

APORTES VIROLÓGICOS E INMUNOLÓGICOS PARA LA PREVENCIÓN Y EL CONTROL DE LA INFLUENZA EN CUBA

Autoría principal: Alexander Piñón Ramos¹

Otros autores: Belsy Acosta Herrera, Odalys Valdés Ramírez, Mayra Muné Jiménez, Amely Arencibia García, Clara Savón Valdés, Yamila Adams Villalón, Grehete González Muñoz, Suset Oropeza Fernández, Ángel Goyenechea Fernández, Guelsys González Báez, Bárbara Hernández Espinosa, Rosmery Roque Arrieta, Vivian Kourí Cardellá, Yoán Alemán, María Guadalupe Guzmán Tirado y Alina Llop Hernández

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK). Autopista Novia del Mediodía Km 61/2 entre Carretera Central y Autopista Nacional Apdo. postal 601. Marianao 13. Fax. 53 -7 204 6051.

¹**Autor de correspondencia. Correo electrónico:** alexpr@ipk.sld.cu; alexpr@infomed.sld.cu

Lic. Alexander Piñón Ramos (16%). Diseño del estudio, extracción de ácidos nucleicos, RT-RCP para la obtención de productos a secuenciar, purificación de productos para reacción de secuencia, reacción de secuencia y purificación, edición de secuencias, publicación de secuencias en base de datos de genes - GenBank-, análisis filogenéticos y de las secuencias de aminoácidos utilizando herramientas bioinformáticas, cuantificación relativa de componentes de la respuesta inmune (citocinas, quimiocinas y receptores) y análisis estadísticos de los resultados, escritura y revisión de documentos para publicaciones, tesis y eventos.

Dra. Belsy Acosta Herrera (15%). Diseño del estudio, extracción de ácidos nucleicos, RT-RCP para la obtención de productos a secuenciar, purificación de productos para reacción de secuencia, reacción de secuencia y purificación, análisis filogenéticos y de las secuencias de aminoácidos utilizando herramientas bioinformáticas, cuantificación relativa de componentes de la respuesta inmune (citocinas, quimiocinas y receptores) y análisis estadísticos de los resultados, revisión de documentos para publicaciones, tesis y eventos.

Dra. Odalys Valdés Ramírez (15%). Diseño del estudio, extracción de ácidos nucleicos, RT-RCP para la obtención de productos a secuenciar, purificación de productos para reacción de secuencia, reacción de secuencia y purificación, análisis filogenéticos y de las secuencias de aminoácidos utilizando herramientas bioinformáticas, cuantificación relativa de componentes de la respuesta inmune (citocinas, quimiocinas y receptores) y análisis estadísticos de los resultados, revisión de documentos para publicaciones, tesis y eventos.

Dra. Mayra Muné Jiménez (10%). Extracción de ácidos nucleicos, RT-RCP para la obtención de productos a secuenciar, purificación de productos para reacción de secuencia, reacción de secuencia y purificación, análisis filogenéticos y de las secuencias de aminoácidos utilizando herramientas bioinformáticas, cuantificación relativa de componentes de la respuesta inmune (citocinas, quimiocinas y receptores), revisión de documentos para publicaciones, tesis y eventos.

Lic. Amely Arencibia García (10%). Extracción de ácidos nucleicos, RT-RCP para la obtención de productos a secuenciar, purificación de productos para reacción de secuencia, reacción de secuencia y purificación, edición de secuencias, publicación de secuencias en base de datos de genes -GenBank-, análisis filogenéticos y de las secuencias de aminoácidos utilizando herramientas bioinformáticas, revisión de documentos para publicaciones, tesis y eventos.

Dra. Clara Savón Valdés (7%). Revisión de documentos para publicaciones, tesis y eventos.

Dra. Yamila Adams Villalón (7%). Diseño del estudio, extracción de ácidos nucleicos, cuantificación relativa de componentes de la respuesta inmune (citocinas, quimiocinas y receptores) y análisis estadísticos de los resultados, escritura y revisión de documentos para publicaciones, tesis y eventos de esta parte de la investigación.

Dra. Grehete Gonzalez Muñoz (2%). Revisión de documentos para publicaciones, tesis y eventos.

Dra. Suset Oropeza Fernández (2%). Revisión de documentos para publicaciones, tesis y eventos.

Dr. Angel Goyenechea Fernández (2%). Revisión de documentos para publicaciones, tesis y eventos.

Tec. Guelsys Gonzalez Báez (2%). Extracción de ácidos nucleicos, RT-RCP para la obtención de productos a secuenciar, cuantificación relativa de componentes de la respuesta inmune (citocinas, quimiocinas y receptores).

Tec. Bárbara Hernández Espinosa (2%). Extracción de ácidos nucleicos, RT-RCP para la obtención de productos a secuenciar, cuantificación relativa de componentes de la respuesta inmune (citocinas, quimiocinas y receptores).

Tec. Rosmery Roque Arrieta (2%). Extracción de ácidos nucleicos, RT-RCP para la obtención de productos a secuenciar, cuantificación relativa de componentes de la respuesta inmune (citocinas, quimiocinas y receptores).

Dra. Vivian Kourí Cardellá (2%). Aseguramiento científico y técnico para cumplimentar tareas de la estrategia de laboratorio.

Lic. Yoán Alemán (2%). Aseguramiento científico y técnico para cumplimentar tareas de la estrategia de laboratorio.

Dra. Ma. Guadalupe Guzmán Tirado (2%). Aseguramiento científico y técnico para cumplimentar tareas de la estrategia de laboratorio.

Dra. Alina Llop Hernández (2%). Aseguramiento científico y técnico para cumplimentar tareas de la estrategia de laboratorio.

RESUMEN

En Cuba, durante el período 2006-2010 la influenza estacional y la neumonía constituyeron la cuarta causa de muerte, panorama marcado por la detección del virus pandémico influenza A(H1N1)pdm09 en el año 2009. La forma severa de la enfermedad producida por el virus pandémico prevaleció en las personas menores de 55 años de edad a nivel mundial, hecho que hizo pensar en la interacción de factores del virus, de su ecología y del hospedero. Por otro lado, la emergencia de variantes genéticas divergentes de la cepa vacunal y de variantes resistentes a las drogas antivirales, amenazan la efectividad de estas medidas de prevención y control. En este contexto, y en ausencia de estudios previos sobre la caracterización molecular de los virus influenza en nuestro país se desarrolló el presente trabajo. El objetivo fue proporcionar evidencias de la circulación de variantes genéticas de los virus influenza A y B en Cuba durante el período 2006-2010, y de la relación entre la forma severa de la enfermedad producida por algunas variantes con factores del hospedero. Se demostró que los virus influenza A y B estacionales en Cuba evolucionaron hacia diferentes variantes genéticas, algunas de ellas divergentes genéticamente de la cepa vacunal. Se detectó la circulación de diferentes variantes genéticas del virus influenza A(H1N1)pdm09, aunque mantuvieron un porcentaje de similitud genética elevado con la cepa vacunal. Se determinó que los niveles elevados de RANTES y el TLR-2, y la presencia del CCR5 Δ 32, sugieren su participación en la severidad del cuadro clínico producido por el virus pandémico del año 2009. Se evidenció la circulación de variantes de virus influenza A(H3N2) y A(H1N1)pdm09 resistentes a las drogas bloqueadoras del canal M2, y que las variantes resistentes a los antivirales inhibidores de la neuraminidasa emergieron en el subtipo A(H1N1) estacional a partir del año 2008, después de la ganancia de mutaciones permisivas. La caracterización molecular de los virus influenza permitió detectar la emergencia de variantes genéticas de escape a la vacunación y resistentes a las drogas antivirales, y aportó criterios de laboratorio útiles para la actualización de las políticas de control y prevención por parte del MINSAP. Por otro lado, los resultados obtenidos muestran la alternativa de dirigir nuevas formas de terapia hacia las interacciones virus-hospedero.

COMUNICACIÓN CORTA

Introducción

Los virus influenza afectan a las poblaciones humanas desde tiempos muy antiguos, y constituyen tres de los cinco géneros ubicados dentro de la familia Orthomyxoviridae: influenza A, influenza B e influenza C. Solo los virus influenza A y B constituyen motivo de vigilancia a nivel mundial debido a su comportamiento estacional y a las tasas elevadas de morbi-mortalidad que generan. El cuadro clínico producido por estos virus puede transcurrir de forma asintomática, como una enfermedad tipo influenza (ETI), una infección respiratoria aguda grave (IRAG), o incluso evolucionar hasta la muerte. Este comportamiento depende de la interacción de varios factores: virales, del hospedero y ecología del virus.

A nivel mundial, la Influenza causa alrededor de 3.5 millones de casos de IRAG y 500.000 muertes en el año. En Cuba, la Influenza y la neumonía constituyen la cuarta causa de muerte entre todas las causas posibles, y la primera entre las enfermedades infecciosas. El virus influenza A (H1N1)pdm09 fue el responsable de la primera pandemia del siglo XXI durante el año 2009, la cual fue calificada como leve-moderada en términos de morbi-mortalidad. El virus responsable de este evento epidemiológico no presentó los marcadores moleculares de virulencia reconocidos hasta el momento. Sin embargo, la forma más severa de la enfermedad se presentó de forma predominante en las personas menores de 55 años. Todos estos elementos resaltan la necesidad del uso de vacunas y drogas antivirales como medidas fundamentales para la prevención y el control. A pesar de esto, la elevada variabilidad genética y antigénica de los virus influenza posibilita la emergencia de variantes genéticas resistentes a las drogas antivirales y mutantes de escape a los anticuerpos producidos por la vacunación. Por esta razón es necesario mantener la vigilancia de la aparición de estas variantes y revisar las cepas que componen la vacuna anti-influenza cada año, apoyados en los estudios de caracterización antigénica y molecular de los virus circulantes cada temporada.

En todo este contexto y teniendo en cuenta que en Cuba no existen estudios previos de caracterización molecular de los virus influenza, el presente trabajo proporcionará evidencias de la circulación de variantes genéticas de los virus influenza A y B en Cuba durante el período 2006-2010, y de la relación entre la forma severa de la enfermedad producida por algunas variantes con factores del hospedero.

Resultados

El estudio de la primera caracterización genética de los virus influenza A y B circulantes en Cuba, demostró la circulación predominante de variantes genéticas análogas a los linajes incluidos en las vacunas. Sin embargo, otras variantes, particularmente del subtipo A(H1N1) y de los virus influenza B estacionales divergieron de las cepas vacunales. La información derivada de este análisis

constituye una alerta sobre la posible ineficacia de la vacuna, sustentada en la falta de analogía entre las cepas circulantes y las incluidas en la vacuna. Esta alerta resultó importante para el empleo de las drogas antivirales en el control de la Influenza en los grupos de riesgo vacunados.

Otro hallazgo importante fue la detección por primera vez del linaje B/Yamagata/88 de los virus influenza B en Cuba. Este hecho tuvo repercusión sobre la vacunación en su formulación trivalente, debido a que en una misma temporada circularon los dos linajes de los virus influenza B y la población vacunada quedó desprotegida contra uno de ellos. Esto determinó el uso de las drogas antivirales, fundamentalmente para el control de la infección en los grupos de riesgo y evitar la diseminación de los brotes. Otra recomendación pudiera ser la administración de la vacuna tetravalente, la cual incluye los dos linajes de los virus influenza B y los virus vacunales influenza A(H3N2) y A(H1N1).

Dentro del período seleccionado, el virus influenza A(H1N1)pdm09 ocasionó la primera pandemia de influenza del siglo XXI. La vigilancia molecular durante el período inter-pandémico permitió detectar la introducción de esta variante nueva en la población cubana (1-3). Los resultados del análisis molecular demostraron que el grupo genético 7 predominó entre los virus influenza A(H1N1)pdm09 circulantes en Cuba, comportamiento similar a otras regiones del mundo (4, 5). Las mutaciones detectadas fueron similares a las de otras investigaciones, sin embargo, se detectó en Cuba la variante D222E (5) en lugar de la D222G asociada a la severidad de la enfermedad por algunos autores. Este hallazgo, demostró la necesidad de mantener una estricta vigilancia sobre la futura evolución del virus, con el objetivo de poder detectar a tiempo algún cambio relacionado al incremento en su virulencia. La similitud genética entre los virus circulantes y la cepa del virus incluida en la vacuna, contribuyó a la reducción del impacto de la pandemia sobre los grupos de riesgo y la población en general.

La pandemia producida por el virus influenza A(H1N1)pdm09, en Cuba al igual que en otras regiones del mundo, se calificó de leve a moderada en términos de morbi-mortalidad. Sin embargo, entre los meses de abril a diciembre del año 2009 se produjo un incremento en las notificaciones de las IRAG y de los casos fatales, con un predominio de las personas menores de 55 años de edad. El presente estudio permitió determinar la relación de los niveles de expresión del ARN de IL-1 β , IL-8, RANTES y el TLR-2, y la presencia del CCR5 Δ 32, con la severidad de la enfermedad producida por los virus influenza A(H1N1)pdm09 en Cuba.

Los resultados obtenidos demostraron que los niveles elevados de RANTES y el TLR-2 se asociaron significativamente al incremento de la severidad del cuadro clínico producido por el virus pandémico. Otro hallazgo de interés fue que se encontró una relación significativa entre la presencia de la delección 32 del CCR5 y la condición de fallecido en personas con diagnóstico positivo a influenza A(H1N1)pdm09. Estos resultados apoyan las características multifactoriales y complejas de la inmunidad frente a los virus influenza, la cual involucra diferentes

componentes de la respuesta inmune, y que al parecer todas se requieren para lograr la eliminación del virus de forma eficiente. La elevación descontrolada de los niveles de algunos de los elementos de la respuesta inmune demostrada en este trabajo, puede traer consigo un daño inmunopatológico severo y la muerte.

Los resultados aquí expuestos y los obtenidos por otros grupos de investigadores, ofrecen alternativas para futuras intervenciones terapéuticas. Sin embargo, este tipo de terapia se debe realizar con un elevado grado de precisión para equilibrar los efectos positivos y negativos del sistema inmune, en el caso de una infección grave por los virus influenza. Este tipo de estudio, también permitirá establecer marcadores genéticos del hospedero como indicadores de alto riesgo para el desarrollo de la forma severa de la enfermedad producida por los virus influenza. Todo contribuirá a ampliar el espectro de intervenciones sobre la interacción virushospedero, con el objetivo de disminuir las complicaciones de la enfermedad.

A pesar de los avances en el conocimiento sobre los virus influenza y la existencia de Programas Nacionales y Globales para el control, continúan siendo un problema de salud a nivel mundial. El uso de las drogas antivirales durante la infección con los virus influenza constituye la intervención primaria para el tratamiento y la profilaxis post-exposición. Sin embargo, la emergencia de la resistencia a los bloqueadores del canal M2 determinó la eliminación del uso de estas drogas antivirales, mientras que por otro lado emergen variantes resistentes a los antivirales inhibidores de la neuraminidasa. En este contexto se hace más compleja la toma de decisiones para el tratamiento y la profilaxis de esta enfermedad. La presente investigación aportó los primeros resultados sobre los patrones de resistencia frente a las drogas antivirales anti-influenza en Cuba.

El hallazgo más significativo fue la detección de patrones moleculares de resistencia a los bloqueadores del canal M2 y a los inhibidores de la neuraminidasa por primera vez en Cuba. El 100% de los virus influenza A(H3N2) y A(H1N1)pdm09 analizados resultaron resistentes a los bloqueadores del canal M2 y sensibles a los INAs (6).

Estos resultados fueron de gran importancia para los médicos de atención de los distintos niveles del sistema de salud, pues les permitió contar con un elemento de laboratorio para utilizar la droga antiviral efectiva para el tratamiento. Por otro lado, las autoridades del Ministerio de Salud Pública contaron con la información necesaria para actualizar las estrategias de prevención y control durante los brotes y las epidemias ocasionadas por los virus influenza. Ante la no disponibilidad de vacunas y la existencia de resistencia a los bloqueadores del canal M2 de los virus influenza A(H1N1)pdm09, los resultados obtenidos permitieron seleccionar con seguridad a los antivirales INAs como terapia efectiva. Esta intervención fue fundamental en la prevención de las complicaciones de los grupos de riesgo y en el control de los brotes durante la pandemia del año 2009.

Por otro lado, los virus influenza A(H1N1) estacionales resultaron sensibles a los adamantanos, mientras que la resistencia al oseltamivir emergió a partir del año 2008, después de la aparición de mutaciones permisivas desde el año 2007 (6). Las mutaciones permisivas fueron las responsables de la diseminación de la variante resistente al oseltamivir de los virus influenza A(H1N1) estacional en todo el mundo, desplazados de la circulación por el virus influenza pandémico.

Otro resultado del presente trabajo fue la detección de la mutación S162N en la HA de los virus influenza A(H1N1)pdm09 identificados en el último período de la pandemia en Cuba (6). El efecto de este cambio es la compensación de la actividad de la neuraminidasa a través de una eficiencia reducida en la unión de la HA a los receptores celulares. La detección de esta variante es de importancia pues estos virus pueden multiplicarse en presencia de los INAs, y se recomendó mantener bajo estricta vigilancia su evolución.

La caracterización de los patrones de resistencia a las drogas antivirales aporta información útil para la toma de decisiones en las políticas de prevención y control. La emergencia de variantes resistentes a las drogas antivirales en uso, orientan hacia la necesidad urgente de desarrollar tratamientos alternativos contra la influenza, como es el caso del desarrollo de nuevos compuestos antivirales, la posibilidad de hacer diana sobre las interacciones virus-hospedero y los mecanismos celulares del hospedero para desarrollar nuevas formas de terapia contra la influenza.

La caracterización de los principales factores (virus, hospedero, ambiente) que determinan el curso de la infección por los virus influenza y de las epidemias ocasionadas por ellos contribuye a mejorar los Programas para la Prevención y el Control de la Influenza. La caracterización genética de los virus influenza permite detectar el surgimiento y la circulación de variantes nuevas del virus, determinando oportunamente la necesidad de actualizar algún componente de la vacuna o la emergencia de una cepa con potencial pandémico. Además, a través de este tipo de caracterización es posible la identificación de determinantes de virulencia para un mejor entendimiento de los genotipos relacionados a la patogenicidad y de los factores que contribuyen al origen de las pandemias.

Los resultados aquí obtenidos están en correspondencia con el lineamiento 154 del Partido y la Revolución Cubana en materia de salud, dirigido a elevar la calidad del servicio que se brinda y lograr la satisfacción de la población. También se pone de manifiesto el lineamiento 160, debido a que la formación de especialistas médicos permitió darle respuesta a las necesidades del país durante la pandemia de influenza del año 2009 y durante las epidemias estacionales, utilizando tecnología del primer mundo.

Impactos del resultado:

Impacto científico

1. La introducción y sistematización de la caracterización molecular de los virus influenza en el Laboratorio Nacional de Referencia permitió identificar las variantes genéticas circulantes en cada temporada, suministrando evidencias científicas a la Red Global de Influenza de la OMS que garantizan una mejor selección de los virus vacunales anualmente.
2. La detección de la circulación de variantes genéticas de los virus influenza resistentes a las drogas antivirales, aportó criterios científicos que modificaron las estrategias de tratamiento y prevención en el Programa Integral de Atención y Control de las Infecciones Respiratorias Agudas.
3. La caracterización molecular del virus pandémico en Cuba, aportó conocimientos a nivel nacional e internacional sobre la evolución de este virus emergente en la población humana.
4. La relación entre los niveles de expresión elevados de RANTES y el TLR-2 y la presencia de la forma heterocigótica del CCR5 Δ 32 con la severidad de la enfermedad producida por el virus pandémico, aportó nuevos conocimientos sobre la inmunopatogenia de la enfermedad, relacionados a la interacción virus-hospedero.

Impacto social

1. La identificación de variantes de los virus influenza circulantes en el país, permite alertar oportunamente a las autoridades sanitarias para implementar acciones de prevención y control efectivas que posibiliten mitigar el impacto económico de esta infección (uso indiscriminado de antibióticos, gastos en hogares de ancianos, hospitalizaciones, uso de unidades de cuidados intensivos, ausencias escolares, laborales, pago de la seguridad social, entre otras).
2. Los resultados de la detección de variantes genéticas de los virus influenza en Cuba advierte la necesidad de actualizar sistemáticamente las medidas específicas de prevención y el manejo de casos para lograr reducir la morbilidad y la mortalidad.
3. El conocimiento de los marcadores inmunológicos asociados a la severidad de la infección por los virus influenza, posibilita identificar nuevas dianas terapéuticas para evitar las complicaciones asociadas a la infección por estos virus y reducir los niveles de mortalidad.

Referencias bibliográficas

- (1) Acosta B, Piñón A, Valdés O, Savón C, Guzmán MG, Llop A, et al. Contribución del Laboratorio Nacional de Influenza al enfrentamiento de la influenza pandémica 2009 en Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2011;63(1):7-14.
- (2) Valdés O, Piñón A, Acosta B, Savón C, González G, Arencibia A, et al. Diseño y aplicación de un método molecular para el diagnóstico del virus influenza A (H1N1) pandémico en Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2011;63(1):15-20.
- (3) Acosta B, Piñón A, Valdés O, Savón C, Arencibia A, Guilarte E, et al. Rapid Diagnosis of Pandemic (H1N1) 2009 in Cuba. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(2):336-7.
- (4) Piñón A, Acosta B, Valdés O, Arencibia A, Savón C, González G, et al. Estrategia cubana de caracterización molecular del virus influenza A/H1N1pdm. *Rev Cubana Med Trop.* 2011;63(1):21-9.
- (5) Piñón A, Acosta B, Valdés O, Arencibia A, Muné M, Savón C, et al. Molecular and phylogenetic analysis of influenza A H1N1 pandemic viruses in Cuba, May 2009 to August 2010. *Int J Infect Dis.* 2013;17(7):e565-67.
- (6) Piñón A, Acosta B, Valdés O, Pérez A, Mune M, Arencibia A, et al. Adamantane and neuraminidase inhibitor resistance among circulating human influenza A viruses in Cuba during 2006-2010. *Int J Antimicrob Agents.* 2013 Jul;42(1):97-8.