

Arribo y diseminación de un virus influenza pandémico Rol del Laboratorio Nacional de Referencia

A mediados de abril de 2009, el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de Atlanta, E.E.U.U., identificó en pacientes de California un nuevo virus de influenza A que posteriormente demostró ser idéntico al que detectara la *Public Health Agency* de Canadá en muestras procedentes de México en el mismo período¹. El virus presentaba una constelación genética única compartiendo genes de origen aviar, porcino y humano. Hacia fines de abril, la facilidad de transmisión del virus entre seres humanos y su diseminación en el resto del mundo, condujeron a que la Organización Mundial de la Salud declarara poco más tarde el estado de pandemia, situación para la que dicha organización y casi todos los países, aunque con distinta intensidad, venían preparándose desde 1999 con una fuerte orientación a predecir que el próximo virus pandémico iba a ser de origen aviar. Numerosos episodios de infección en humanos por virus aviares confirmaron la posibilidad del salto de especie desde los reservorios de virus influenza A –las aves acuáticas de vida silvestre– hacia la población humana, generando gran preocupación por la alta letalidad de estos eventos. Sin embargo, la transmisión inter-humana nunca logró ser eficiente, más allá de ocurrir en grupos familiares o personas con contacto estrecho².

El virus aislado recientemente presenta una muy alta transmisibilidad y todavía no se dispone de datos suficientes para evaluar su letalidad aunque se observó una fuerte tendencia a afectar a adultos jóvenes. La composición genética del virus estuvo disponible poco tiempo después de obtener el aislamiento viral de los casos iniciales: una cuádruple reasociación de genes provenientes de cepas porcinas de circulación en América del Norte, de cepas porcinas de circulación en Eurasia, un gen interno de una cepa humana estacional H3N2 y genes de virus aviares³. Los virus influenza A cruzan las barreras de especie con relativa facilidad y frecuentemente, pero es mucho más raro que logren establecer un linaje estable en su nuevo hospedero. Por eso hablamos por ejemplo, de virus porcinos de linajes euroasiáticos, lo que indica una circulación sostenida y adaptación al hospedero. El nuevo virus de influenza A (H1N1) originalmente denominado porcino, si bien presenta una hemaglutinina H1 y una neuraminidasa N1 de similar nomenclatura que el virus humano estacional, difiere notoriamente en su composición respecto del humano ya que ambos antígenos de superficie corresponden a virus de linajes porcinos. Esto define la falta de inmunidad para el mismo que presentan las poblaciones humanas, condición indispensable para producir una pandemia.

A partir de la alerta generada por los primeros hallazgos, los laboratorios involucrados en la Red Global de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la Vigilancia de Influenza se dispusieron a cumplir su rol en la detección del virus en pacientes que presentaran los signos y síntomas correspondientes a la definición de casos sospechosos. En la Argentina, esa responsabilidad fue asumida por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud Dr. Carlos G. Malbrán (INEI-ANLIS), cuyo Servicio de Vírosis Respiratorias es un Centro Nacional de Influenza (CNI) de la OMS. Estos CNI tienen la función de realizar la vigilancia de influenza mediante el diagnóstico de laboratorio, el aislamiento y la caracterización viral y servir de punto de contacto para la información de eventos inusuales tales como la detección de virus diferentes de los estacionales o no subtipificables. Una selección de virus circulantes en el país es enviada varias veces

al año a un Centro Colaborador de la OMS para contribuir con los datos de Argentina al estudio de la circulación mundial de virus influenza, necesarios para la decisión de la composición de las vacunas.

Para cumplir con esta función, el CNI cuenta con personal altamente capacitado en técnicas de virología clásica —el aislamiento viral en cultivos celulares y la caracterización antigénica de los virus— como en la producción y el análisis de datos obtenidos por técnicas moleculares, tales como la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR) convencional y en tiempo real o la secuenciación del genoma y el análisis filogenético. Ante la aparición del nuevo virus, carecíamos de métodos diagnósticos específicos para el mismo por lo que se estableció una estrategia de diagnóstico combinando el aislamiento viral en cultivos celulares de las muestras provenientes de pacientes sospechosos, con la confirmación del mismo por inmunofluorescencia (IF), seguido de una RT-PCR del gen matriz (M) y secuenciación posterior, a los efectos de su caracterización final por comparación con las secuencias publicadas de los virus hallados en otras regiones del mundo. El procedimiento de cultivo viral se llevó a cabo en las instalaciones de la unidad de contención biológica de la ANLIS, siguiendo las recomendaciones de la OMS⁴.

De esta forma, se diagnosticó a principios de mayo, el primer caso de influenza A (H1N1) en el país en un paciente procedente de México. Posteriormente, el 11 de mayo, se recibió el *kit* diagnóstico desarrollado por el CDC y distribuido a nivel mundial para diagnosticar específicamente el nuevo virus influenza A (H1N1) por RT-PCR en tiempo real, técnica que acortó enormemente los tiempos de realización del estudio. El aislamiento viral se realizaría sólo con la finalidad de obtener información relacionada con la caracterización genética y antigénica del virus.

En esta primera etapa denominada de contención, era necesario confirmar todos los casos mediante un diagnóstico de laboratorio a fin de disminuir la propagación del virus, protegiendo a los contactos y así ganar tiempo en la instalación de la respuesta adecuada del sistema de salud, organizando hospitales, centros de atención primaria y todo el sistema de vigilancia epidemiológica para detectar y registrar la nueva situación. Para cumplir con la creciente demanda, se reforzó al Laboratorio Nacional de Referencia mediante la adquisición de nuevo equipamiento, insumos y contratación de personal profesional y técnico. Se convocó al personal del Departamento Virología y de otros sectores de la Institución que tuvieran capacitación previa en técnicas moleculares para constituir voluntariamente equipos de trabajo que funcionaran en jornada completa, incluyendo fines de semana y feriados. De la misma forma, se incluyó personal técnico para la recepción y registro de las muestras, apertura de las cajas de bioseguridad en las que eran enviadas desde los distintos lugares de atención, evaluación del estado adecuado del material clínico para su procesamiento en el laboratorio y su conservación hasta el procedimiento diagnóstico. El objetivo era realizar el diagnóstico de los casos mediante una técnica confiable en 72 horas.

Durante las primeras semanas del brote, una serie de situaciones de orden técnico y comercial dificultaron alcanzar las metas previstas en el organigrama de trabajo. Baja eficiencia en la extracción automática de ácidos nucleicos, cambios en los insumos necesarios, reemplazo del *kit* del CDC por sondas y cebadores comerciales que demostraron tener un rendimiento desigual, carencia de suficientes *stocks* de material descartable en los proveedores locales, reactivos e insumos dependientes de los tiempos de importación. Todo atentaba contra el cumplimiento de los tiempos previstos de entrega de resultados.

Al promediar el brote, la capacidad diagnóstica del laboratorio de referencia se ubica entre 200 y 240 muestras diarias y el ingreso por día de muestras clínicas de casos sospechosos supera las 500. No se instaló a tiempo una política de selección de casos a estudiar teniendo en cuenta la capacidad del laboratorio, sin descuidar la obtención de los imprescindibles datos epidemiológicos, como se recomienda en el estudio de brotes masivos. También faltó la habitual interacción con los epidemiólogos que trabajan en el tema para la correcta interpretación de los resultados. Al 30 de junio, el número de mues-

tras clínicas procesadas en el laboratorio por PCR en tiempo real y de resultados entregados ascendía a 6 800. Desde el comienzo del brote, la entrega de los resultados obtenidos se realizó diariamente al equipo designado por el Ministerio de Salud para centralizar la información, el cual debía distribuirla a las Direcciones de Epidemiología de cada Jurisdicción. Esta secuencia resultó poco eficiente y atentó contra la llegada de los diagnósticos a los efectores de salud.

Al mismo tiempo, y para cumplir con las obligaciones inherentes a la Red Global de Influenza, se realizaron las gestiones para el envío de una selección de 50 muestras originales y aislamientos al CDC. Las muestras ya están siendo estudiadas en el laboratorio de la OMS.

A medida que se extendió la circulación del virus, juntamente con otras infecciones respiratorias propias de la temporada invernal en el hemisferio sur, se decidió la descentralización del diagnóstico a realizar en varias etapas, previa evaluación de la capacidad instalada en el país. En primer lugar, desde un comienzo se recomendó a los laboratorios que disponían del diagnóstico de virus respiratorios por IF que continuaran con esta práctica, aunque enfatizando la necesidad del uso de equipos de protección personal y técnicas de bioseguridad en el laboratorio. La nueva cepa de influenza es detectada por esta técnica con la misma baja sensibilidad demostrada para influenza estacional pero no puede diferenciarla. Por otra parte, soluciona los diagnósticos de otros virus respiratorios de alto impacto sanitario, al mismo tiempo que alerta ante la presencia de un caso positivo para influenza A.

Un primer taller de transferencia se realizó con escasos laboratorios públicos y privados que disponían de equipos de PCR en tiempo real. Más tarde –ya con circulación del nuevo virus en el interior del país– una segunda reunión se llevó a cabo para transferir una PCR convencional a laboratorios del interior que disponían del personal capacitado en el uso de técnicas moleculares, un termociclador y condiciones de bioseguridad. Esta consiste en la detección de influenza A con una metodología recomendada por la OMS⁴ por su alta sensibilidad aunque no diferencia las cepas estacionales de las del nuevo virus.

En suma, la adecuación del laboratorio a la crítica situación generada por la emergencia de un nuevo virus de influenza dejará una capacidad instalada en cuanto a capacitación, experiencia profesional y equipamiento que pudo concretarse gracias al recurso humano disponible. Éste demostró tener una formación adecuada para absorber rápidamente lo técnico, respuesta que no hubiera sido suficiente de no mediar la actitud solidaria y el esfuerzo personal de todos los que se implicaron de buen grado para llevar adelante este desafío.

En el año 2006 se habían programado las capacitaciones para la transferencia del diagnóstico de un probable virus pandémico así como la solicitud de compra del equipamiento y el reforzamiento general de la capacidad de respuesta. Concretar la instalación y uso de aparatos nuevos, la utilización de nuevos *kits* diagnósticos y la organización de talleres de transferencia durante un brote de la magnitud del que estamos pasando, reduce la eficiencia del personal, genera situaciones de alto estrés y conduce a una sobreexigencia que pudo haberse morigerado con sólo haber cumplido previamente con lo que estaba consensuado y solicitado en base al Plan Nacional de Preparación para la Pandemia, documento del Ministerio de Salud redactado en 2003, con posteriores actualizaciones.

Vilma L. Savy

INEI Carlos G. Malbrán (ANLIS)

e-mail: vsavy@anlis.gov.ar

1. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 2009; 459: 931-9.
2. Fauci AS. Pandemic influenza threat and preparedness. *Em Inf Dis* 2006; 12: 73-7.
3. Novel swine-origin influenza A /H1N1 virus investigation team. Emergence of a novel swine-origin influenza A H1N1 virus in humans. *NEJM* 2009; 361: 1-10.
4. WHO Information for Laboratory Diagnosis of New Influenza A (H1N1) Virus in Humans. En: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptcr/en/index.html>. Consultado junio 2009.