REVISTA
PARAGUAYA DE
EPIDEMIOLOGÍA

Original

Vigilancia virológica de Influenza y otros virus respiratorios durante el periodo post-pandémico 2010-2011 en Paraguay

Vazquez C .[1], Gamarra M.[1], Villalba S.[1], Bobadilla M.[1], Ortega M.[1], Oviedo A.[1], Arellano C.[1], Paredes W.[1], Oviedo E.[1], Figueredo S.[1], Ramirez L.[1], Torales J.[1], Fariña H.[1], Cabello M.[2]

[1] Departamento de Virología. Laboratorio Central de Salud Pública. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social.
[2] Dirección General de Vigilancia de la Salud. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social

RESUMEN

En el año 2009, la circulación de una cepa triple resultante de Influenza A H1N1 2009, desplazó a las previamente circulantes, observándose un cambio en el rango etario de infección. Después de que la OMS declaró el término de la fase 6 de Alerta Pandémica, y el paso al Periodo Post-pandémico, señaló la importancia de continuar monitoreando el comportamiento del virus influenza. El LCSP, como CNI de Paraguay, se ha esforzado en cumplir a cabalidad su Rol en la Vigilancia Virológica de Influenza, con el objetivo de caracterizar virológicamente los virus influenza y describir su comportamiento, y el de otros virus respiratorios circulantes en el Paraguay. Para ello fueron estudiadas 7533 muestras respiratorias de pacientes con sospecha de ETI o IRAG durante el año 2010-2011, tomadas por los Centros Centinela de Vigilancia de Influenza y Hospitales Vigilantes de IRAG y enviadas al LCSP para la detección de Influenza tipo A y B por técnicas de RT-PCR en Tiempo Real, y de los otros virus respiratorios (PIV, VSR, AdV) por la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta y aislamiento en cultivos celulares. Entre los positivos, el 7,5% (145) correspondió a FluA/H1N12009; 42 % (806) a FluA/H3; 0,6% (12) a FluA no sub tipificada; 7,5% (145) a FluB, 32 % (626) a VRS, 3,6% (70) a AdV, y 7% (134) a PIV. El virus influenza AH1N1 2009 circuló en proporción moderada durante el año 2010 y Los signos y síntomas más frecuentes en los casos positivos fueron fiebre, tos, dolor de garganta y obstrucción nasal

Palabras claves: Vigilancia centinela, virología, Influenza humana, Paraguay.

ABSTRACT

Virological surveillance of Influenza and other respiratory viruses during the post-pandemic period 2010-2011 in Paraguay

In 2009, the circulation of a triple strain resulting from Influenza A H1N1 2009, displaced the previously circulating, observing a change in the age range of infection. After the WHO declared the end of phase 6 of Pandemic Alert, and the transition to the Post-pandemic Period, it pointed out the importance of continuing to monitor the behavior of the influenza virus. The LCSP, like the CNI of Paraguay, has endeavored to fully fulfill its role in the Virologically Surveillance for Influenza, with the objective of virologically characterizing influenza viruses and describing their behavior, and that of other circulating respiratory viruses in Paraguay. For this, 7533 respiratory samples of patients with suspected TSI or IRAG were studied during the year 2010-2011, taken by the Sentinel Centers for Influenza Surveillance and IRAG Surveillance Hospitals and sent to the LCSP for the detection of Influenza type A and B by Real-time RT-PCR techniques, and the other respiratory viruses (PIV, VSR, AdV) by the technique of Indirect Immunofluorescence and isolation in cell cultures. Among the positive ones, 7.5% (145) corresponded to FluA / H1N12009; 42% (806) at FluA / H3; 0.6% (12) to non-subtyped FluA; 7.5% (145) at FluB, 32% (626) at VRS, 3.6% (70) at AdV, and 7% (134) at PIV. The 2009 AH1N1 influenza virus circulated in a moderate proportion during 2010 and the most frequent signs and symptoms in positive cases were fever, cough, sore throat and nasal obstruction

Keywords: Sentinel Surveillance, virology, Human influenza, Paraguay.

Autor para correspondencia:
Dra. Cynthia Vázquez. Laboratorio Central de Salud Pública y Bienestar Social.
Correo electrónico: cynthiavlm@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

La vigilancia virológica de agentes responsables de Infecciones Respiratorias Agudas (IRAs), permite conocer la frecuencia y distribución de los principales virus respiratorios circulantes, la sub tipificación y caracterización de los virus influenza y características de la población afectada, para la adopción de medidas de prevención, detección y caracterización de brotes, así como la adopción de medidas de control de salud pública.

Los Centros Nacionales de Influenza (CNI) son la espina dorsal de la Red Mundial para la Vigilancia de la Influenza de la OMS, que trabaja para proteger la salud pública mundial actualizando las composiciones de la vacuna contra la influenza estacional, y funcionando como un mecanismo de alerta mundial para la aparición de los virus de la influenza con potencial pandémico, apoyando las recomendaciones de la OMS para vigilancia y vacuna, haciendo una enorme contribución al conocimiento de la epidemiología de la influenza[1].

En el año 2009, la circulación de una cepa triple resultante de Influenza A (FluA/H1N1 2009), desplazó a las previamente circulantes, observándose un cambio en el rango etario de infección, siendo más prevalente que lo usual en adultos jóvenes 2. El 10 de agosto del 2010, la OMS declaró el término de la fase 6 de Alerta Pandémica, y el paso al Periodo Post-pandémico 3. Señalaron que se esperaba que el virus de la influenza A/H1N1 2009 se comportara, en adelante como un virus estacional, que continuaría circulando en los próximos años, con brotes localizados de distinta magnitud. Sin embargo, así como las pandemias, al igual que los virus que las causan, son impredecibles, también lo es el periodo post-pandémico inmediato, con la probabilidad de que el virus siguiera provocando una grave morbilidad entre los grupos que durante la pandemia habían sido considerados como de mayor riesgo de sufrir afecciones graves o mortales 5-8. Por tal motivo resulta extremadamente importante la vigilancia continua según las recomendaciones específicas para este periodo. Además, en una pequeña proporción de las personas infectadas durante la pandemia, incluidos jóvenes en buen estado de salud, cursó una forma grave de neumonía viral primaria que no suele observarse durante las epidemias estacionales y que se muestra particularmente rebelde al tratamiento 9. La incertidumbre de si esa pauta cambiaría durante el periodo post-pandémico, no hace sino subrayar la necesidad de mantener sensible la vigilancia.

El Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP), como CNI de Paraguay, se ha esforzado en cumplir a cabalidad su Rol en la Vigilancia Virológica de Influenza y otros virus respiratorios durante los periodos pandémico y post-pandémico.

OBJETIVO

Caracterizar virológicamente los virus influenza y describir su comportamiento, y el de otros virus respiratorios circulantes en el Paraguay durante el periodo post-pandémico 2010-2011.

MATERIALES Y METODOS

Población estudiada: Fueron incluidos 7553 pacientes con sospecha de Enfermedad tipo Influenza (ETI) o Infección Respiratoria Aguda Grave (IRAG) según definiciones de casos del Protocolo Genérico de la OMS 10, que acudieron a los servicios de los Centros Centinela de Vigilancia de Influenza y Hospitales Vigilantes de IRAG, y cuyos especímenes clínicos fueron recibidos y estudiados en el LCSP, desde enero de 2010 a setiembre de 2011.

Tipo de estudio: Fue realizado un estudio retrospectivo observacional descriptivo de corte transverso.

Colecta de Muestras: Muestras de hisopado nasal y faríngeo, fueron recolectados en medio de transporte viral comercial, conservados a 4ºC y remitidas en forma refrigerada al LCSP dentro de las 72 horas después de su recolección. En pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos, se recolectaron otros tipos de muestras como: aspirados nasofaríngeos, aspirados traqueales, y lavados bronquioalveolares. Posteriormente, estas muestras son fraccionadas en alícuotas para la realización de Inmunofluorescencia, cultivo celular y pruebas moleculares.

Extracción de ARN viral: el ARN viral fue extraído a partir de la suspensión de cada muestra clínica, utilizándose el reactivo TRIZOL Reagent (Invitrogen-Life Tecnologies), para ello se ha adicionado 120µL de muestra a 375 µL de trizol. Esta suspensión, después de un periodo de incubación a temperatura ambiente fue centrifugada a 12000 rpm a 4˚C, durante 10 minutos. Luego, se adicionaron 100 µL de cloroformo (Sigma-Aldrich®) para la separación de fases y se sometió a una segunda incubación y centrifugación para la precipitación del ARN viral. En la siguiente etapa fue desechada la fase acuosa y se adicionó 1mL de etanol al 75%, se mezcló y centrifugó nuevamente a 12000 rpm a 4˚C, durante 5 minutos. Finalmente, después de eliminar el etanol residual se dejó secar el precipitado y se resuspendió el material seco con 50 µL de agua libre de RNAsas.

Diagnóstico Molecular de Influenza: La detección de influenza tipo A y B (IAV e IBV); y la subtipificación de las muestras positivas para IAV, fueron realizadas siguiendo el protocolo no publicado de Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la polimerasa en Tiempo

Real (qRT-PCR) de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades Atlanta/GA/USA (CDC), para los virus estacionales (A/H1, A/H3); y el protocolo publicado por CDC en abril del 2009 para el virus pandémico A/H1 2009 16. Fue utilizado un termociclador StepOne de Applied Biosystems.

Detección de Virus Respiratorios por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI): Se realizó mediante la detección de antígenos de virus parainfluenza 1/2/3 (PIV), virus respiratorio sincicial (VRS) y adenovirus (AdV) en las secreciones respiratorias por la técnica de inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos monoclonales específicos disponibles comercialmente (Respiratory Panel, Milipore, USA). La lectura se realizó con microscopio de epi-iluminación Nikkon con lámpara de halógeno, y se consideró un resultado positivo cuando se observaron por lo menos 2 células con inclusiones fluorescentes características en todo el pocillo 17, 18.

Aislamiento de virus influenza en cultivos celulares: Fueron inoculadas 200µL de las muestras en la línea Celular Madin-Darby Canine Kidney cells (MDCK), ATCC CCL34, con medio esencial mínimo (MEM) suplementado con albúmina al 0,2% y tripsina al 1%. Fueron luego incubadas a 37ºC por 7 días en incubadora con intercambio de CO2. El aislamiento fue confirmado por Inhibición de la Hemaglutinación con glóbulos rojos de pavo y por Inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos.

Caracterización antigénica de influenza: Fue realizada por la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación, enfrentando los aislados virales con antisueros específicos contra las variantes antigénicas semejantes a las contenidas en las últimas fórmulas vacunales.

Determinación de la Susceptibilidad de cepas de influenza a antivirales: Fue realizado en CDC mediante ensayos de inhibición de neuraminidasa y secuenciación nucleotídica para la detección del gen de resistencia a los inhibidores de la neuraminidasa

Datos clínico-epidemiológicos: Fueron obtenidos mediante el llenado por el médico tratante, de un formulario con datos demográficos (edad, sexo y procedencia del paciente), servicio de consulta, fechas de inicio de los síntomas y de toma de muestra, tipo de muestra recolectada, signos/síntomas clínicos y sospecha diagnóstica del médico tratante.

Análisis estadístico: Los resultados obtenidos y los datos de las fichas clínico-epidemiológicas fueron cargados en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel. Posteriormente fueron analizados con herramientas de Estadística Descriptiva y fue aplicado el test de chi-cuadrado para análisis de significancia estadística en cuanto características clínicas e internación asociados a los virus investigados, considerando estadísticamente significante un valor P igual o menor que 0,05.

RESULTADOS

De enero de 2010 a setiembre del 2011, un total de 7553 especímenes respiratorios fueron testados para la detección de influenza y otros virus respiratorios comunes, resultando el 35% (1938) de ellos positivos para al menos uno de los virus investigados. Entre los positivos, el 7,5% (145) correspondió a FluA/H1N12009; 42 % (806) a FluA/H3; 0,6% (12) a FluA no subtipificada; 7,5% (145) a FluB, 32 % (626) a VRS, 3,6% (70) a AdV, y 7% (134) a PIV.

Se logró aislar en cultivos celulares 40 cepas de Influenza A y 5 de Influenza B, de 195 muestras inoculadas en total. Los aislados fueron enviados al CDC para la caracterización molecular y antigénica; y determinación de susceptibilidad a antivirales, los resultados se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización antigénica y susceptibilidad a antivirales de virus influenza circulantes en Paraguay 2010-2011

Tipo / Subtipo	Variante	Susceptibilidad a antivirales
A/H3N2	A/PERTH/16/2009-LIKE *	Sensibles a Oseltamivir y Zanamivir
A/H1N1 2009	A/CALIFORNIA/07/2009*	Sensibles a Oseltamivir y Zanamivir
B	B/YAMAGATA/16/88 LINEAGE	Sensibles a Oseltamivir y Zanamivir

*Cepa recomendada para la formulación vacunal 2011 y 2012 del hemisferio sur.

La etiología viral en función a las semanas epidemiológicas (SE), se muestra en la figura 1. El virus influenza AH1N1 2009 circuló en proporción moderada durante el año 2010 con picos de detección entre las SE 27 a 40, lo que corresponde a invierno y primavera. Sin embargo, en el 2011 prácticamente no fue detectada la circulación del virus pandémico, con un solo caso aislado en la SE 5. Fue detectado un brote inusual de FluA/H3 entre las semanas 41 del 2010 y 4 del 2011, con pico en la SE 1 del año 2011, coincidiendo con meses cálidos al final de la primavera e inicio del verano. La mayor parte de los virus de influenza B circularon en el invierno e inicio de

la primavera del año 2010 entre las semanas 25 y 41, mientras que en el año 2011 la detección de este virus fue escasa. Se observaron picos de detección de VRS en el otoño de los años estudiados, aunque fue detectado en forma sostenida durante casi todos los meses del año. Los virus PIV fueron detectados regularmente sin un patrón estacional bien definido durante el periodo de estudio, al igual que los AdV, aunque estos últimos en una proporción mucho menor.

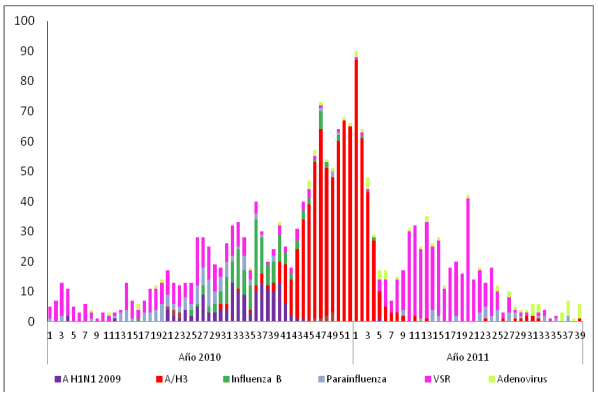

Figura 1. Frecuencia de agentes virales por semana epidemiológica. Paraguay. Años 2010-2011

La distribución de los casos positivos por edad se muestra en la figura 2; la mayor detección viral se observó en el grupo de menores de 2 años. El virus FluA/H3 fue el más frecuente en todos los grupos de edades, excepto en los menores de 2 años, en quienes predominó el VRS.

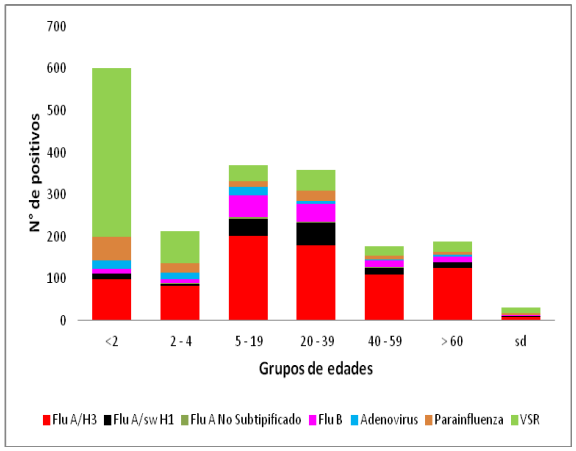

Figura 2. Distribución de agentes virales detectados por grupos de edades. Paraguay 2010-2011

Los signos y síntomas más frecuentes en los casos positivos fueron fiebre, tos, dolor de garganta y obstrucción nasal, mientras que la complicación clínica más reportada fue la neumonía. Los datos se resumen en la Tabla1. La disnea estuvo significativamente asociada al virus pandémico FluA/H1N12009 (p <0,5), ningún otro síntoma o complicación clínica se asoció significativamente a la positividad de algún agente en particular.

En 4.049 pacientes obtuvimos datos de internación o cuidados ambulatorios, en la tabla 3 se muestra la comparación entre pacientes ambulatorios e internados con respecto a la detección de virus. No se encontró asociación significativa de la internación con ningún virus detectado, en el grupo de pacientes analizados.

Tabla 2. Características clínicas por agente viral detectado. Paraguay. 2010-2011

Variables	Agente viral					
	FluA/ H3	FluA/ H1	FluB	VSR	PIV	AdV
	n = 806 %	n = 145 %	n = 145 %	n = 626 %	n = 134 %	n = 70 %
Signos/síntomas						
Fiebre	99	76	77	33	43	29
Tos	52	64	58	27	29	25
Dolor de garganta	42	45	45	12	14	10
Mialgia	35	43	37	8	33	19
Obstrucción nasal	34	43	39	21	4	4
Dolor de oído	8	8	10	3	17	3
Disnea	5	28	10	10	3	1
Diarrea	4	4	3	2	-	11
Complicaciones						
Neumonía	20	11	11	14	13	0
Bronquitis	1	1	0	7	6	3

Tabla 3: Comparación entre pacientes ambulatorios e internados con respecto a la detección de virus.

Virus	Ambulatorio	Hospitalizados	TOTAL
	n (%)	n (%)	
FluA/H3	444 (59)	308 (41)	752
FluA/H1N1 (2009)	46 (47)	52 (53)	98
FluB	59 (63)	35 (37)	94
VRS	112 (40)	171 (60)	283
PIV	41 (54)	35 (46)	76
AdV	9 (38)	15 (63)	24

DISCUSIÓN

En las últimas décadas, la influenza epidémica y pandémica ha sido responsable de causar enfermedad ampliamente extendida, trastornos económicos y pérdidas de vidas humanas en todo el mundo 14-15. Mientras que la recurrencia de la influenza estacional se espera cada año, sigue siendo difícil predecir las cepas estacionales predominantes y es imposible saber cuándo y dónde surgirá la próxima pandemia humana. El monitoreo regional oportuno de la circulación de los virus influenza es una prioridad para la vigilancia estacional y detección oportuna de cepas con potencial pandémico[16].

En el presente trabajo reportamos las características y el comportamiento de los virus influenza y otros virus respiratorios que circularon en el Paraguay en el periodo post-pandémico 2010-2011. Hemos recibido y analizado un elevado número de muestras, probablemente debido a la sensibilización del sistema de salud ante la reciente pandemia del año 2009. La amplitud de la población estudiada, a lo largo de casi dos años de vigilancia, proporciona información valiosa acerca de las características y comportamiento de los virus investigados. Este hecho nos permitió detectar un importante brote de Influenza A/H3, en un periodo de tiempo inusual, durante el verano 2010-2011, que según la Dirección General de Vigilancia de la Salud (DGVS parte semanal de influenza), incluso fue responsable de un considerable número de muertes.

En el periodo de tiempo estudiado, IAV continúo siendo el virus respiratorio más frecuentemente encontrado al igual que en la pandemia, a diferencia de años previos cuando predominaba el VRS, aunque este último permaneció en mayor proporción en los pacientes menores de 2 años.

El aislamiento y caracterización de los virus influenza circulantes localmente, proveyó información oportuna para ser incluida en la formulación vacunal del hemisferio sur, lo cual incide en la prevención de epidemias y muertes.

No hemos constatado una diferencia significativa entre el número de pacientes hospitalizados y ambulatorios, afectados por el panel de virus investigado. De igual modo no se han encontrado características clínicas o complicaciones asociadas a algún virus en particular, aunque solo nos limitamos a analizar los datos consignados por los médicos tratantes, y no desconocemos que se requiere un trabajo conjunto y un monitoreo más cercano para llegar a conclusiones relevantes en el ámbito clínico.

Describimos también, la estacionalidad de otros virus respiratorios durante el periodo estudiado, así el VRS predominó en el otoño de ambos años, mientras que el IBV cocirculó con el virus pandémico AH12009 durante el invierno del 2011. Sin embargo, debemos considerar que, en el periodo post-pandémico, la estacionalidad de la mayoría de los virus aún se encuentra algo desplazada debido al efecto pandémico.

La evaluación clínico-epidemiológica rápida de la morbilidad y la mortalidad relacionados con influenza sigue siendo un reto para la salud pública debido a los síntomas no específicos, la dificultad en la obtención continua y representativa de datos, y en la confirmación de laboratorio en forma masiva. Por lo tanto, los datos resultantes del análisis de un importante número de pacientes, podrían orientar en las intervenciones en salud pública y asistencia sanitaria.

BIBLIOGRAFÍA

1. El rol de los Centros Nacionales de Influenza (CNI) durante Períodos Interpandémicos, de Alerta Pandémica y Pandémicos. Documento Interino, Mayo de 2007. OPS/OMS. http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/vir-flu-nics.pdf

2. Carcione D, Giele C, Dowse G, Mak D, Goggin L, Kwan K, Williams S, Smith D, and Effler P. Comparison of Pandemic (H1N1) 2009 and Seasonal Influenza, Western Australia, 2009. Emerging Infectious Diseases. www.cdc.gov/eid. Vol. 16, No. 9, September 2010

3. www.who.int/entity/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/es/

4. World Health Organization. Clinical features of severe cases of pandemic influenza [cited 2010 Jan 17]. http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/h1n1_clinical_features_20091016/en/index.html.

5. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Bridges CB, Cox NJ, et al. Infl uenza-associated hospitalizations in the United States. JAMA. 2004;292:1333–40. DOI: 10.1001/jama.292.11.1333

6. Louie JK, Acosta M, Jamieson DJ, Honein MA, California Pandemic (H1N1) Working Group. Severe 2009 H1N1 infl uenza in pregnant and postpartum women in California. lifornia. N Engl J Med. 2010;362:27–35. DOI: 10.1056
NEJMoa0910444

7. Centers for Disease Control and Prevention. Hospitalized patients with novel infl uenza A (H1N1) virus infection-California, April– May, 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2009;58:536–41.

8. Centers for Disease Control and Prevention. Intensi-

ve-care patients with severe novel infl uenza A (H1N1) virus infection—Michigan, June 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2009;58:749–52.

9. Chowell G, Bertozzi SM, Colchero MA, Lopez-Gatall H, Alpuche- Aranda C, Hernandez M, et al. Severe respiratory disease concurrent with the circulation of H1N1 infl uenza. N Engl J Med. 2009;361:674–9. DOI: 10.1056/NEJMoa0904023

10. OPS-CDC. Protocolo genérico para la vigilancia de la influenzawww.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/flu-snl-gpis.pdf

11. CDC protocol of real time RT-PCR for influenza A (H1N1). www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptpcr/en/index.html

12. Kendal AP, Pereira MS, Skehel J 1982. Immunofluorescence Assay. Concepts and procedures for laboratory based influenza surveillance. Centers for Disease Control and Organización Sanitaria Panamericana; B 59-63.

13. Ray CG and Minnich LL 1987. Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses. J Clin Microbiol; 25(2): 355-7

14. Glezen WP (1996) Emerging Infections: Pandemic influenza. Epidemiol Rev 18: 64–76.

15. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M (2003) Influenza. Lancet 362: 1733–1745.

16. Palese P (2004) Influenza: Old and new threats. Nat Med 10: S82–87. US Department of Health and Human Services (2006) HHS pandemic influenza preparedness plan. Available: http://www.hhs.gov/pandemicflu/ plan/.