

Fortalecimiento del diagnóstico molecular para la vigilancia de virus respiratorios en Cuba

Belsy Acosta-Herrera¹, Alexander Piñón¹, Odalys Valdés², Clara Savón², Angel Goyenechea², Grehete González², Suset Oropesa-Fernández¹, Guelsys González², Bárbara Hernández¹

¹Centro Nacional de Influenza, ²Laboratorio Nacional de Virus Respiratorios. Departamento de Virología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Ciudad de la Habana, Cuba

RESUMEN

Introducción. La Influenza, la más contagiosa de las Infecciones Respiratorias Agudas (IRAs), se considera actualmente como una enfermedad emergente y re-emergente, debido a la amplia circulación de variantes antiguas y nuevas entre la población mundial. A partir de 1997, se comienzan a detectar y reportar los brotes de Influenza Aviar (H5N1) en humanos, en varios países del mundo, y la aparente endemicidad de este subtipo en el Sudeste Asiático constituye y continuará siendo un riesgo para la Salud Pública a nivel mundial. Por otra parte, está la preparación y el compromiso de la comunidad científica internacional en mejorar tempranamente algunas deficiencias y obtener logros importantes en los Sistemas Nacionales de Vigilancia; uno de los primordiales lo constituye el hallazgo o detección de nuevos virus antes del comienzo de la pandemia, que permitirá disponer de tiempo para organizar una respuesta adecuada.

Materiales y Métodos. Se procesaron un total de 309 muestras clínicas respiratorias de pacientes con diagnóstico clínico de IRA, durante la temporada 2005-2006, por medio de un esquema de diagnóstico molecular. Se introdujeron cuatro ensayos de Transcriptasa Reversa/Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT/PCR) para el diagnóstico virológico de las IRAs producidas por los virus influenza.

Resultados. El 65.6% de las muestras pertenecían a pacientes menores de 18 años de edad. 21.35% procedentes de pacientes ambulatorios, 18.4% de pacientes hospitalizados y 60.1% de unidades pertenecientes a la Red centinela. Del total de las muestras procesadas, 13 fueron positivas al tipo B de los virus influenza (4.2%), 6 al virus influenza A (1.9%) y 4 al virus influenza C (1.2%). Tres de las muestras positivas a influenza A fueron subtipificadas como H3/N2 (50%) y tres no pudieron ser subtipificadas (50%).

Discusión. Los avances en la biología molecular han revolucionado a las ciencias biológicas; se aplican en la actualidad a los estudios de los virus influenza y se emplean, entre otras cosas, para tratar de dilucidar las causas de las frecuentes y, a menudo, letales epidemias de Influenza. Algunos Laboratorios de Referencia han incorporado las poderosas herramientas de biología molecular en las actividades de vigilancia y control y el nuestro es uno de ellos.

Durante la temporada 2005-2006, los virus influenza B demostraron un predominio en la circulación en Cuba. Los resultados de este estudio muestran que el Laboratorio Nacional de Referencia de los Virus Influenza en Cuba cuenta con herramientas diagnósticas de avanzada para enfrentar la vigilancia virológica de las IRAs en las condiciones actuales y dar respuesta a la

Solicitud de sobretiros: Dra. Belsy Acosta Herrera. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Autopista Novia del Mediodía km. 6 ½, la Lisa, P.O. Box 601, Marianao 13, CP 17 100. Teléfono: 53 7 2020450, Fax: 53 7 2046051, E-mail: betsy@ipk.sld.cu

Recibido: el 14 de agosto de 2008. **Aceptado para publicación:** el 18 de noviembre de 2008

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb081934.pdf>

amenazante Influenza pandémica. Sin embargo, resulta imprescindible continuar perfeccionando nuestros sistemas actuales de vigilancia para incrementar el conocimiento de la circulación de estos virus en los países tropicales.

Palabras clave: Virus influenza, diagnóstico molecular, vigilancia de laboratorio

ABSTRACT

Enhancement of molecular diagnostics for surveillance of respiratory viruses in Cuba

Introduction. Influenza, the most contagious of the Acute Respiratory Infections (ARIs) is considered an emergent and re-emergent disease due to a wide range of variants among the world population. Since 1997 Avian Influenza virus (H5N1) is reported in the human population of various countries and the apparent endemic feature of this Southeast Asian virus type will continue to be a risk for the world public health. The international community needs to be committed and prepared to improve and strengthen ahead some of the deficiencies of surveillance and control systems at national level. One of the main issues to be considered is the detection of new virus variants before the pandemic this will allow time of preparation for the proper response.

Materials and Methods. A total of 309 samples from patients with clinical diagnosis of ARI were processed during 2005-2006 using a scheme of molecular diagnosis. Four RT-PCR assays were implemented for the virological diagnosis of ARI caused by influenza virus.

Results. Samples distribution was, 65.6% of the samples belonged to patients under 18 years old, 21.35% were from ambulatory patients, 18.4% from hospitalized patients and 60.1% from units belonging to the sentinel network. Of the total of the processed samples, 13 (4.2 %) were positive to influenza virus type B, 6 (1.9 %) to influenza virus type A and 4 (1.2 %) to influenza virus C. Three (50.0 %) of the positive samples to influenza type A were H3N2 subtype virus and three could not be subtyped (50.0 %).

Discussion. The advances in the molecular biology have revolutionized the biological sciences. At present, those tools are applied in studies of influenza virus to try to identify the frequent causes of lethal influenza epidemics. Reference laboratories worldwide have implemented the powerful tools of molecular biology for surveillance and control strategies, our laboratory is one to them.

During 2005-2006 the influenza virus type B showed predominance of frequent circulation in Cuba. The results of this study show that the National Influenza Centre of Cuba has advanced diagnostic tools to cope with the surveillance of the ARIs at current conditions and is prepared to give response to the threatening influenza pandemic. However; it is necessary to continue to strengthen the national surveillance systems in order to increase the knowledge of the circulating virus in tropical countries.

Key words: Influenza virus, molecular diagnosis, laboratory surveillance

INTRODUCCIÓN

La Infección Respiratoria Aguda es la enfermedad más común en las personas de todas las edades a nivel mundial y, en particular, es una de las principales causas del uso de los servicios médicos en países en vías de desarrollo, siendo los virus los agentes etiológicos predominantes. Entre los agentes virales responsables de enfermedades del tracto respiratorio tenemos al virus sincitial respiratorio humano (VSRh), adenovirus (Adv), virus parainfluenza humano 1, 2 y 3 (PIV-1h, PIV-2h y PIV-3h), enterovirus (EV), rinovirus, metapneumovirus humano (MPVh), bocavirus humano (BoVh) y virus de influenza A, B y C (1-4).

La Influenza es considerada la más contagiosa de las IRAs y el agente etiológico son los virus influenza. Estos virus se caracterizan por su gran variabilidad antigénica, propiedad que garantiza su continua circulación en la población humana y hacen su comportamiento impredecible. Esta variabilidad se debe a cambios antigénicos que afectan a las

Diagnóstico molecular de virus respiratorios en Cuba

proteínas superficiales del virus (Hemaglutinina y Neuraminidasa). Cuando las nuevas variantes son introducidas en la población que no posee inmunidad pueden originarse epidemias mayores o pandemias, por la susceptibilidad universal a la nueva variante establecida (5).

En Cuba, las IRAs constituyen un importante problema de salud, representando la primera causa de morbilidad y, en el caso de la Influenza asociada a neumonía, oscila entre la cuarta y quinta causa de mortalidad dentro de las causas generales de muerte (6, 7).

La Organización Mundial de la Salud creó, hace más de 50 años, el Sistema Mundial de Vigilancia de los Virus Influenza que ha contribuido al conocimiento y al entendimiento de la epidemiología de estos virus y anualmente ofrece las formulaciones actualizadas de la vacuna contra este virus para cada temporada.

Desde diciembre de 2003, una situación epidemiológica particular caracterizada por el reporte de casos humanos infectados con un virus de Influenza Aviar ha puesto en tensión a la comunidad científica internacional. El virus, hasta el presente, no ha adquirido la capacidad suficiente para transmitirse fácilmente de aves a humanos y, afortunadamente, no se ha demostrado transmisión entre los humanos. Sin embargo, los virus de la Influenza son capaces de cambiar, y el virus aviar puede desarrollar la capacidad de transmitirse fácilmente entre personas y, por ende, una nueva pandemia por este virus podría sobrevenir, rivalizando en impacto con la pandemia de 1918-1919 (8, 9).

La Organización Mundial de la Salud ha desarrollado un plan organizado, basado en su programa de vigilancia, para responder a una amenaza pandémica y ha orientado a las autoridades de salud nacionales en todo el mundo sobre la necesidad de apresurar nuestra preparación para frustrar la impredecible Influenza pandémica.

Las autoridades sanitarias de Cuba han propuesto iniciar las actividades de preparación para el enfrentamiento de una pandemia y la

elaboración de un Plan Nacional antipandémico que propone, entre sus objetivos primordiales, fortalecer el diagnóstico de los virus respiratorios (virus convencionales y pandémicos). El Laboratorio Nacional de Referencia de los Virus Influenza constituye un pilar fundamental para el logro de dichos objetivos. Por tales motivos, en el presente trabajo nos propusimos dar a conocer cómo se ha reestructurado el esquema de diagnóstico molecular que se aplica en la vigilancia de infecciones respiratorias virales en nuestro país, mediante la introducción en nuestras condiciones del laboratorio de diferentes protocolos de ensayos de PCR, que permiten realizar el diagnóstico rápido de tipo y subtipo de los virus influenza, incluyendo el virus influenza aviar H5N1 y el diagnóstico diferencial con otros virus respiratorios. Al mismo tiempo, se exponen los resultados obtenidos de la aplicación de dicho esquema de diagnóstico molecular para la vigilancia virológica de las infecciones respiratorias agudas durante la temporada 2005-2006.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el fortalecimiento del diagnóstico virológico, el Laboratorio de Referencia se dio a la tarea de reestructurar el esquema diagnóstico de los virus influenza, introduciendo e incorporando a la vigilancia virológica protocolos de ensayos de RT-PCR, previamente publicados, que posibilitan la tipificación y subtipificación de estos virus. Otros ensayos de RT-PCR, no menos importantes, fueron incorporados para proporcionar el diagnóstico diferencial de las infecciones causadas por virus influenza de las producidas por otros virus respiratorios.

Se procesaron 309 muestras clínicas (exudado nasal, exudado nasofaríngeo, lavado faríngeo) de pacientes que acudieron a los cuerpos de guardia de los Policlínicos y Hospitales pediátricos y clínico-quirúrgicos de las diferentes provincias del país, y de pacientes que fueron notificados como parte de un brote en instituciones cerradas de diferentes provincias durante la temporada

2005-2006. Fueron considerados como criterios de inclusión: paciente sin límite de edad con infección aguda del tracto respiratorio superior o inferior, con no más de tres días de evolución, y voluntariedad para la toma de muestra con la finalidad de realizar diagnóstico virológico. Se define, en el Programa Nacional de Control de las IRA, como caso sospechoso de infección respiratoria aguda a todo paciente que presente fiebre súbita superior a 38°C y tos o dolor de garganta y dolores articulares en ausencia de otras causas. Se define como caso confirmado el paciente con resultado positivo para influenza u otros virus respiratorios en las pruebas de laboratorio.

Las muestras colectadas fueron transportadas con las exigencias normadas para el transporte seguro de las muestras para diagnóstico virológico y fueron recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Influenza y Virus Respiratorios del Departamento de Virología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Todas las muestras fueron colectadas en 3 mL de medio de transporte para virus, conteniendo penicilina 200 U/mL y estreptomycin 200 µg/mL (BioWhittaker, MA); fungizona 200 U/mL (Sigma) y albúmina bovina 0.25% (Merck, Darmstadt, Germany). Las muestras fueron distribuidas y conservadas en congelación a -70°C hasta su procesamiento.

Para la extracción de ácidos nucleicos se ha implementado en el laboratorio el método de ticionato de guanidinium, a partir de una alícuota de 200µL de la muestra clínica. Este método posibilita la extracción de ácido nucleico, tanto de tipo ADN como ARN, y fue descrito previamente por Casas y colaboradores, 1995 (10).

La totalidad de las muestras clínicas fueron procesadas para la detección del genoma de 16 virus respiratorios. Se emplearon tres protocolos de RT-PCR, hoy disponibles en el laboratorio y previamente publicados. La totalidad de las muestras positivas por métodos de diagnóstico rápido (inmunofluorescencia y PCR) y un 10% de las muestras negativas fueron procesadas para aislamiento viral (datos no mostrados).

El primero de los ensayos que se empleó para el diagnóstico, en particular de los virus influenza, fue estandarizado y publicado por Coiras *et al.* en 2003, y es capaz de detectar y tipificar en un solo tubo de reacción a diferentes virus que producen infecciones respiratorias (Influenza A, B, C, VSRh y Adv). Los cebadores que emplea este ensayo para el diagnóstico de los virus influenza fueron diseñados en regiones altamente conservadas de la nucleoproteína de dichos virus y son capaces de permitir la amplificación de los subtipos de virus influenza A desde H1 hasta H16 (11). Con el objetivo de realizar el diagnóstico diferencial de la infección producida por virus influenza de la producida por otros virus respiratorios y considerando el reporte cada vez más frecuente en la literatura internacional de las coinfecciones por dos o más virus respiratorios, se aplicó al 100 % de las muestras un ensayo de RT-PCR múltiple para la detección de PIV-1h, PIV-2h, PIV-3h, PIV-4a y 4b, EV, rinovirus, coronavirus humanos 229E y OC43 y un ensayo de RT-PCR para el diagnóstico de MPVh (11-13).

Al 100% de las muestras positivas a virus influenza A se le aplicaron dos ensayos de reciente introducción en el laboratorio. Un ensayo de RT-PCR anidada múltiple para la subtipificación de los virus influenza A/H3, A/H1 y A/H5 y una RT-PCR para la amplificación de los subtipos de virus influenza A/N1 y A/N2. Ambos protocolos fueron estandarizados por Pozo *et al.* en 2004 y obtenidos del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España (14).

Por último, no menos importante lo constituye la introducción, en nuestras condiciones, de los ensayos de RT-PCR recomendados por la OMS para el diagnóstico del virus influenza A/H5N1, aunque en la actualidad sólo han sido aplicados a controles positivos conocidos, gentilmente donados por el Grupo de Trabajo de Diagnóstico Aviar del Centro Nacional de Salud Animal de Cuba, y en el procesamiento de ARN de virus influenza A enviados a los Laboratorios Nacionales de Referencia de los diferentes países, por parte de un laboratorio

Diagnóstico molecular de virus respiratorios en Cuba

de referencia de la OMS, como parte de controles periódicos de calidad del diagnóstico molecular a nivel de los Centros Nacionales de Influenza (15).

RESULTADOS

En el **Cuadro 1** se puede apreciar la distribución de las muestras clínicas recibidas para la vigilancia virológica de las IRA, según la unidad de salud de procedencia y la edad de los pacientes. El mayor porcentaje (65.6%) de muestras recibidas correspondió a pacientes menores de 18 años y el 60.1 % del total perteneció a las unidades de salud de la Red centinela.

En la **Figura 1** se muestra el esquema de trabajo que se lleva a cabo en los Laboratorios Nacionales de Referencia para el Diagnóstico Virológico Molecular de las Infecciones Respiratorias Agudas atribuibles a los virus

influenza, como parte del trabajo realizado por varios investigadores con el objetivo de fortalecer la vigilancia de laboratorio de las IRAs en nuestro país.

Los resultados de la positividad virológica para los virus influenza, encontrada en las muestras procesadas durante la temporada 2005-2006, se muestran en el **Cuadro 2**. Del total de las muestras procesadas, 13 fueron positivas al tipo B de los virus influenza (4.2%), 6 al virus influenza A (1.9%) y 4 al virus influenza C (1.2%). Tres de las muestras positivas a virus influenza A fueron subtipificadas como H3N2 y tres no pudieron ser subtipificadas.

En la **Figura 2** se muestra la distribución de muestras positivas procesadas por los ensayos de RT-PCR previamente referidos, teniendo en cuenta los agentes virales detectados. Resulta relevante

Cuadro 1. Distribución de las muestras recibidas para la vigilancia de laboratorio de las IRA virales. Cuba 2005-2006

	Ambulatorios	Hospitales	Red centinela	Total
Adultos (>18 años)	30/91.70%	4/1.29%	72/23.3%	106/34.3%
Niños (0-18 años)	36/11.65%	53/17.15%	114/36.8%	203/65.6%
Total	66/21.35%	57/18.4%	186/60.1%	309/100%

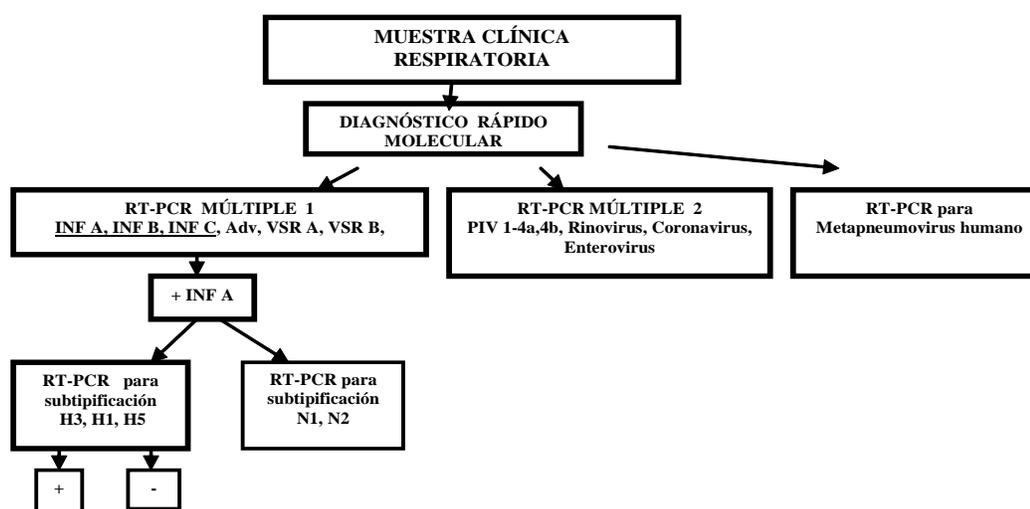


Figura 1. Esquema de diagnóstico molecular aplicado a muestras clínicas respiratorias para la vigilancia virológica de las infecciones respiratorias en Cuba

Cuadro 2. Positividad virológica mediante ensayos de RT-PCR. Cuba 2005-2006

Ensayo diagnóstico de RT-PCR	Muestras procesadas	Positividad
RT-PCR anidada Múltiple 1 (Influenza A, B y C, VSRh A y B, Adv)	309	102 Adenovirus 25 VSRh 13 Influenza B 6 Influenza A 4 Influenza C
RT-PCR anidada Múltiple 2 (PIV 1-4a,4b, RV, EV, Coronavirus 229E y OC43)	309	9 Rinovirus 3 Parainfluenza (1 PIV2 y 2 PIV3) 1 Enterovirus
RT-PCR anidada para MPVh	309	11 Metapneumovirus
RT-PCR anidada para Subtipificación de virus influenza A	6	3 Influenza A/H3N2 3 sin subtipificar

destacar la alta positividad encontrada a los Adv (33%) en las muestras procesadas. También es de importancia el reporte de infecciones respiratorias asociadas a rinovirus, enterovirus y metapneumovirus, ya que en años previos no contábamos con herramientas diagnósticas.

DISCUSIÓN

Los Laboratorios Nacionales de Influenza reconocidos por la OMS, funcionan como Centros Nacionales de Referencia para la vigilancia de estos virus a nivel mundial; constituyen líderes en esta actividad de vigilancia que contempla las

actividades tendientes a mejorar las capacidades del diagnóstico para los virus influenza estacionales y evitar que los posibles casos humanos de Influenza Aviar pasen inadvertidos, permitiendo a su vez orientar las intervenciones de control oportunamente.

El uso de los métodos de diagnóstico convencionales, tales como el aislamiento viral o los ensayos de detección de antígeno, pueden tomar algo de tiempo antes de que el resultado final esté disponible. Las técnicas moleculares, sin embargo, presentan ventajas en lo que se refiere a la velocidad y la sensibilidad del diagnóstico

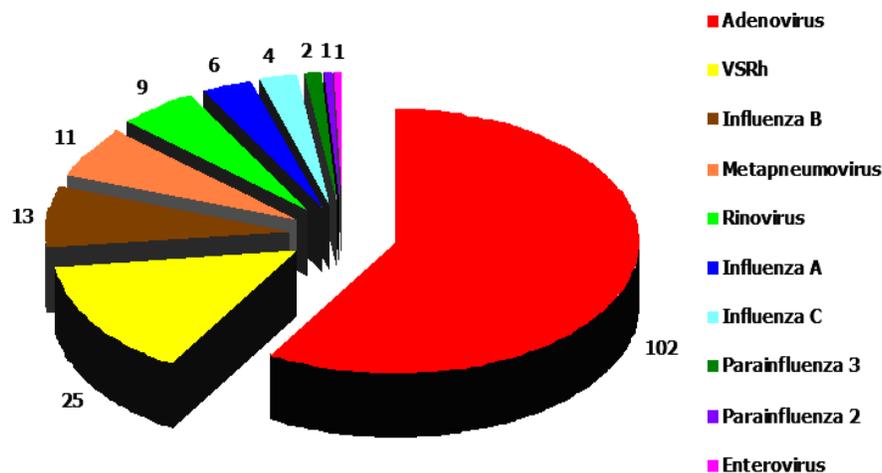


Figura 2. Distribución de la positividad encontrada, según agente viral detectado

Diagnóstico molecular de virus respiratorios en Cuba

de laboratorio de las IRAs virales. Los ensayos de RT seguido de la PCR (RT-PCR) constituyen una herramienta diagnóstica rápida, sensible y específica, y la integración de la misma a la vigilancia virológica de la circulación de los virus influenza fortalece la capacidad diagnóstica de los Laboratorios Nacionales de Referencia (16-18).

Existen múltiples artículos científicos sobre la utilidad de los ensayos de PCR múltiple para el diagnóstico diferencial de las IRAs y un número importante de ensayos en laboratorios de diferentes regiones del mundo han sido estandarizados y utilizados en la vigilancia de los virus influenza (19, 20).

La OMS ha elaborado recomendaciones sobre las técnicas diagnósticas que deben ser consideradas ante un caso humano infectado con el virus Influenza Aviar A/H5N1, que incluyen tanto las técnicas convencionales (aislamiento viral), el diagnóstico serológico y técnicas de diagnóstico rápido (Inmunofluorescencia y PCR) (15).

En el caso de la técnica de PCR, 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, evaluando con rigor los criterios de sensibilidad y especificidad de los mismos.

Desde hace algunos años, ha tomado gran interés el desarrollo de las denominadas PCR múltiples, reacciones que consiguen amplificar simultáneamente y en un único tubo diferentes secuencias diana, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes de interés.

En nuestro laboratorio dos ensayos de RT-PCR múltiples fueron incorporados a la vigilancia virológica. El primero de ellos fue publicado por Coiras *et al.* en 2003 y es capaz de detectar y tipificar a la vez diferentes virus que producen infecciones respiratorias (Influenza A, B, C, VSRh A y B y Adv) en un solo tubo de reacción. Los iniciadores o cebadores fueron diseñados en regiones altamente

conservadas de la nucleoproteína (NP) de los virus influenza, la proteína de fusión (F) del VSRh y el exón de los Adv de los tipos 1-47. Este ensayo en su diseño incluye un control interno de amplificación, que permite excluir la presencia de falsos negativos en las muestras debido a la presencia de inhibidores o fallas en el proceso de extracción del ácido nucleico viral. Esta RT-PCR múltiple tiene una sensibilidad elevada en comparación con el aislamiento en cultivo celular. Los autores demostraron que era posible obtener niveles de detección entre 0.1 y 0.01 de la TCID₅₀ (50% de la Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos) para los virus influenza A y B, respectivamente, y entre 1-10 moléculas de un producto clonado y amplificado del virus influenza C. La especificidad probada de este ensayo es alta al no producirse reacciones cruzadas con otros virus respiratorios, como los rinovirus y los virus parainfluenza (11).

El otro ensayo de RT-PCR múltiple, introducido en las condiciones de nuestro laboratorio y probado en la práctica para la vigilancia de los virus influenza, es capaz de detectar los dos subtipos de virus influenza A (H1 y H3) que se mantienen circulando actualmente en los humanos y el subtipo de virus influenza A H5. En este ensayo, son empleados juegos de cebadores específicos que permiten la amplificación de fragmentos extensos de la subunidad HA1 del gen de la hemaglutinina de estos virus, que han demostrado ser útiles tanto para la subtipificación de los virus influenza A directamente a partir del ARN extraído de la muestra clínica; al mismo tiempo, el producto amplificado es de gran utilidad para la secuenciación posterior y análisis filogenéticos de estos virus, permitiendo realizar estudios de caracterización genética y de epidemiología molecular. La sensibilidad y especificidad evaluada para dicho sistema está en el valor de 0.001 TCID₅₀ para ambos subtipos de influenza A (14).

La detección del subtipo AH5N1 desde 1997 en los humanos y su extensión a diferentes países del mundo preocupa intensamente a la comunidad científica internacional. Los efectos de

esta contingencia serían mundialmente dramáticos, pues la velocidad de diseminación de una nueva cepa sería hoy varias veces superior a la velocidad adquirida por otras pandemias anteriores.

Como parte del plan antipandemia en nuestro país, la preparación para la detección precoz de este virus por métodos moleculares es una prioridad.

En el presente trabajo con el empleo de ARN control positivo gentilmente donado por el Grupo de Trabajo de Diagnóstico Aviar del Centro Nacional de Salud Animal, fue aplicado el protocolo de RT-PCR anidada múltiple para la subtipificación de los virus influenza, el cual funcionó de forma satisfactoria en nuestras condiciones. Pozo *et al.*, al evaluar la sensibilidad de este ensayo, demostraron que fue capaz de amplificar hasta una dilución de 10^6 de un ARN control positivo de la cepa A/Tern/ South Africa/ 61 (H5N1). Énfasis particular tiene el hecho de que este ensayo fue aplicado por el autor al ARN control positivo de cepas de Influenza A (H5N1) procedentes de linajes Eurasiático y Americano, y en todos los casos obtuvo amplificación de un fragmento del tamaño esperado (14).

En Cuba, la morbilidad por IRA muestra un índice promedio anual de 406.6 atenciones médicas por 1,000 habitantes desde 1990, con la mayor incidencia en 1996, en el cual se observó un comportamiento epidémico, con un índice de más de 450 atenciones por cada 1,000 habitantes. Dentro de las infecciones respiratorias, la influenza desempeña un papel importante por la magnitud y trascendencia que tiene en la morbilidad y mortalidad. Típicamente tiene un comportamiento endémico y se presentan alzas epidémicas correspondientes a los meses entre octubre y marzo, aunque se han producido brotes importantes en los meses de julio y agosto. Sin embargo, es necesario continuar realizando estudios integrales para corroborar dicho comportamiento.

Nuestros resultados ponen en evidencia el nivel de preparación alcanzado por los Laboratorios de Referencia en lo que a capacidad diagnóstica se refiere. Sin embargo, la baja positividad asociada

a los virus influenza en nuestro país durante la temporada 2005-2006 (7.4%) nos orienta a la necesidad de realizar mejoras relacionadas con la obtención de datos epidemiológicos, definiciones de casos, toma y conservación adecuada de las muestras clínicas para diagnóstico, entre otros aspectos.

El hallazgo de que el mayor porcentaje de muestras enviadas a los Laboratorios Nacionales de Referencia procede de pacientes menores de 18 años y, en particular, el mayor número a menores de 5 años está asociado a que el mayor volumen de muestras clínicas respiratorias que hoy se reciben en el laboratorio son provenientes de niños con diagnóstico de Infección Respiratoria Aguda grave, particularmente bronquiolitis y neumonía.

La detección de adenovirus, como virus más frecuente asociado a IRA altas y bajas durante la temporada 2005-2006, corresponde con la circulación típica de estos virus en nuestro país. Estos agentes son de carácter endémico, con alzas asociadas a brotes y casos esporádicos en determinados meses del año, en dependencia del serotipo circulante (21).

Es de destacar la detección de casos de bronquiolitis y cuadros parecidos a Influenza asociados a infección por metapneumovirus humano (virus descubierto en 2001 y que se reportó por primera vez en nuestro país en 2005 en todos los grupos de edades).

El hallazgo de la fuerte asociación de los Rinovirus a cuadros de IRA es similar a lo reportado en otros países. En la temporada 2005-2006 estuvo asociado a brotes de pequeña magnitud en instituciones cerradas y casos esporádicos de IRA de la comunidad.

Los métodos de diagnóstico virológico rápido y, dentro de ellos, los métodos de diagnóstico molecular permiten el diagnóstico sensible y específico en estadios tempranos de la enfermedad, no sólo para informar al médico de asistencia para la toma de decisiones terapéuticas, sino también para realizar acciones de prevención y control necesarias para este tipo de infecciones, alertar a

Diagnóstico molecular de virus respiratorios en Cuba

las autoridades de salud sobre el comienzo de una epidemia y, en la actualidad, para desencadenar la alerta mundial ante una pandemia. Los datos aquí mostrados prueban que el Laboratorio Nacional de Referencia en Cuba, como parte de la preparación para el enfrentamiento contra una pandemia por el virus influenza A subtipo H5N1, ha obtenido mejores capacidades en la vigilancia de laboratorio para contribuir a la seguridad nacional e internacional.

REFERENCIAS

1. **Monto AS.** Viral respiratory infections in the community: epidemiology, agents, and interventions. *Am J Med* 1995; 99:24S-27S
2. **Nicholson KG, McNally T, Silverman M, Simons P, Zambon MC.** Influenza-related hospitalizations among young children in Leicestershire. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:S228-30
3. **van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA et al.** A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7:719-24
4. **Christensen A, Nordbo SA, Krokstad S, Rognlien AG, Dollner H.** Human bocavirus commonly involved in multiple viral airway infections. *J Clin Virol* 2008; 41:34-7
5. **Fizzell J, Armstrong PK, Branley JM.** Pandemic influenza preparedness. *N S W Public Health Bull* 2006; 17:151
6. **Weisz B, David AL, Gregory LG, Perocheau D, Ruthe A, Waddington SN et al.** Targeting the respiratory muscles of fetal sheep for prenatal gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193:1105-9
7. **Hilleman MR.** Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 2002; 20:3068-87
8. **Casas I, Pozo F.** SARS, avian influenza, and human metapneumovirus infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23:438-47, quiz 448
9. **Kuiken T, Fouchier R, Rimmelzwaan G, Osterhaus A.** Emerging viral infections in a rapidly changing world. *Curr Opin Biotechnol* 2003; 14:641-6
10. **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
11. **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.
12. **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; 72:484-495
13. **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
14. **Pozo F, Casas I, Pérez Breña MP.** Development of a RT-nested PCR method suitable for detection of influenza A virus subtype H5. En: *Second European Congress of Virology. Eurovirology 2004.* Madrid, España 5-9 septiembre, 2004
15. **WHO.** Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans: www.who.int, 2005
16. **Abdel-Ghafar AN, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Hayden FG, Nguyen DH, de Jong MD et al.** Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *N Engl J Med* 2008; 358:261-73
17. **Cattoli G, Terregino C.** New Perspectives in Avian Influenza Diagnosis. *Zoonoses Public Health* 2008; 55:24-28
18. **Scott PL.** Human Influenza Surveillance: the Demand to Expand. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(4):562-568
19. **Ellis JS, Smith JW, Braham S, Lock M, Barlow K, Zambon MC.** Design and validation of an H5 TaqMan real-time one-step reverse transcription-PCR and confirmatory assays for diagnosis and verification of influenza A virus H5 infections in humans. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1535-43
20. **Falsey AR, Murata Y, Walsh EE.** Impact of rapid diagnosis on management of adults hospitalized with influenza. *Arch Intern Med* 2007; 167:354-60
21. **Torres Rojas G, Goyenechea A, Savon C, Valdes O, Oropesa I.** The incidence of adenoviruses in viral conjunctivitis. *Rev Cubana Med Trop* 1998; 50:182-5