



# CONTRIBUCIÓN DEL LABORATORIO A LA VIGILANCIA CENTINELA DE LOS VIRUS RESPIRATORIOS EN EL PERIODO PRE PANDÉMICO MARZO-DICIEMBRE 2019

María de Lourdes Sánchez Alvarez<sup>1</sup> - Edenis García Alvarez<sup>1</sup> - Adrian Fernández García<sup>1</sup> - Rafael Abreu Duarte<sup>1</sup> - Regla Poveda Rodríguez<sup>1</sup> - Hilda Dolores Roque de Escobar<sup>1</sup> - Javier Martínez Alfonso<sup>2</sup>

1 Centro Provincial de Higiene y Epidemiología, Laboratorio de Biología Molecular, Santa Clara, Cuba,  
2 Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Laboratorio virus respiratorios, Habana, Cuba  
mlourdessa@infomed.sld.cu

## Resumen

Introducción: Las técnicas de Biología molecular son herramientas indispensables para realizar la vigilancia centinela de los virus respiratorios que circulan en la población. Objetivos: Detectar la circulación de los virus respiratorios endémicos en el periodo pre pandémico y determinar la concordancia con el laboratorio Nacional de Referencia del IPK Método: Se realizó un estudio descriptivo transversal en el Laboratorio de Virología Molecular del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) de Villa Clara en el periodo comprendido de marzo a diciembre 2019. La población estuvo constituida por todas las muestras de exudados nasofaríngeos provenientes de 6 sitios: 4 de la APS y 2 de la atención secundaria, con la sospecha de ETI o IRA grave, (N= 149). El análisis estadístico fue realizado en el programa SPSS versión 15.0, índice de Kappa y EpiDat Resultados EL Virus Sincitial Respiratorio (RSV) se detectó en un 50, 8 %; seguido de FLU A 37,3%. 2 muestras presentaron coinfección: una de FLU A con FLU B y otra de FLU A con RSV En el grupo etario de los menores de 1 año se detectó el RSV en 54,3% en los pacientes entre 15-49 la FLU A con un 33,3%. La RT PCR mostró una sensibilidad de 94,55% y una especificidad de 92,78 % Conclusiones la vigilancia centinela fortalecida mediante la RT PCR en tiempo real permitió identificar el RSV como el principal virus detectado, sobre todo en edades pediátrica, la concordancia interlaboratorio fue excelente para la detección de los virus respiratorios endémicos.

**Palabras claves:** virus respiratorios, RT PCR, Vigilancia Centinela

## INTRODUCCIÓN

Las técnicas de Biología molecular son herramientas indispensables para realizar la vigilancia centinela de los virus respiratorios que circulan en la población. Dentro de estas técnicas, son reconocidas las de amplificación como reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa inversa en tiempo real (RT PCR) y la PCR multiplex. (1)

Internacionalmente se han diseñado diversos Kits comerciales de RT PCR para el diagnóstico viral basados en la utilización de diferentes dianas moleculares y de diversas plataformas de PCR multiplex para detectar simultáneamente varios virus respiratorios como Influenza A, B; Sincitial Respiratorio A y B; Parainfluenza 1,2,3,4; Metapneumovirus; Bocavirus, Adenovirus, Enterovirus, Coronavirus estacionarios, Co OC43, Co NL63, Co HKU1, Co 229 E; con un elevado potencial para mejorar la identificación de estos patógenos virales. (2)

El Laboratorio de Virología Molecular de Villa Clara creado como laboratorio territorial por disposición del Laboratorio Nacional de Referencia del IPK y la puesta en marcha de la técnica RT PCR en tiempo real han constituido una fortaleza para los programas de vigilancia epidemiológica, con aporte notable a la vigilancia centinela de los virus responsables de Infección Respiratoria Aguda Grave (IRAG), Enfermedad Tipo Influenza (ETI), en la atención primaria de salud (APS) y en los hospitales. (3)

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) se han convertido en un evento de suma importancia en los últimos años teniendo en cuenta las altas cifras de morbilidad y mortalidad que ocasionan. (4)

En Villa Clara, al igual que en el resto de las provincias de Cuba las infecciones respiratorias agudas se encuentran entre los principales motivos de consulta en las edades extremas de la vida con énfasis en la edad pediátrica.

Estas enfermedades son causadas por diversos agentes patógenos como virus, bacterias, hongos e incluso parásitos. De estos agentes infecciosos los virus constituyen la primera causa de morbilidad y solicitud de atención médica en la edad infantil y población en general, además algunas de estas infecciones causan enfermedades graves, e incluso la muerte, aun en las Unidades de Terapia Intensiva, sobre todo en pacientes con comorbilidades o edades extremas de la vida. (5)

Son múltiples los virus implicados y su prevalencia varía de una serie a otra, teniendo en cuenta el lugar y la época en que se realicen los estudios. (5, 6, 7)

La vigilancia centinela en la atención primaria de salud y en los hospitales siendo aporta de forma eficiente y robusta la emisión de los resultados lo que permite monitorear la transmisión comunitaria, las formas graves y la aparición de brotes en función de la atención de los pacientes, la inmediatez en la toma de decisiones y desencadenar las acciones de salud de manera oportuna.

## MÉTODO

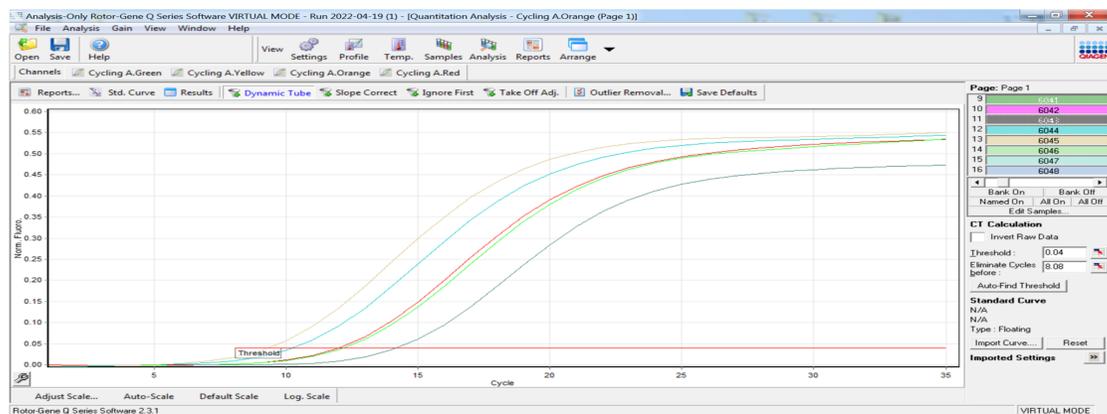
Se realizó un estudio observacional descriptivo transversal en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) de Villa Clara en el periodo comprendido de marzo 2019 a diciembre 2019 con el objetivo de detectar la circulación de los virus respiratorios RSV, FLUA, FLUB y determinar la concordancia con el laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios en el IPK La población estuvo constituida por todas las muestras de exudados nasofaríngeos provenientes de 6 sitios centinelas 4 de la APS y dos de la atención secundaria, con la sospecha de ETI o IRA grave, (N= 149). La Extracción de ARN de las muestras clínicas se realizó mediante el estuche comercial QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), Se aplicó un programa de amplificación para RT-PCR en tiempo real donde se empleó las siguientes dianas moleculares Gen F para el RSV, el Gen M de Influenza A y NP1 en Influenza B. El Programa de amplificación empleado fue el recomendado por RIDA®GENE Flu & RSV real time RT PCR.

Etapas	Fases	Ciclo	Adquisición	Temperatura	Tiempo
Hold 1	Transcripción	1	-	58°C	10 minutos
Hold 2	Inversa	1	-	95°C	1 minuto
	Desnaturalización	45	-	-	-
	Total				
Desnaturalización	-	-	-	95°C	15 segundos
Hibridación	-	-	-	55°C	30 segundos
Amplificación	Si Adquiere	-	-	P.A.M. Green Yellow VIC Orange ROX Red CYS	-

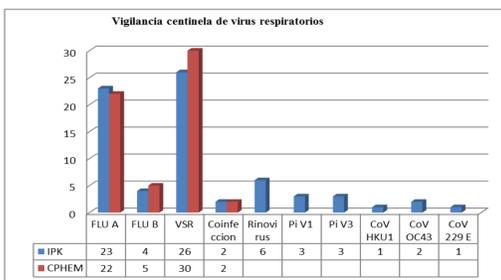
La mezcla de reacción con volumen final 20,1 µL contendrá, Rxn Mix 12,5µL, PP Mix (Primer y Probe Mix) 6,9 µL, Control interno 1µL, Enzime Mix 0,7 µL. El volumen de ARN de cada muestra de 5 µL

Los productos de ARN amplificados por la RT-PCR en tiempo real fueron analizados mediante las curvas de fluorescencia detectadas simultáneamente a la amplificación.

El análisis estadístico fue realizado en el programa SPSS versión 15.0, para variables cualitativas se utilizaron frecuencia absoluta y relativa expresada en número y porcentajes. Para evaluar la concordancia de los resultados del laboratorio de Virología Molecular con el Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorio del IPK se utilizó una escala de interpretación del valor de Kappa que propuso Landis y Koch y para determinar el rendimiento del RT PCR se usó como patrón de referencia al IPK se empleó el programa EpiDat versión 3.1 con una confiabilidad del 95%. Los resultados se presentan en tablas y gráficos.



## RESULTADOS



**Figura 1:** Vigilancia centinela de virus respiratorios. Laboratorios de Virología Molecular de Villa Clara y LNR-IPK. Marzo a diciembre 2019

**Tabla 1:** Vigilancia de virus respiratorios según grupo etario en muestras procesadas en el Laboratorio de Virología Molecular del CPHEM- VC. Marzo a diciembre 2019

Grupo etario	Negativo		FLU A		FLU B		RSV		Coinfección		Total	
	Nro.	%	Nro.	%	Nro.	%	Nro.	%	Nro.	%	Nro.	%
< 1	13	37,1	2	5,7	1	2,9	19	54,3	0	0,0	35	100
1-4	30	68,2	4	9,1	0	0,0	10	22,7	0	0,0	44	100
5-14	10	21,4	3	6,4	1	2,1	0	0,0	0	0,0	14	100
15-49	17	36,7	10	21,3	1	2,1	3	6,3	2	4,3	30	100
50-65	13	28,3	3	6,4	2	4,3	1	2,1	0	0,0	19	100
>65	7	15,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	7	100
Total	90	100	22	24,4	5	5,6	30	33,3	2	2,2	149	100

% en base a las filas.  $\chi^2= 63,278$   $p= 0,00$   
Fuente: Base de datos vigilancia de virus respiratorios

**Tabla 2:** Vigilancia de virus respiratorios según clasificación epidemiológica en muestras procesadas en el Laboratorio de Virología Molecular del CPHEM- Marzo a diciembre 2019

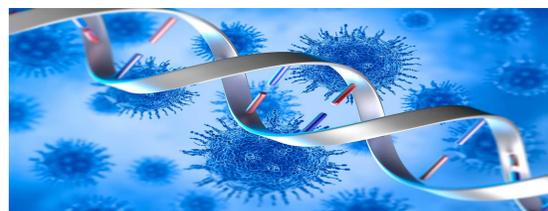
Clasificación	Negativo		FLU A		FLU B		RSV		Coinfección		Total	
	Nro.	%	Nro.	%	Nro.	%	Nro.	%	Nro.	%	Nro.	%
IRA Grave	39	43,3	3	3,3	4	4,4	22	23,3	1	1,1	50	50
ETI no grave	51	56,7	17	18,3	1	1,1	8	8,7	1	1,1	78	78
Total	90	100	22	24,4	5	5,6	30	33,3	2	2,2	149	100

% en base a las columnas.  $\chi^2= 16,186$   $p= 0,03$   
Fuente: Base de datos vigilancia de virus respiratorios

**Tabla 3:** Rendimiento del RT PCR en tiempo real para la detección de virus respiratorios endémicos en el Laboratorio de Virología Molecular Marzo a diciembre 2019

Detección de virus respiratorios endémicos	Resultados IPK		Total
	Positivos	Negativos	
Laboratorio de Virología Molecular	52	7	59
CPHEM	3	87	90
Total	55	94	149

S=94,55 % E=92,55 %  
Fuente: Base de datos vigilancia de virus respiratorios



## CONCLUSIONES

El Virus Sincitial Respiratorio fue el principal responsable de las infecciones respiratorias agudas, seguido la Influenza estacional FLUA, en menor frecuencia en este periodo se mantuvo co-circulando los rinovirus y los coronavirus endémicos. La coinfección dual se detectó en dos pacientes siendo una FLU A con FLU B y otra FLU A con RSV. Se afectaron mayoritariamente los menores de 1 año, seguido de los niños en edad pre escolar. En la vigilancia centinela el virus más detectado en las ETI fue el FLU A y en las IRA Grave predominó el RSV. La RT PCR para el diagnóstico de FLUA, FLUB, RSV en el CPHEM evidenció una alta sensibilidad y Especificidad. La concordancia inter-laboratorio fue excelente para la detección de los virus respiratorios.