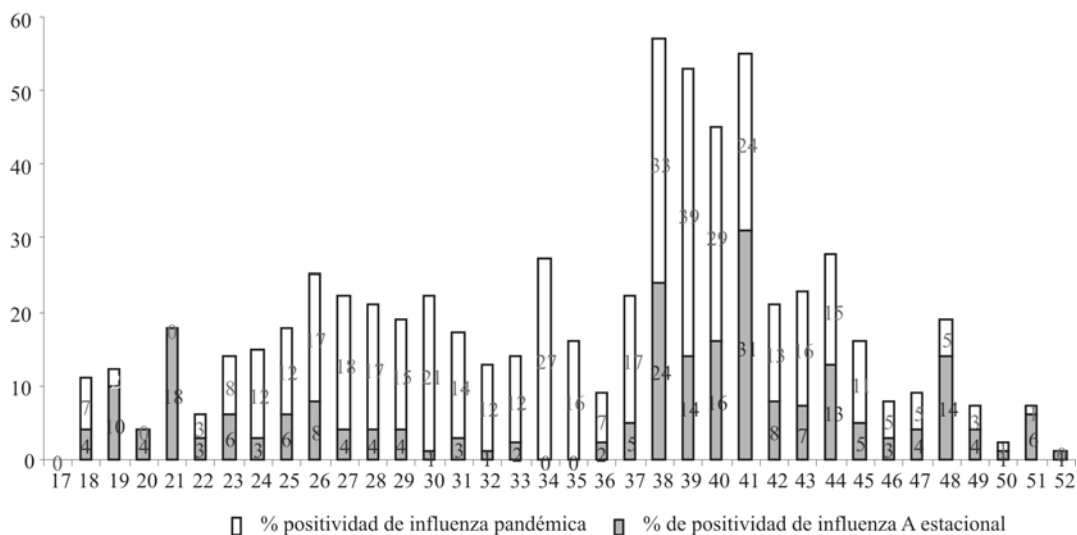
Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, 2009.

Fig. 2. Porcentaje de positividad a virus influenza y otros virus respiratorios con la aplicación del primer algoritmo diagnóstico. Semanas epidemiológicas de la 17 a la 25, 2009.



Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, 2009.

Fig. 3. Porcentaje de positividad según agente etiológico viral durante las semanas epidemiológicas de la 31 a la 34, 2009.



Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, 2009.

Fig. 4. Porcentaje de positividad a los virus influenza. Semanas epidemiológicas de la 17 a la 52, 2009.

representa aproximadamente 30 % del total de casos confirmados durante 2009.

Hasta el 31 de diciembre de 2009, el LNR procesó un total de 6 900 muestras procedentes de

casos esporádicos, brotes, pacientes con IRA grave y fallecidos sospechosos de infección por el virus influenza A H1N1 pdm, de las cuales 980 resultaron confirmados.

DISCUSIÓN

Los avances en la biología molecular han revolucionado a las ciencias biológicas, y se aplican en la actualidad a los estudios de los virus influenza; han sido incorporados en las actividades de vigilancia llevadas a cabo por los CNI en todo el mundo y el nuestro es uno de ellos.⁴ La técnica de TR-RCP constituye de todos los procedimientos de biología molecular, la variante más utilizada para la identificación de los virus de influenza.¹³

La OMS elaboró de manera oportuna y actualizó periódicamente recomendaciones sobre las técnicas diagnósticas que debían ser consideradas para la vigilancia de laboratorio del virus influenza A (H1N1) pandémico y la interpretación de los resultados.¹¹ Sin embargo, es responsabilidad individual de los laboratorios de referencia asumir los protocolos recomendados por este organismo, adquirir por transferencia tecnológica protocolos diagnósticos de otros centros de referencia o la estandarización de algunos caseros, en la evaluación rigurosa de los criterios de sensibilidad y especificidad de estos. El esquema de diagnóstico seguido por nuestro laboratorio cumplió con estas recomendaciones, si se tiene en cuenta que fueron considerados para la confirmación de los casos la amplificación de segmentos correspondientes a diferentes genes (M, NP y HA) y al mismo tiempo uno o dos de los productos amplificados fueron secuenciados.

Los resultados del monitoreo sistemático de la frecuencia de circulación de los virus influenza y otros virus respiratorios en Cuba durante las diferentes fases de la pandemia 2009, constituyen un aporte importante a la vigilancia global de estos virus.

Como parte de la vigilancia de laboratorio de otros virus respiratorios, es de señalar que los rinovirus ocuparon el primer lugar dentro del resto de los agentes que fueron investigados como causales de IRA en casos sospechosos de infección por el virus pandémico. Existen numerosos reportes sobre el papel cada vez más sobresaliente de los rinovirus en el origen de las IRA. En la actualidad son reconocidos como los agentes causales de 50 % de todos los resfriados a lo largo del año y pueden causar infecciones respiratorias bajas con diferentes grados de severidad.^{14,15}

El mayor número de casos confirmados de infección por el virus influenza A (H1N1) pandémico en Cuba ocurrió en los meses de septiembre a octubre, que coincidió con el inicio del curso escolar 2009-2010 y el cese de las vacaciones de verano para una gran proporción de la población cubana. A este período hoy el LNR lo conoce como primera ola pandémica según datos de laboratorio. La primera ola pandémica en Cuba según el número de atenciones médicas y tasa de hospitalización tuvo sus inicios dos semanas anteriores y se extendió más en el tiempo (datos no mostrados). Las infecciones por influenza tienen un marcado carácter estacional. En los climas templados se piensa que el virus subsiste a bajos niveles a lo largo del año, con un marcado incremento estacional, típico durante los meses de invierno (en el hemisferio norte de noviembre a marzo y en el hemisferio Sur de abril a septiembre). En el trópico la actividad de la influenza es menos definida y aunque las infecciones y los brotes pueden aparecer durante todo el año, se ha asociado con mayor impacto a la temporada de lluvias.¹⁶⁻¹⁸ En Cuba, el clima es caracterizado como semitropical con dos estaciones reconocidas: una estación de lluvia de mayo a octubre y una estación seca de noviembre a abril. Estudios previos en Cuba realizados por *Goyenechea* y otros encontraron circulación de virus influenza estacionales durante todo el año, con incrementos en los meses de abril a junio y octubre a diciembre.¹⁹

Resulta importante destacar que la emergencia del virus influenza pandémico tuvo lugar en países del hemisferio norte (México, EE. UU.) después del pico de la estación de influenza, y se diseminó rápidamente a otros países de la región y otros continentes. Sin embargo, la epidemiología y severidad de la próxima estación para el hemisferio sur o norte no podía ser pronosticada. Hoy es conocido el reporte de las tasas elevadas de morbilidad y mortalidad que afectó entre los meses de abril a septiembre a países del hemisferio Sur como Brasil, Argentina, entre otros.²⁰

Nuestros resultados evidencian la importancia del papel de los CNI en el enfrentamiento de una pandemia producida por los virus influenza. El trabajo sistemático de estos en el fortalecimiento de sus capacidades es la garantía para enfrentar

futuras emergencias de salud relacionadas con estos agentes. En Cuba, la estrategia diagnóstica emergente para la influenza pandémica 2009, diseñada, ejecutada y actualizada sistemáticamente por el LNR permitió alertar de manera oportuna a las autoridades de salud, para la toma de acciones de prevención y control que posibilitaron mitigar el impacto social, económico y en materia de salud de este evento epidemiológico en el país.

Contribution of the National Influenza Laboratory to confront the 2009 pandemic influenza in Cuba

ABSTRACT

INTRODUCTION: acute respiratory infections are considered the most important causes of morbidity and mortality around the world. These infections became more significant when associated to epidemics and pandemic events caused by influenza virus. The need for global surveillance of influenza viruses was recognized as early as 1947 and led to the establishment of the World Health Organization (WHO) Global Influenza Surveillance Network (GISN). The Cuban National Influenza Centre (NIC) belongs to this network since 1975. On April 2009, the recognition of a new influenza A (H1N1) of swine origin circulating in humans was identified as the causative agent of the first pandemic in the 21st century declared by the WHO. **OBJECTIVE:** to carry out surveillance of the new pandemic virus nationwide. **METHODS:** the Cuban National Influenza Center developed a diagnostic diagram to confirm infection with the pandemic virus in suspected cases. Different PCR assays for typing and subtyping of influenza A virus were used. **RESULTS:** from April to December 2009, 6 900 clinical respiratory samples were processed by using this diagram, 980 cases were confirmed and notified to the national health authorities and to the Pan American Health Organization. Human rhinoviruses were other important etiologic agents of the frequently detected acute respiratory infections. **CONCLUSION:** with the national strategy for surveillance at lab, it was possible to effectively monitor the circulation of the influenza viruses and of other respiratory viruses in our country and to alert the national health authorities, with a view to facing up to the pandemic influenza (2009)

Key words: pandemic influenza, molecular diagnosis, laboratory surveillance.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis.* 2006 Jan;12(1):15-22.
2. WHO. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. 2010 [updated 2010]; Available from: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_10_18/en/index.html
3. Melidou A, Gioula G, Exindari M, Chatzidimitriou D, Diza-Matafsi E. Influenza A(H5N1): an overview of the current situation. *Euro Surveill.* 2009;14(20).
4. Acosta Herrera B, Piñón Ramos A, Valdés Ramírez O, Savón Valdés C, Goyenechea A, Gonzalez Muñoz G, et al. Fortalecimiento del diagnóstico molecular para la vigilancia de virus respiratorios en Cuba. *Rev Biomed.* 2008;(19):146-54.
5. Coiras MT, Pérez-Breña P, García ML, Casas I. Simultaneous detection of Influenza A, B and C Viruses, respiratory syncytial virus and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription Nested-PCR assay. *J Med Virol.* 2003;69:32-44.
6. Coiras MT, Aguilar JC, García ML, Casas I, Pérez-Breña P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol.* 2004;72:484-95.
7. López-Huerta MR, Casas I, Acosta-Herrera B, García ML, Coiras MT, Pérez-Breña P. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods.* 2005;129:1-7.
8. Pozo F, Casas I, Pérez Breña MP. Development of a RT-nested PCR method suitable for detection of influenza A virus subtype H5. In: *Second European Congress of Virology.* Madrid, Spain: Eurovirology 2004; 5-9 September, 2004.
9. Tenorio-Abreu A, Eiros JM, Rodríguez E, Bermejo JF, Dominguez-Gil M, Vega T, et al. Influenza surveillance by molecular methods. *Rev Esp Quimioter.* 2009;22(4):214-20.
10. OMS. Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans 2005 [cited Abr 2009]. Available from: (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/humanspecimens/en/index.html)
11. WHO Information for Laboratory Diagnosis of New Influenza A (H1N1). Virus in Humans. Available from: http://www.who.int/csr/disease/pandemic_influenza/laboratory_diagnosis_2009_05_21/en/index.html.
12. WHO CDC protocol for realtime RTPCR for swine influenza A (H1N1). Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCRprotocol_20090428.pdf.
13. Zhang W, Evans D. Detection and identification of human influenza viruses by the Polymerase Chain Reaction. *J Virol Methods.* 1991;33:165-89.
14. Savón-Valdés C, Valdés-Ramírez O, Acosta-Herrera B, Gonzalez-Muñoz G, Piñón-Ramos A, Goyenechea-Hernández A. Infección por rinovirus en niños hospitalizados menores de un año. *Cuba* 2006. *Rev Biomed.* 2008;19(2):122-3.
15. Hohenthal U, Vainionpää R, Nikoskelainen J, Kotilainen P. The role of rhinoviruses and enteroviruses in community acquired pneumonia in adults. *Thorax.* 2008;63(7):658-9.
16. Finkelman BS, Viboud C, Koelle K, Ferrari MJ, Bharti N, Grenfell BT. Global patterns in seasonal activity of influenza A/H3N2, A/H1N1, and B from 1997 to 2005: viral coexistence and latitudinal gradients. *PLoS One.* 2007;2(12):1296.
17. Monto AS. Epidemiology of influenza. *Vaccine.* 2008;26(4):45-8.
18. Leo YS, Lye DC, Chow A. Influenza in the tropics. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(8):457-8.
19. Goyenechea A, Bello M, Savon C, Masa A, Roges G. Estudio serológico para determinar la circulación de virus respiratorios en Ciudad de la Habana. *Rev Cubana Med Trop.* 1992;44(3):198-204.
20. Update: Novel Influenza A (H1N1) Virus Infections-Worldwide, May 6, 2009. *MMWR.* 2009;58:453-8.

Recibido: 19 de octubre de 2010. Aprobado: 20 de noviembre de 2010.

Betsy Acosta Herrera. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Autopista Novia del Mediodía Km 6 1/2, entre Carretera Central y Autopista Nacional. AP 601. Marianao 13. La Habana, Cuba. Fax: 53 -7 204 6051. Correo electrónico: betsy@ipk.sld.cu