

Una década de progresos en la vigilancia de laboratorio de los virus influenza en Cuba

A decade of progress in the laboratory surveillance of influenza viruses in Cuba

Belsy Acosta Herrera,^I Alexander Piñón Ramos,^{II} Odalys Valdés Ramírez,^{III} Amely Arencibia,^I Clara Savón Valdés,^{III} Suset Oropeza,^I Mayra Muné Jiménez,^I Grehete Gonzalez,^{III} Ángel Goyenechea,^{III} Guelsys Gonzalez,^{III} Bárbara Hernández,^{III} Rosmery Roque Arrieta,^{III} Luis Morier,^{IV} Susana Borroto,^V Maria Josefa Liánes,^{VI} Antonio Marrero^{VI}

^I Centro Nacional de Influenza, Departamento de Virología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

^{II} Universidad de la Florida. USA.

^{III} Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios, Departamento de Virología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

^{IV} Subdirección de Microbiología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

^V Departamento de Epidemiología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

^{VI} Programa Nacional de IRA, Ministerio de Salud Pública (Minsap). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el Sistema Global de Vigilancia y Respuesta para la Influenza creado por la Organización Mundial de la Salud trabaja en la vigilancia virológica de influenza desde 1952. El Centro Nacional de Influenza de Cuba pertenece a esta red desde 1975. Las infecciones por los virus influenza ocasionan anualmente epidemias con una mortalidad alta, fundamentalmente entre adultos ≥ 65 años. Al mismo tiempo son causa de pandemia, lo que exige un esfuerzo continuo de las autoridades de salud para la confección de planes que permitan la preparación y el enfrentamiento de estos eventos. En este contexto, durante la última década el Centro Nacional de Influenza en Cuba ha trabajado en el fortalecimiento de las capacidades diagnósticas e investigativas para dar respuesta a las emergencias de salud ocasionadas por los virus influenza.

Objetivo: evaluar los avances alcanzados en la vigilancia de laboratorio de los virus influenza a partir del 2005 hasta la actualidad.

Métodos: se realizó un análisis de los resultados alcanzados por el Centro Nacional de Influenza al introducir nuevos ensayos de diagnóstico molecular, llevar a cabo la caracterización genética de virus influenza circulantes, desarrollar investigaciones sobre inmunopatogenia y el estudio del patrón estacional de influenza.

Resultados: en el período 2006-2016 se incrementó el número y calidad de las muestras clínicas para el diagnóstico y vigilancia de los virus influenza. Se ampliaron las capacidades diagnósticas mediante la introducción de ensayos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Los análisis filogenéticos permitieron la detección de variantes genéticas. El patrón estacional de los virus influenza fue similar al de países del hemisferio sur.

Conclusiones: la disponibilidad de métodos sensibles y rápidos para el diagnóstico y vigilancia de los virus influenza contribuye a la identificación oportuna de virus emergentes y re-emergentes para la implementación de medidas de salud pública que minimizan su impacto nacional y global.

Palabras clave: influenza; diagnóstico; vigilancia de laboratorio.

ABSTRACT

Introduction: the WHO Global Influenza Surveillance Network has been engaged in virological surveillance since it was established in 1952. The Cuban National Influenza Center has been a member of this network since 1975. Infections due to influenza viruses cause yearly epidemic events of high mortality, particularly among adults aged ≥ 65 years. They also cause pandemic events demanding the permanent effort of health authorities in developing plans for the preparation for and response to these phenomena. During the last decade, the work of the Cuban National Influenza Center has been aimed at strengthening diagnostic and research capacities to respond to the health emergencies caused by influenza viruses.

Objective: evaluate the progress achieved in the laboratory surveillance of influenza viruses from the year 2005 to the present.

Methods: an analysis was made of the results obtained by the National Influenza Center by incorporating new molecular diagnostic tests, performing a genetic characterization of circulating influenza viruses, conducting research studies on immunopathology and the study of the seasonal pattern of influenza.

Results: the period 2006-2016 witnessed an increase in the number and quality of the clinical samples used for the diagnosis and surveillance of influenza viruses. Diagnostic capacities were broadened with the incorporation of real time polymerase chain reaction tests. Phylogenetic analyses made it possible to detect genetic variants. The seasonal pattern of influenza viruses was similar to that of countries from the southern hemisphere.

Conclusions: availability of sensitive rapid tests for the diagnosis and surveillance of influenza viruses contributes to the timely identification of emerging and re-emerging viruses, so that public health measures may be implemented which will minimize their national and global impact.

Keywords: influenza; diagnosis; laboratory surveillance.

INTRODUCCIÓN

Desde la década del 60 del siglo pasado se pone en práctica, para un gran número de enfermedades transmisibles y por varios sistemas de salud, la definición de vigilancia realizada por Langmuir; esta incluye la colección de información ordenada, el análisis central de la misma y la retroalimentación de la información consolidada a los que la proveían.¹ Sin embargo, el Sistema Global de Vigilancia y Respuesta para la Influenza (GISRS, siglas del inglés; Global Influenza Surveillance Response Systems), conocido inicialmente como Red Global de Vigilancia de Influenza (GISN, siglas del inglés; Global Influenza Surveillance Network) y creado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) trabaja en la vigilancia virológica de influenza desde 1952. El GISRS está formado por 130 centros nacionales de Influenza (CNI) alrededor del mundo, que están responsabilizados con la vigilancia de laboratorio de los virus influenza.²

Las infecciones por los virus influenza ocasionan anualmente epidemias con una mortalidad alta, fundamentalmente entre adultos ≥ 65 años. Estimados de la OMS indican que ocurren 250,000-500,000 muertes anuales por enfermedades circulatorias y respiratorias asociadas a Influenza (tasa: 3,8-7,7 por 100 000 habitantes).³ A estos datos se suman las consecuencias nefastas que ocasionan los eventos pandémicos producidos por estos virus, los cuales demandan un esfuerzo continuo de las autoridades de salud para la confección de planes que permitan la preparación y el enfrentamiento de estos eventos.⁴

En Cuba, las infecciones respiratorias agudas (IRA) ocasionan un promedio de 6 millones de atenciones médicas anuales y la mortalidad por Influenza y Neumonía ocupa la cuarta causa de muerte en la población general.⁵ El Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza fue fundado en enero de 1965 en la sede del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología ubicado en La Habana. Diez años después fue reconocido por la OMS como CNI, condición que mantiene hasta la actualidad. En 1992, se traslada la sede del CNI al departamento de virología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). El empleo de técnicas convencionales y de diagnóstico rápido en este laboratorio proporcionó varios resultados, que permitieron la implementación de acciones de control y respuesta a brotes por parte de las autoridades nacionales de salud pública. Esto fue posible por la puesta en vigor en el 2000 del Programa Nacional Integral de Prevención y Control de las IRA que plantea como objetivo fundamental reducir la mortalidad y la morbilidad por IRA en la población cubana.⁶⁻⁸

En el año 2005, un virus epizootico de influenza aviar del tipo A(H5N1), de una variante altamente patógena, cruzó la barrera entre especies en Asia, causando muchas muertes humanas, y determinó una alerta temprana por la OMS por el riesgo creciente de pandemia.⁹ El 25 de abril de 2009, la Directora General de la OMS declaró Emergencia de Salud Pública de Preocupación Internacional; además anunció la emergencia de un virus influenza A (H1N1) nuevo de origen porcino con potencial pandémico al que se le denominó influenza A (H1N1)pdm09. El 11 de junio, la OMS definió el evento epidemiológico como la primera pandemia del siglo 21 producida por un virus influenza.¹⁰

En este contexto, durante la última década el CNI en Cuba ha trabajado en el fortalecimiento de las capacidades diagnósticas e investigativas para dar respuesta a las emergencias de salud ocasionadas por los virus influenza. Por tales motivos, en el presente trabajo nos propusimos evaluar los avances alcanzados en la vigilancia de laboratorio de los virus influenza a partir del 2005 y hasta la actualidad como respuesta a los desafíos que ha enfrentado el sistema de salud cubano y en particular el Programa Nacional Integral de Prevención y Control de las IRA.

MÉTODOS

MUESTRAS CLÍNICAS

Entre el 2005 y marzo del 2009 para la vigilancia de influenza se colectaron lavados faríngeos, esputos y muestras de necropsias empleando solución salina tamponada estéril y exudados nasofaríngeos. Se utilizó como medio de transporte virológico medio esencial mínimo (Gibco-BRL) con penicilina 200 U/mL, y estreptomicina 200 µg/mL (BioWhittaker); anfotericin B 200 U/mL (Sigma) y albúmina bovina 0,25 % (Merck). Estas muestras fueron tomadas por profesionales de los centros municipales y provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) y del CNI fundamentalmente a partir de casos esporádicos, brotes y hospitalizados con diagnóstico de:

- Infecciones del tracto respiratorio superior (ITRS). Ejemplos: rinitis, sinusitis, otitis media, faringitis, adenoiditis, amigdalitis, epiglotitis, rinofaringitis, faringoamigdalitis, catarro común.
- Infecciones del tracto respiratorio inferior (ITRI). Ejemplos: laringitis, traqueítis, bronquitis, laringotraqueobronquitis, traqueobronquitis, bronquiolitis, neumonía y bronconeumonía.¹¹

Las muestras se tomaban durante las primeras 72 h posteriores al inicio de los síntomas y se enviaban al CNI acompañadas de un modelo de colecta de muestra para estudio microbiológico completado con los datos: nombre y apellidos, edad, sexo, dirección particular, fecha del comienzo de los primeros síntomas, fecha de colecta de la muestra, tipo de muestra, número de historia clínica, impresión diagnóstica, resumen de datos clínicos y epidemiológicos del caso, unidad de salud de procedencia (hospital y provincia) y datos generales del médico de atención.

A partir de abril de 2009 y hasta la actualidad las muestras clínicas tomadas consistieron en: exudados nasofaríngeos, aspirado bronquial y muestras de necropsia de pulmón colectadas en 3 mL de medio comercial de transporte universal para virus (Copan Innovation). Estas fueron realizadas por profesionales capacitados de los centros municipales y provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología y de instituciones hospitalarias. Se indicó la toma de dichas muestras hasta 10 días posteriores al inicio de los síntomas en un documento guía elaborado por el CNI titulado "Indicaciones de Colecta de muestras clínicas para diagnóstico virológico de influenza porcina A (H1N1)" considerando las recomendaciones de la OMS.¹² La actualización del Programa Nacional Integral de Prevención y Control de las IRA en el 2012 en base a documentos guías de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) introdujo dos definiciones de casos para la toma de muestra con propósitos de vigilancia: enfermedad tipo influenza (ETI) e infección respiratoria aguda grave (IRAG).¹³⁻¹⁵

Al mismo tiempo se puso en práctica un nuevo "modelo de colecta de muestra para diagnóstico microbiológico" (modelo 84-43) y un sistema nacional de transporte de muestras para diagnóstico microbiológico en el Sistema Nacional de Salud.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Durante el período 2005-mayo 2009, el ácido nucleico total (ADN/ARN) fue extraído de una alícuota de 200 µL de cada una de las muestras clínicas; se utilizó el método de tiocionato de guanidinio, descrito previamente por *Casas* y otros.¹⁶ Con la adquisición de estuches comerciales a partir del 2009 y hasta la actualidad se procedió a realizar extracción de ácidos nucleicos a partir de las muestras clínicas de forma manual y automatizada, se empleó el extractor automático QIAcube (Qiagen) y los estuches comerciales recomendados para la extracción de ácidos nucleicos en dicho equipo: QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen) y QIAamp Viral DNA mini kit (Qiagen). Para la extracción de ARN a partir de muestras de pulmón homogenizadas se utilizó el equipo automático TissueLyser (Qiagen) y se empleó el estuche comercial para muestras de tejidos, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la amplificación de ácidos nucleicos en el 2005 se introdujeron ensayos de RT-PCR múltiple previamente publicados que permiten el diagnóstico diferencial de 16 agentes diferentes causales de IRA^{17,18} y ensayos para el diagnóstico de nuevos virus respiratorios como el metapneumovirus humano y el bocavirus humano.^{19,20} También se incorporaron los protocolos diagnósticos específicos de RT-PCR convencionales para la identificación de tipos y subtipos de los virus influenza recomendados por la OMS y los publicados por el Centro Nacional de Influenza radicado en el Instituto de Salud Carlos III de España.^{21,22} En el 2009, debido a la emergencia del virus influenza A(H1N1)pdm09, se adicionaron al algoritmo diagnóstico para la vigilancia un ensayo nacional de RT-PCR específico para el nuevo virus y un protocolo de PCR en tiempo real siguiendo las recomendaciones de la OMS.²³⁻²⁵ En el 2011, se introdujo un ensayo previamente publicado de PCR en tiempo real pero utilizando la tecnología de SYBR Green para la detección de citocinas pro inflamatorias y quimiocinas en pacientes graves y fallecidos por influenza A(H1N1)pdm09. A partir de 2012, se optimizaron e introdujeron en la práctica del laboratorio ensayos de PCR en tiempo real para el diagnóstico diferencial de los virus influenza y otros 9 agentes.^{26,27}

SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para la caracterización genética de los virus influenza circulantes desde el 2006 y hasta el presente, se ha llevado a cabo la secuenciación nucleotídica a partir de los productos amplificados de segmentos del gen de la matriz, nucleoproteína, hemaglutinina y neuraminidasa. Los productos amplificados fueron purificados empleando el estuche comercial de QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) y la reacción de secuencia se realizó con el estuche comercial Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Kit, (Beckman Coulter), se siguieron las instrucciones del fabricante. Se utilizó un secuenciador automático Beckman Coulter modelo CEQ 8800, se empleó el método LFR-b y el procedimiento de análisis de datos para productos de RCP.

ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Las secuencias se editaron y ensamblaron en el paquete MEGA 6 v.6.05; se utilizaron las cepas de referencia de cada temporada y cepas representativas de cada temporada que circulan en países de ambos hemisferios, obtenidas de la base de datos Epiflu Database y del GenBank disponibles en internet. Para los análisis filogenéticos se utilizó el programa Mr.Bayes v.3.2.2. Se identificó la presencia de mutaciones en los sitios antigénicos y en los sitios de unión al receptor para la detección de nuevas variantes circulantes, mediante el programa MEGA 6 v.6.05 y FluSurver (flusurver.bii.a-star.edu.sg/). Para la búsqueda y predicción de sitios de N-glicosilación se utilizó NetNGlyc 1.0 Server. Se determinó la similitud aminoacídica de las cepas circulantes secuenciadas con las cepas vacunales propuestas para cada temporada.

RESULTADOS

La vigilancia de laboratorio de los virus influenza en Cuba se ha consolidado en la última década. Como se puede apreciar en la [figura 1](#) el número de muestras que se recibían en el CNI antes del 2005 era insuficiente para el aporte de información valiosa para la vigilancia. El promedio anual de muestras se encontraba alrededor de 200. A partir de 2009, como parte de la vigilancia del virus influenza A(H1N1)pdm09 causante de la primera pandemia de este siglo, ese número se incrementó. Durante el 2010-2016, la cifra alcanzó un promedio aproximado de 3 800 muestras anuales, lo que significa un incremento de casi 10 veces en relación a las procesadas previo al 2009.

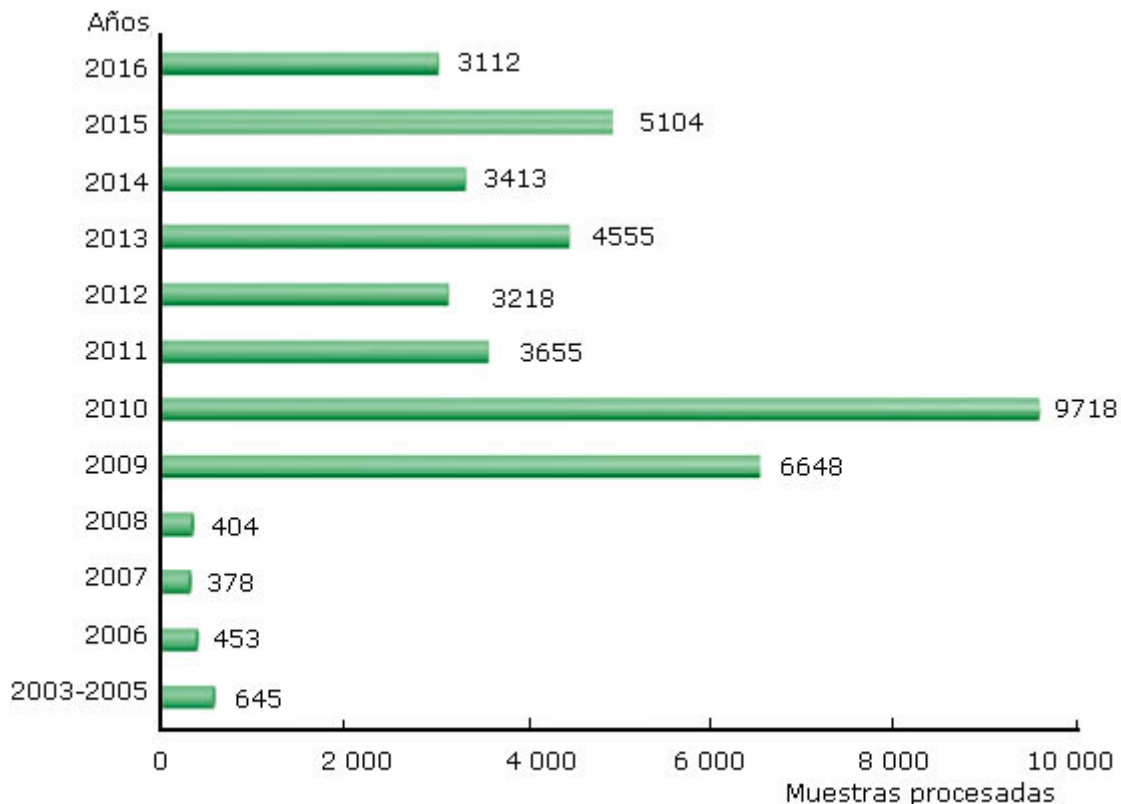


Fig. 1. Distribución de muestras procesadas en Cuba en el Centro Nacional de Influenza durante el período 2003-2016.

A partir de 1997 se comienzan a detectar e informar la ocurrencia de brotes de influenza aviar A(H5N1) en humanos en varios países del mundo; la aparente endemicidad de este subtipo en el sudeste asiático en años subsiguientes constituía un riesgo para la salud pública a nivel mundial. Ante este hecho era inaplazable la preparación y el compromiso de la comunidad científica internacional en perfeccionar y fortalecer tempranamente los sistemas nacionales de vigilancia para la detección oportuna de un virus influenza pandémico y la organización e implementación de una respuesta eficaz.

Las acciones de preparación nacional para el enfrentamiento de una pandemia por virus influenza, particularmente por influenza aviar A(H5N1) comenzaron en el 2005. Los CNI asumieron las tareas para ampliar las capacidades diagnósticas. En el cuadro se muestran los principales resultados del laboratorio entre el 2006 y el 2016. Como se observa, entre el 2006 y el 2007, los resultados logrados contribuyeron a disponer de un algoritmo de diagnóstico molecular en el contexto de la amenaza de una futura pandemia por el virus influenza aviar A(H5N1), y contó con la asignación de un presupuesto significativo por parte de las autoridades del MINSAP.

A este resultado se sumó la ejecución durante el 2008 de un proyecto para la implementación del protocolo genérico para la vigilancia de la Influenza financiado por la OPS y dirigido a mejorar el sistema de vigilancia (clínica, epidemiológica y de laboratorio). Como parte de este proyecto, el CNI y el Programa Nacional Integral de Prevención y Control de las IRA desarrollaron cuatro talleres y un curso teórico-práctico que permitieron la capacitación de profesionales con responsabilidades dentro de la red nacional de vigilancia de IRA en temáticas como: actualización nacional e internacional sobre la vigilancia de Influenza humana e Influenza aviar, Plan Nacional antipandémico, Reglamento Sanitario Internacional, vigilancia centinela en personal de riesgo, vigilancia e investigación de brotes y eventos inusuales, vigilancia de laboratorio, sistema de notificación, normas de bioseguridad, colecta, conservación y transporte de muestras, principio y aplicaciones prácticas del ensayo de inmunofluorescencia, entre otras.

Cuadro. Resultados del Centro Nacional de Influenza, premios, algunas publicaciones y tesis en el período 2006-2016

Año	Resultados del CNI	Premios, Publicaciones, Tesis
2006	Preparación nacional para el enfrentamiento de la influenza aviar A(H5N1) mediante financiamiento del Ministerio de Salud pública (MINSAP). Introducción del diagnóstico molecular mediante PCR convencionales de virus influenza aviar A(H5N1), metapneumovirus humano y otros 16 virus respiratorios. Capacitación del personal, trabajo intersectorial	Metapneumovirus infection in Cuba. First report. Clinical Microbiology and Infection 2006, Vol 12, Supplement 4. Molecular Diagnosis of Acute respiratory tract infection in Cuba. International J Infect Dis. 2006, Vol 10 Supplement
2007	Actualización del algoritmo diagnóstico para influenza aviar A(H5N1) mediante la introducción de un ensayo de RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de influenza aviar A(H5N1).	Tesis de Diploma: Diagnóstico molecular aplicado a los virus influenza como parte del enfrentamiento del Laboratorio Nacional ante una pandemia
2008	Proyecto: Implementación del nuevo	Fortalecimiento del diagnóstico molecular

	<p>protocolo genérico para la vigilancia de la influenza (2008-2011). Financiamiento de OPS. Capacitación de profesionales de la Red Nacional de Vigilancia de IRA. Adquisición de recursos (informáticos, para el ensayo de inmunofluorescencia, para envío de muestras y para la implementación del diagnóstico molecular de virus influenza mediante PCR en tiempo real a nivel del CPHEM de La Habana</p>	<p>para la vigilancia de virus respiratorios en Cuba. Rev Biom 2008;19(3):146-154. Resultado Relevante Institucional: Primer reporte en Cuba de adenovirus asociados a miocarditis fatales dentro del síndrome agudo idiomático</p>
2009 y 2010	<p>Diagnóstico y vigilancia del virus pandémico influenza A(H1N1)pdm09</p>	<p>Contribución del Laboratorio Nacional de Influenza al enfrentamiento de la influenza pandémica 2009 en Cuba. Rev Cub Med Trop 2011;63(1):7-14. Rapid diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 in Cuba. Emerg Infect Dis Volume 18. Resultado relevante de la Academia de Ciencias de Cuba y Premio Anual de Salud del Concurso Central: Logros de una estrategia emergente de laboratorio para el enfrentamiento de la influenza pandémica</p>
2011	<p>Proyecto Internacional: Improvement of the virological diagnosis for the surveillance of Influenza and other respiratory viruses in Cuba". Financiamiento de la Asociación Internacional de Institutos Nacionales de Salud a través del TDR/OMS. Adquisición de recursos para perfeccionar el algoritmo de diagnóstico molecular e incrementar las capacidades</p>	<p>Design and implementation of a molecular method for influenza A virus (H1N1) in Cuba. Rev Cubana Med Trop 63(1):15-20. Estrategia cubana de caracterización molecular del virus influenza A/H1N1pdm. Rev Cubana Med Trop 2011;63:21-9. Infección respiratoria aguda grave en pacientes cubanos durante la ola de influenza pandémica A(H1N1) en Cuba, 2009. Rev Cubana Med Trop 2011;63:30-7</p>
2012	<p>Introducción de ensayos de PCR en tiempo real para subtipado de virus influenza y diagnóstico diferencial con otros virus respiratorios. Actualización del Programa Nacional Integral de Prevención y Control de las IRA. Estudio de la expresión de citocinas pro-inflamatorias y su contribución a la inmunopatogénesis de la enfermedad severa producida por el virus influenza A/H1N1 pandémica</p>	<p>Tesis de Diploma: Introducción de ensayos múltiples de PCR en tiempo real para el diagnóstico diferencial de infecciones respiratorias virales. Tesis de terminación de residencia de Inmunología: Patogénesis y alteraciones inmunológicas asociadas a la infección por el virus de influenza A (H1N1) pdm en pacientes cubanos confirmados con cuadros clínicos de diferentes grados de severidad</p>
2013	<p>Caracterización genética de virus influenza. Introducción de ensayos de PCR en tiempo real para diagnóstico de influenza aviar A(H7) y A(H9)</p>	<p>Adamantane and neuraminidase inhibitor resistance among circulating human influenza A viruses in Cuba during 2006-2010. International Journal Antimicrobial Agents 2013;42: 94-98. Molecular and phylogenetic analysis of influenza A H1N1 pandemic viruses in Cuba, May 2009 to August 2010. International Journal</p>

		Infectious Diseases 2013;1654:3. Resultado relevante Institucional: Aportes virológicos e inmunológicos para la prevención y el control de la influenza en Cuba. Disponibilidad de capacidad diagnóstica para identificar virus influenza con potencial pandémico.
2014	Introducción de un ensayo de PCR en tiempo real para la diferenciación de los linajes de virus influenza B circulantes en Cuba	Genetic drift of hemagglutinin (HA) of influenza A(H3N2) viruses circulating in Cuba between 2011 and 2013. Infect Genet Evol 2014,28c:58-61. Molecular characterization of influenza A viruses circulating in Cuba from April/2009-August/2010. J of Infect in Develop Countries 2014;8(7);929-32. Logro de la Academia de Ciencias de Cuba: Virus influenza en Cuba 2006-2010: variantes genéticas y marcadores inmunológicos relacionados a la gravedad de la enfermedad
2015	Introducción de RT-PCR en tiempo real para la identificación de EV68. Introducción de RT-PCR en tiempo real para identificación de coronavirus NL63, HKU1 y MERS. Participación en estudios regionales sobre estacionalidad de virus influenza en países tropicales. Alerta a las autoridades de salud para cambio de estrategia de inmunización mediante uso de vacuna de hemisferio sur. Alerta a las autoridades sanitarias de la circulación de EVD68 y variantes genéticas de virus influenza	Timing of Influenza Epidemics and Vaccines in the American Tropics, 2002-2008, 2011-2014. Influenza Other Respir Viruses 2015 Dec 24. doi: 10.1111/irv.12371. New genetic variants of influenza A(H1N1)pdm09 detected in Cuba during 2011-2013. Infect Genet Evol 2015,32:322-326. Tesis de Diploma: Caracterización de la circulación del virus re-emergente enterovirus 68 en Cuba. Tesis de Maestría. Etiología viral de las infecciones agudas del tracto respiratorio inferior en Cuba entre mayo 2012- junio 2013. Logro de la Academia de Ciencias de Cuba: Contribución del IPK en la vigilancia integrada de las IRA.
2016	Introducción de PCR en tiempo real para detección de mutaciones de resistencia en los virus influenza. Proyecto asociado a programa: Variabilidad y cambio del clima en Cuba. Su impacto sobre <i>Aedes aegypti</i> , el dengue, las infecciones respiratorias por influenza, VSR y las EDA en el contexto de otras variables ambientales, demográficas, epidemiológicas y microbiológicas. Participación en estudio regional sobre carga de enfermedad por influenza	Contributions of the influenza laboratory surveillance for monitoring the effectiveness of the vaccination. Virol Myc 2016;5:1(Suppl). http://dx.doi.org/10.4172/2161-0517.C1.009

Durante el 2009 y el 2010, se destacó el diseño y puesta en práctica de una estrategia diagnóstica emergente sensible, que permitió la confirmación de casos de infección por el virus de influenza pandémica del 2009 en el 92,4 % de las muestras procesadas en menos de 48 h. Como consecuencia se alertó oportunamente a las autoridades de salud para la ejecución de acciones de prevención y control dirigidas a mitigar el impacto sanitario de la pandemia por influenza A (H1N1)pdm09.

La introducción de la tecnología de PCR en tiempo real y la extracción automática de ácidos nucleicos entre el 2009 y el 2012, (cuadro) contribuyó a incrementar la sensibilidad del algoritmo para la vigilancia virológica de los virus influenza y otros virus respiratorios; a la automatización del diagnóstico y a acortar el tiempo para obtener los resultados. Al mismo tiempo, permitió el desarrollo de investigaciones sobre inmunopatogenia que evidenciaron la relación entre los niveles de expresión elevados de RANTES y el TLR-2; la presencia de la forma heterocigótica del CCR5?32 con la severidad de la enfermedad producida por el virus influenza pandémico.

En la figura 2 se observa la distribución de los porcentajes de positividad a virus influenza, que considera el total de muestras procesadas anualmente. Como se puede apreciar, los porcentajes entre el 2003 y el 2007 fueron muy bajos, alcanzaron un promedio de 2 % durante este período. A partir del 2008 y hasta el 2016, sin considerar los valores para el 2009 y 2010, la cifra promedio (11) de este porcentaje se incrementó en 5 veces.



Fig. 2. Distribución del porcentaje de positividad a virus influenza en el Centro Nacional de Influenza durante el período 2003-2016.

Como es conocido, los avances en la biología molecular han revolucionado a las ciencias biológicas en los últimos 30 años. En particular, la secuenciación nucleotídica de los virus influenza se aplica por la mayoría de los CNI para dilucidar las causas de las frecuentes y a menudo letales epidemias anuales por los virus influenza. La caracterización genética de los virus influenza entre el 2006 y el 2016 posibilitó detectar la circulación de diferentes variantes genéticas de los virus influenza A y B, y su agrupación en diferentes linajes. Además, permitió identificar

variantes genéticas divergentes respecto a las cepas de la vacuna estacional aplicada en Cuba. La introducción en el 2013 del linaje B/Yamagata/16/88 que no circulaba desde antes del 2005 y desplazó de la circulación al linaje B/Victoria/2/87 durante el 2014 y 2015. La introducción de la vigilancia de la resistencia a los antivirales mediante secuenciación nucleotídica también permitió identificar la circulación de variantes genéticas de virus influenza A (H3N2) en el período 2006-2010, resistentes a los adamantanos. Por el contrario, hasta la actualidad el 100 % de los virus influenza estudiados se mantienen sensibles a las drogas inhibitoras de la neuraminidasa.

Los datos aportados por los CNI al GISRS de la OMS evidencian la ocurrencia de brotes y epidemias anuales en los países tropicales al igual que ocurre en los países templados. Sin embargo, el momento en que ocurren, su duración y el impacto que los mismos producen sobre los sistemas de salud no están bien esclarecidos. Por estas razones, la OPS y la OMS han insistido en el perfeccionamiento de los programas nacionales de vigilancia para mejorar la calidad de los datos a obtener y su análisis con vistas a proporcionar información clínica, epidemiológica y virológica para el desarrollo de investigaciones esenciales para estos programas y los decisores de los sistemas de salud. Los resultados de la vigilancia virológica semanal desarrollada por el CNI en Cuba son analizados y compartidos con el Equipo Regional de Influenza de la OPS y el GISRS de la OMS desde el 2009 y hasta la actualidad. Por otro lado, a partir del 2013 el análisis integrado de los datos epidemiológicos y del laboratorio es publicado en el Boletín epidemiológico del IPK con acceso en internet y compartidos individualmente con profesionales suscritos a este.

Entre el 2011 y el 2014, los datos de la vigilancia virológica en Cuba permitieron definir la estacionalidad de la Influenza en Cuba, el momento de comienzo y terminación de cada estación como parte de una investigación desarrollada por la OPS en países tropicales de la región. Los resultados demostraron que el período epidémico de influenza en Cuba se extiende entre los meses de mayo y septiembre, muy similar a otros países tropicales y del hemisferio Sur.

DISCUSIÓN

El diagnóstico de laboratorio es fundamental para el manejo de la infección por los virus influenza en el contexto de los brotes y epidemias anuales o durante un evento pandémico. El resultado de un diagnóstico rápido y sensible depende en primera instancia de la calidad de las muestras clínicas, y son bien conocidas las normas y procedimientos que deben ser seguidos para garantizarla. Al mismo tiempo, la cantidad y representatividad de las muestras clínicas es esencial para la vigilancia. De manera general, la experiencia demuestra que pequeñas cantidades de muestras con datos de buena calidad son más útiles que grandes cantidades con datos de poca calidad.¹⁵ Consideramos que previo al 2005, la cantidad y calidad de las muestras clínicas procesadas por el CNI no eran suficientes para la vigilancia. Las numerosas actividades de capacitación que se realizaron como parte del Plan Nacional de Enfrentamiento a una pandemia por virus influenza A (H5N1) y para la implementación del protocolo genérico de vigilancia de influenza, fueron determinantes en el perfeccionamiento de los diferentes componentes de la vigilancia, y particularmente, para el incremento del número y calidad de las muestras clínicas.

La sensibilidad, seguridad y rapidez de un algoritmo para el diagnóstico de la infección por los virus influenza permite el uso temprano de la terapia antiviral y la profilaxis, evita el uso indiscriminado de antibióticos y la implementación de intervenciones oportunas por los programas de prevención y control de la Influenza. Como se aprecia en los resultados alcanzados por el CNI del IPK en el período 2006-2010, se cumplió con la responsabilidad de actualizar e incrementar la sensibilidad del algoritmo diagnóstico y de ampliar las capacidades mediante la introducción de ensayos de diagnóstico molecular (PCR convencionales y en tiempo real) para virus influenza y respiratorios conocidos, virus influenza con potencial pandémico y el virus pandémico del 2009. Estas capacidades han sido evaluadas por la OMS mediante la participación del CNI en el procesamiento de los Paneles de Control de la Calidad del diagnóstico de los virus influenza mediante PCR. Los incrementos observados en los porcentajes de positividad a los virus influenza a partir del 2008 son una evidencia de estos resultados. Por otro lado, la tecnología de PCR en tiempo real introducida permitió el desarrollo de investigaciones sobre la inmunopatogenia de la infección por virus influenza A (H1N1)pdm09. Por último, la automatización del algoritmo para la vigilancia virológica y el personal capacitado en su empleo estará disponible para la ejecución de investigaciones futuras y enfrentar nuevas emergencias de salud asociadas o no a los virus influenza.

La vacunación es la medida más importante de prevención, para minimizar el impacto anual de los virus influenza epidémicos o de un virus pandémico.¹³ El análisis molecular de los cambios en la secuencia nucleotídica en los genes de los virus influenza es una poderosa herramienta para determinar la extensión y la naturaleza de la variación genómica.¹⁵ Los análisis filogenéticos de secuencias parciales de varios genes de los virus influenza A y B realizados entre el 2006 y el 2016, permitieron identificar variantes genéticas no detectadas previamente y realizar alertas tempranas a las autoridades sanitarias. Del mismo modo, la identificación de las variantes genéticas predominantes en cada temporada, aportó información importante a las autoridades sanitarias del país sobre la efectividad de la vacuna y a la OMS para una mejor selección de los componentes de la vacuna estacional de la próxima temporada para cada uno de los hemisferios. De la misma forma, los resultados sobre la detección de variantes virales con mutaciones de resistencia fue determinante para la modificación de la estrategia de control y profilaxis mediante el uso de antivirales. Esto conllevó la eliminación del uso de la amantadina y la rimantadina, y la inclusión, como alternativa terapéutica antiviral, del uso de drogas inhibitoras de la actividad de la neuraminidasa como el oseltamivir y el zanamivir.

Definir las características de cada temporada de influenza es otra responsabilidad de los CNI compartida con epidemiólogos y clínicos dentro de un Programa de Vigilancia.^{13,15} En Cuba, el fortalecimiento de la vigilancia virológica sistemática permitió en la última década conocer y darle seguimiento semanal a la positividad de los virus influenza, no solo durante las diferentes fases de la pandemia 2009 sino también entre el 2011 y el 2014. Este resultado, constituyó el sustento para conocer la estacionalidad de la influenza en Cuba. La identificación de que la mayor positividad a estos virus se encuentra entre los meses de mayo y septiembre, aunque pudiera sufrir variaciones en algunas temporadas adelantándose o retardándose su circulación, permitió sugerir a las autoridades del Programa Nacional de Vigilancia el cambio de la estrategia de Prevención y Control mediante la inmunización. Al considerar los resultados del laboratorio sobre estacionalidad y el hallazgo de mayores porcentajes de similitud de las cepas circulantes en Cuba con cepas del hemisferio Sur se sugirió introducir en el Programa de inmunización el empleo de la vacuna del hemisferio sur y aplicarla entre los meses de marzo y abril previo al inicio de la estación.

La publicación periódica actualizada sobre el comportamiento de las IRA en Cuba y su etiología viral en el Boletín Epidemiológico ha permitido retroalimentar los resultados de la vigilancia a los profesionales de la salud y su utilización para la toma de decisiones en todos los niveles de atención sanitaria, tanto en el manejo clínico de los casos, como en la vigilancia epidemiológica.

Los virus influenza están cambiando constantemente, lo que puede conducir a la emergencia de un nuevo virus. Cuándo, en qué lugar y cuál subtipo de virus influenza A causará la próxima pandemia no es posible predecir. Los CNI deben continuar preservando los progresos que permitan mantener la efectividad de los Programas de Vigilancia y trabajar para su perfeccionamiento sistemático sobre la base del trabajo diario, de las lecciones aprendidas en el enfrentamiento de la influenza pandémica 2009 y de los resultados de las investigaciones nacionales e internacionales.

Aunque el presente trabajo demuestra los avances del CNI del IPK en la última década, estos no son suficientes. Es necesaria la contribución del laboratorio con el Programa Global mediante el envío de cepas a los laboratorios de referencia de la OMS, la participación sostenida en los Paneles de Control de la Calidad, la participación en un mayor número de investigaciones regionales y globales y el cumplimiento de todos los términos de referencia de un CNI. Es indispensable continuar trabajando en el licenciamiento y certificación del laboratorio y en la implementación del Sistema de Gestión de la Calidad. El monitoreo y evaluación del programa de vigilancia en todos sus componentes, el fortalecimiento de la red de laboratorios, el perfeccionamiento del sistema de notificación, las tareas de colaboración y capacitación nacionales e internacionales, la búsqueda de financiamiento para proyectos de investigación e incrementar el número de publicaciones, tiene que formar parte de la agenda de trabajo para los años venideros. Solo de esta forma continuaremos contribuyendo a lograr mejores indicadores de salud.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a colegas y directivos del IPK, del Ministerio de Salud Pública de Cuba, de los centros municipales y provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología y de todo el sistema de salud cubano por la cooperación con el Centro Nacional de Influenza del IPK.

Un especial agradecimiento al Centro Nacional de Influenza, del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España por la colaboración mantenida por más de 20 años.

El financiamiento para el desarrollo de las diferentes tareas del laboratorio fue obtenido del Ministerio de Salud Pública, de la Organización Panamericana de la Salud y de la Asociación Internacional de Institutos Nacionales de Salud a través del TDR/OMS (TSA) no. 200229741.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Langmuir AD. The surveillance of communicable diseases of national importance. *N Engl J Med.* 1963;268:182-92.
2. World Health Organization. [citado 5 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/csr/disease/influenza/centres/en/>
3. World Health Organization. Influenza (Seasonal) Fact Sheet 211. 2014. [citado 5 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
4. Fabian GT. Pandemic influenza and lessons from history. *J S C Med Assoc.* 2008;104(5):126-31.
5. Cuba. Ministerio de Salud Pública (MINSAP). Anuario Estadístico de Salud. 2010-2014 [citado 5 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.sld.cu/servicios/estadisticas/>
6. Goyenechea A, Bello M, Savon C, Masa AM, Roges G. Serologic study for determining the circulation of respiratory viruses in Havana City. *Rev Cubana Med Trop.* 1992;44:198-204.
7. Oropesa Fernandez S, Abreu Nicot I, Morier L, Hernandez Espinosa B, Gonzalez Z, Goyenechea A. Hemorrhagic pneumonia caused by influenza virus: virological diagnosis. *Rev Cubana Med Trop.* 2000;52(1):73-5.
8. Cuba. Ministerio de Salud Pública (MINSAP). Programa Integral de Atención y Control de las IRA. La Habana: MINSAP; 2000.
9. Comité redactor de la reunión consultiva de la Organización Mundial de la Salud sobre la gripe humana A/H5. Infección en seres humanos por el virus de la gripe aviar del tipo A (H5N1). *N Engl J Med.* 2005;353:1374-85.
10. PAHO-WHO. PAHO'S Director Newsletter PAHO-WHO. ISSUE 7. 2009 [cited 2017 Ag 5]. Available from: http://www.paho.org/English/D/D_DNewsLetters_eng.asp
11. Organización Mundial de la Salud. Prevención y control de enfermedades respiratorias agudas con tendencia epidémica y pandémica durante la atención sanitaria. Pautas de la OMS. WHO/CDS/EPR/20076. 2007.
12. World Health Organization. Information for Laboratory Diagnosis of New Influenza A (H1N1) Virus in Humans. 2009 [cited 2017 Ag 5]. Available from: http://www.who.int/csr/disease/pandemic_influenza/laboratorydiagnosis_2009_05_21/en/index.html
13. PAHO-CDC. Generic Protocol for Influenza Surveillance. 2006 [cited 2017 Ag 5]. Available from: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/flu-snl-gpis.pdf>
14. PAHO. Guía Operativa para la Vigilancia Nacional Intensificada de Infecciones Respiratorias Agudas Graves. 2011 [citado 5 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.paho.org/influenza/guías>

15. WHO. Interim Global Epidemiological Surveillance Standards for Influenza. 2012 [cited 2017 Ag 5]. Available from: http://www.who.int/influenza/resources/documents/who_globalsurveillancemanual_oninfluenza_2012_0721/en/index.html
16. Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1995;53:25-36.
17. 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.
18. 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.
19. Pozo F, Garcia-Garcia ML, Calvo C, Cuesta I, Perez-Brena P, Casas I. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol.* 2007;40(3):224-8.
20. Lopez-Huertas MR, Casas I, Acosta-Herrera B, Garcia ML, Coiras MT, Perez-Brena P. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods.* 2005;129(1):1-7.
21. Ruiz-Carrascoso G, Casas I, Pozo F, Perez-Gonzalez C, Reina J, Perez-Brena P. Development and implementation of influenza A virus subtyping and detection of genotypic resistance to neuraminidase inhibitors. *J Med Virol.* 2010;82(5):843-53.
22. WHO. Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans 2005 [cited 2017 Ag 5]. Available from: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/humanspecimens/en/index.html
23. WHO. Information for Laboratory Diagnosis of New Influenza A (H1N1) Virus in Humans. 2009 [cited 2017 Ag 5]. Available from: http://www.who.int/csr/disease/pandemic_influenza/laboratorydiagnosis_2009_05_21/en/index.html
24. Valdés O, Piñón A, Acosta B, Savón C, González G, Arencibia A, et al. Design and implementation of a molecular method for influenza A virus (H1N1) in Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2011;63(1):15-20.
25. WHO. CDC protocol of real-time RT-RCP for Influenza A H1N1. 2009 [cited 2017 March 3]. Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf

26. Bonroy C, Vankeerberghen A, Boel A, De Beenhouwer H. Use of a multiplex real-time PCR to study the incidence of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus infections during two winter seasons in a Belgian paediatric hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:504-9.

27. Brittain-Long R, Nord S, Olofsson S, Westin J, Anderson LM, Lindh M. Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections. *J Clin Virol.* 2008;41:53-6.

Recibido: 6 de septiembre de 2017.

Aceptado: 13 de octubre de 2017.

Belsy Acosta Herrera. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Autopista Novia del Mediodía km 6½, La Lisa. La Habana, Cuba. Correo electrónico: bacosta@infomed.sld.cu