

DETECCIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS DE LOS VIRUS INFLUENZA CIRCULANTES EN CUBA EN EL PERIODO 2011-2013 Y SU IMPACTO EN LA PREVENCIÓN DE LA INFLUENZA.

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

AUTORES PRINCIPALES:

(i) Amely Arencibía García (15%): Diseño de la investigación, procesamiento de los datos, análisis de los resultados y confección de publicaciones. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

(i) Belsy Acosta Herrera (15%): Diseño de la investigación, procesamiento de los datos, análisis de los resultados y redacción de informes de alertas al MINSAP. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

OTROS AUTORES:

(ii) Odalys Valdés Ramírez (12%): Diseño y asesoría de la investigación, procesamiento de muestras y análisis de resultados. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

(ii) Alexander Piñón Ramos (12%) Diseño y asesoría de la investigación, procesamiento de secuencias y análisis de resultados. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

(ii) Clara Savón Valdez (7%): Asesoría de la investigación y análisis de resultados. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

(ii) Leandro Fernández García (7%): Procesamiento de muestras para secuencia y análisis de resultados. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

(ii) Isel Medina Rodríguez (7%): Procesamiento de muestras para secuencia y análisis de resultados. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

(ii) Guelsys González Báez (5%): Entrada y procesamiento de muestras para diagnóstico y secuencia. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

(ii) Mayra Muné Jiménez (3%): Procesamiento de muestras para diagnóstico. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

(ii) Ángel Goyenechea Hernández (2%): Asesoría de la investigación. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (Jubilado).

(ii) Suset Oropesa Hernández (2%): Procesamiento de muestras para diagnóstico. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

(ii) Grehete González Muñoz (2%): Procesamiento de muestras para diagnóstico. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

(ii) Rosmery Roque Arrieta (2%): Procesamiento de muestras para diagnóstico. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

(ii) Bárbara Hernández Espinosa (2%): Procesamiento de muestras para diagnóstico. Instituto

de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

(ii) Susana Borroto (2%): Confección de informes de alertas al MINSAP. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

(ii) María Josefa Llanes Cordero (2%): Confección de informes de alertas al MINSAP. Dirección Nacional de Epidemiología, MINSAP (Jubilada)

(ii) Yudira Soto Brito (2%): Asesoría y confección de informe de resultados Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

(ii) Javier Martínez Alfonso (1%): Procesamiento de muestras para diagnóstico. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:

Amely Arencibía García.

Dirección postal: Autopista Npvia del Mediodía km 61/2. La Lisa. CP 17 100. La Habana, Cuba

Fax: 53 7 2046051

Correo electrónico: amely@ipk.sld.cu

RESUMEN:

La Influenza es una enfermedad infecciosa aguda del tracto respiratorio superior. Los principales agentes etiológicos son los virus influenza A y B que ocasionan epidemias anuales estacionales. Solo los virus influenza A pueden originar pandemias.

En Cuba, las Infecciones Respiratorias Agudas causan un promedio anual de 6 millones de atenciones médicas. La Influenza asociada a neumonía constituye la cuarta causa de muerte en la población

general y la primera entre las enfermedades infecciosas.

La vacunación anual es la principal medida de prevención y control. La efectividad de esta medida depende de un proceso riguroso de selección de las cepas componentes de la vacuna. Aun así, la

presión constante selectiva ejercida por los anticuerpos producidos por el sistema inmunológico sobre

los virus influenza, resulta en la ocurrencia de derivas antigénicas, que en conjunto con los saltos antigénicos, originan cepas antigénicamente nuevas. Para contrarrestar este efecto, todos los años se

reúne en dos ocasiones un panel de expertos de la OMS para actualizar el contenido de la vacuna a

aplicar en una próxima estación para los hemisferios Norte y Sur. Con el objetivo de caracterizar genéticamente los virus influenza circulantes en Cuba en el periodo 2011-2013 y definir su impacto en la efectividad de la vacunación, se seleccionaron 124 muestras clínicas (exudados nasofaríngeos, lavados bronquiales y tejidos de pulmón) positivas a los virus influenza A y B en tres momentos: al inicio, a mediados y al final de cada periodo epidémico.

Se realizó la caracterización genética mediante PCR y secuenciación nucleotídica de la subunidad HA1 del gen de la hemaglutinina. El análisis filogenético correspondientes al subtipo A/H1N1pdm09 de 35 secuencias reveló la circulación de los grupos 3, 6A, 6B, 6C y 7. Se detectaron mutaciones en los sitios antigénicos y en los sitios de unión al receptor del dominio HA1 del gen de la hemaglutinina. Por primera vez en Cuba se identificaron nuevas variantes genéticas circulantes. Todas las secuencias analizadas, correspondientes al subtipo A/H1N1pdm09, estuvieron estrechamente relacionadas con la cepa vacunal A/California/07/2009 propuesta por la OMS para ambos hemisferios con una similitud aminoacídica de un 97,6%.

La comparación y análisis filogenético de 47 secuencias cubanas correspondientes al subtipo A(H3N2)

con la cepa vacunal propuesta para el hemisferio norte A/Perth/16/2009 reveló la circulación de los grupos 3C y 6, con un 96% de similitud aminoacídica. El análisis mostró que 28 del total de secuencias se agruparon en el grupo 3C estrechamente relacionadas con la cepa vacunal A/Victoria/361/2011 propuesta para el hemisferio sur con un 99% de similitud aminoacídica. Se detectaron mutaciones en los sitios antigénicos y fuera de estos sitios. Específicamente el subgrupo

3C se definió por la mutaciones T48I (epítotope E), A198S (epítotope B) y S45N, lo que implicó la adquisición de un nuevo sitio de glicosilación.

El análisis filogenético de 42 secuencias cubanas correspondiente a los virus influenza B evidenció la circulación de ambos linajes de estos virus en el período de estudio. En la etapa 2011-2012 todas las

secuencias estuvieron relacionadas con la cepa vacunal B/Brisbane/60/2008, correspondiente al linaje B/Victoria con una similitud de un 99%. Sin embargo a finales del 2013 se detectó la circulación del linaje B/Yamagata remplazando de la circulación el linaje B/Victoria. Las secuencias cubanas fueron

genéticamente divergentes de la cepa vacunal B/Brisbane/60/2008 recomendada por la OMS para el hemisferio norte en la etapa analizada y que fue aplicada en nuestro país. Las secuencias cubanas

circulantes mostraron además tres mutaciones en sitios antigénicos de la hemaglutinina, relacionados con la unión al receptor y con la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes.

En la presente investigación se detectó la circulación de variantes genéticas de virus influenza A

(H1N1pdm09), A(H3N2) y virus influenza B, algunas de ellas diferentes de la cepa vacunal empleada en nuestro país. Se demostró la introducción en la circulación del linaje B/Yamagata que no formaba parte de la vacuna aplicada en Cuba. Los resultados aportan evidencias científicas que permitieron sugerir un cambio en la estrategia de vacunación para Cuba adoptándose el esquema empleado para el hemisferio Sur así como el análisis de la adquisición de la vacuna en su formulación tetravalente con vistas a lograr una mayor efectividad de la misma con el consiguiente impacto para reducir los índices de morbilidad y mortalidad por Influenza.

COMUNICACIÓN CORTA

Introducción

La Influenza es considerada la más contagiosa de las IRAs y el agente etiológico más común son los virus Influenza. Estos virus se caracterizan por su gran variabilidad antigénica y genética, propiedad que garantiza su continua circulación en la población humana y hacen su comportamiento impredecible. La variabilidad de los virus influenza se debe a cambios antigénicos que afectan a las proteínas superficiales del virus (Hemaglutinina y Neuraminidasa). Cuando las nuevas variantes son introducidas en la población que no posee inmunidad por infecciones naturales o por vacunas pueden originarse epidemias mayores o pandemias por la susceptibilidad a la nueva variante establecida (1,2).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) creó hace 65 años el Programa Global de Vigilancia de Influenza que ha contribuido al conocimiento y el entendimiento de la epidemiología de estos virus y anualmente ofrece las formulaciones actualizadas de la vacuna contra este virus para cada temporada. A partir del 2010 se produce una formulación trivalente que contiene cepas representativas de los virus influenza A(H1pdm09) y A(H3N2) y una cepa de uno de los linajes conocidos para los virus influenza B (B/Victoria o B/Yamagata) y una tetravalente compuesta por cepas representativas de los dos subtipos de virus influenza A y de los dos linajes de virus influenza B (3,4).

En Cuba, la influenza asociada a neumonía se ha mantenido entre el cuarto y quinto lugar entre las principales causas de mortalidad general desde 1984. En el año 2000 el Ministerio de Salud Pública aprobó y puso en vigor el Programa Nacional Integral de Prevención y Control de las IRAs que plantea como objetivo fundamental reducir la mortalidad y la morbilidad por IRA en la población cubana (5). Este Programa prioriza la vacunación anual anti-influenza usando la vacuna trivalente para el hemisferio Norte en grupos de riesgo establecidos desde el año 2000. En el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK) se localiza el Centro Nacional de Influenza reconocido por la OMS como Laboratorio de Referencia quien está responsabilizado con la vigilancia de laboratorio de los virus influenza.

Los avances en la biología molecular han revolucionado a las ciencias biológicas y se aplican a los estudios de los virus influenza. Se emplean entre otras cosas, para tratar de dilucidar las causas de las frecuentes y a menudos letales epidemias por virus influenza. El análisis molecular de los cambios en la secuencia nucleotídica en los genes de los virus Influenza mediante secuenciación de ácidos nucleicos es una poderosa herramienta para determinar la extensión y la naturaleza de la variación genómica. A nivel mundial estos estudios son de extraordinaria importancia a la hora de determinar los componentes de una vacuna anti-influenza y de vigilar la emergencia de variantes genéticas. Al mismo tiempo, constituyen aportes al conocimiento al proporcionar un basamento científico sólido a los esfuerzos que se realizan por las autoridades de salud para la selección y la adquisición anual de la formulación idónea de dicha vacuna (3,6). Considerando estos antecedentes la presente investigación se propuso como objetivo caracterizar genéticamente los virus influenza circulantes en Cuba en el período 2011-2013 y definir su impacto en la efectividad de la vacunación.

Resultados

Se obtuvieron un total de 35 secuencias de virus influenza A (H1N1)pdm09. El análisis filogenético mostró que las cepas circulantes correspondientes al subtipo A/H1N1pdm09 pertenecieron a los grupos 3, 6A, 6B y 7. Se detectaron mutaciones en los sitios antigénicos y en los sitios de unión al receptor del dominio HA1 del gen de la hemaglutinina. Las mutaciones identificadas fueron: S174P, S179N, K180Q, S202T, S220T y R222K. Las variantes genéticas

con las mutaciones S174P, S179N, K180Q y R222K fueron detectadas circulando en Cuba por primera vez. Todas las secuencias analizadas, correspondientes al subtipo A/H1N1pdm09, estuvieron estrechamente relacionadas con la cepa vacunal A/California/07/2009 que formó parte de la composición de la vacuna para ambos hemisferios aplicada en las temporadas 2011-2012 y 2012-2013 con una similitud aminoacídica de un 97,6%.

A partir de 47 muestras positivas a virus influenza A (H3N2) se obtuvieron secuencias de calidad. Se detectó la presencia de mutaciones en las secuencias analizadas pertenecientes al subtipo A(H3N2) que circularon en el periodo 2011-2013. Las mismas se correspondieron con la cepa vacunal A/Perth/16/2009 que formó parte de la composición de la vacuna para el hemisferio Sur y con el grupo genético A/Victoria/361/2011 (grupos 6 y 3), con una similitud aminoacídica de 96–99,1% y 97,4–97,3%, respectivamente.

Cuando se compararon las secuencias cubanas con la cepa vacunal se detectaron 5 mutaciones en los sitios antigénicos para las secuencias del grupo 6, que circularon específicamente en el periodo

2011-2012. Estas mutaciones fueron: D53N y E280A (epítotope C), Y94H (epítotope E), I230V (epítotope D) y S199A (fuera del sitio antigénico). Las mutaciones que ocurren fuera de los sitios antigénicos pueden influenciar de manera indirecta en la capacidad antigénica de la hemaglutinina, lo cual constituye un mecanismo para la evolución de nuevas variantes virales.

Las secuencias cubanas de virus influenza A (H3N2) que circularon particularmente en el período

2012-2013, pertenecieron al grupo 3, específicamente a los subgrupos 3C.2 y 3C.3.

Las secuencias incluidas en el grupo 3 se caracterizaron por presentar las mutaciones N145S (epítotope A) y V223I (epítotope D). Específicamente el subgrupo 3C se definió por las mutaciones T48I (epítotope E), A198S (epítotope B) y S45N, lo que implicó la adquisición de un nuevo sitio de glicosilación. La N-glicosilación es una de las formas más comunes de modificación de las proteínas y ocurre en las etapas tempranas de la síntesis proteica. Los virus utilizan este proceso de las células del hospedero para modificar las proteínas presentes en su superficie, lo que repercute sobre la estabilidad de las glicoproteínas virales, su antigenicidad y función durante la invasión de la célula hospedera, particularmente puede tener un impacto importante en la supervivencia y transmisibilidad del virus.

De manera general, cuando se compararon las secuencias cubanas con las cepas vacunales y de referencia, todas las secuencias presentaron 4 mutaciones en 3 sitios antigénicos importantes y se agruparon con cepas que circularon en el hemisferio Sur.

Pertenecientes a virus influenza B, se analizaron un total de 42 secuencias. En el período 2011-2012 todas las secuencias de las cepas circulantes estudiadas estuvieron relacionadas con la cepa vacunal B/Brisbane/60/2008, correspondiente al linaje B/Victoria con una similitud de un 99%. En el lazo 120, sitio crucial para la antigenicidad viral por estar sujeto a una fuerte presión selectiva, se detectó la mutación H137Q.

A finales del 2013 se detectó la circulación del linaje B/Yamagata que no resultaba identificado desde temporadas previas al 2005. El mismo reemplazó de la circulación el linaje B/Victoria y una alerta temprana a las autoridades de salud fue realizada por el Centro Nacional de Influenza por el posible incremento en los índices de morbilidad. Las secuencias cubanas de los virus influenza B pertenecientes al linaje B/Yamagata que circularon en el 2013 fueron genéticamente divergentes de la cepa vacunal B/Wisconsin/01/2010 recomendada por la OMS

para el hemisferio norte en la etapa analizada y que fue aplicada en nuestro país (figura 1). Las secuencias cubanas circulantes mostraron además tres mutaciones en sitios antigénicos de la hemaglutinina, relacionados con la unión al receptor y con la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes (Tabla 1).

En resumen, en el período de estudio se confirmó la circulación de variantes genéticas de los virus influenza A(H1N1pdm09) no detectadas previamente. Los virus influenza A (H3N2) caracterizados fueron diferentes de la cepa vacunal empleada en nuestro país y presentaron mayores porcentos de similitud aminoacídica con virus circulantes en el hemisferio Sur lo que repercutió en la efectividad de la vacuna. Además la caracterización filogenética de los virus influenza B demostró la introducción en la circulación del linaje B/Yamagata que no formaba parte de la vacuna aplicada en Cuba y se asoció con incremento de la morbilidad y cuadros de miositis aguda en pacientes pediátricos. Los resultados constituyeron evidencias científicas que permitieron sugerir al Programa Nacional Integral de Prevención y Control de las IRAs un cambio en la estrategia de vacunación para la adopción de la vacuna empleada para el hemisferio Sur. Al mismo tiempo, estos resultados de la vigilancia molecular de laboratorio que se presentan han sido determinantes para el seguimiento de la evolución de los virus influenza, para proporcionar información al Programa Global de Vigilancia de la OMS para la selección adecuada de las cepas vacunales y detectar oportunamente la circulación de variantes genéticas.

REFERENCIAS

- 1- Cox, N.J., Subbarao, K. Global epidemiology of influenza: past and present. .Annu. Rev. Med. 2000, 51, 407–421.
- 2- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Y K. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev 1992;56:152–179.
- 3- WHO Interim Global Epidemiological Surveillance Standars for Influenza. 2012;http://www.who.int/influenza/resources/documents/who_globalsurveillance_manualoninfluenza_2012_0721/en/index.html
- 4- 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.
- 5- Programa Integral de Prevención y Control de las IRA. Ministerio de Salud Pública. República de Cuba. 2000.
- 6- Rambaut, A., Pybus, O.G., Nelson, M.I., Viboud, C., Taubenberger, J.K., Holmes, E.C.,. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. Nature 2008;453: 615–619

IMPACTO CIENTÍFICO-SOCIAL

-Se detectaron oportunamente nuevas variantes genéticas de virus influenza A circulantes en el país durante el período 2011-2013 con potencial para causar variaciones en las características clínicas y epidemiológicas de estos virus y por consiguiente causar impacto sanitario.

Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba Vol. 8 No. 1

-Los resultados obtenidos sobre la circulación de variantes genéticas aportaron información científica para alertar tempranamente a las autoridades de salud permitiéndoles la implementación temprana de acciones para reducir la morbilidad y mortalidad atribuibles a las variantes circulantes.

-A partir de los análisis filogenéticos de los virus influenza A y B obtenidos se aportaron evidencias de la menor similitud genética de los virus circulantes con los virus vacunales empleados en nuestro país lo que impactó sobre la efectividad de la vacuna estacional y permitió preparar al sistema de salud para minimizar sus consecuencias.

-La identificación de la circulación de virus divergentes de los que formaron parte de la vacuna estacional empleada en el país permitió sugerir modificaciones en la estrategia nacional de Prevención y Control mediante inmunización.

-Esta investigación enfatiza la importancia de nuestro sistema de vigilancia sostenible basado en técnicas moleculares que permita la detección oportuna de virus influenza emergentes y el aporte de información al Programa Global de Vigilancia de la Influenza de la OMS para la selección anual apropiada de las cepas componentes de la vacuna para ambos hemisferios.