

Diagnóstico Microbiológico
Influenza H1N1
¿Qué hemos aprendido desde la
pandemia?

Dra. María Luisa Rioseco Z
Microbiólogo Hospital Puerto Montt
y Clínica Los Andes Puerto Montt
Mayo 2010

MARZO 2009: Aumento de enfermedades respiratorias en México

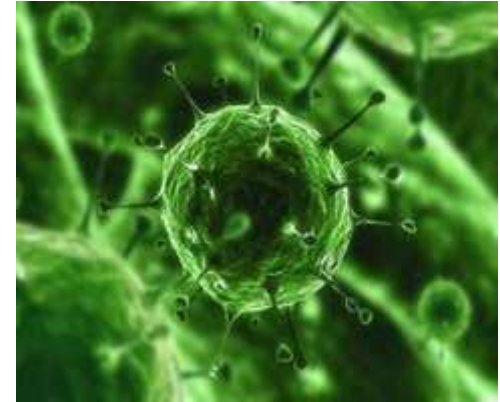
ABRIL 2009: Dos casos de IA no tipificable en USA

ABRIL 2009: CDC identifica H1N1 pandémico y Canadá virus similar de México

ABRIL 2009: Alerta de OMS y Minsal

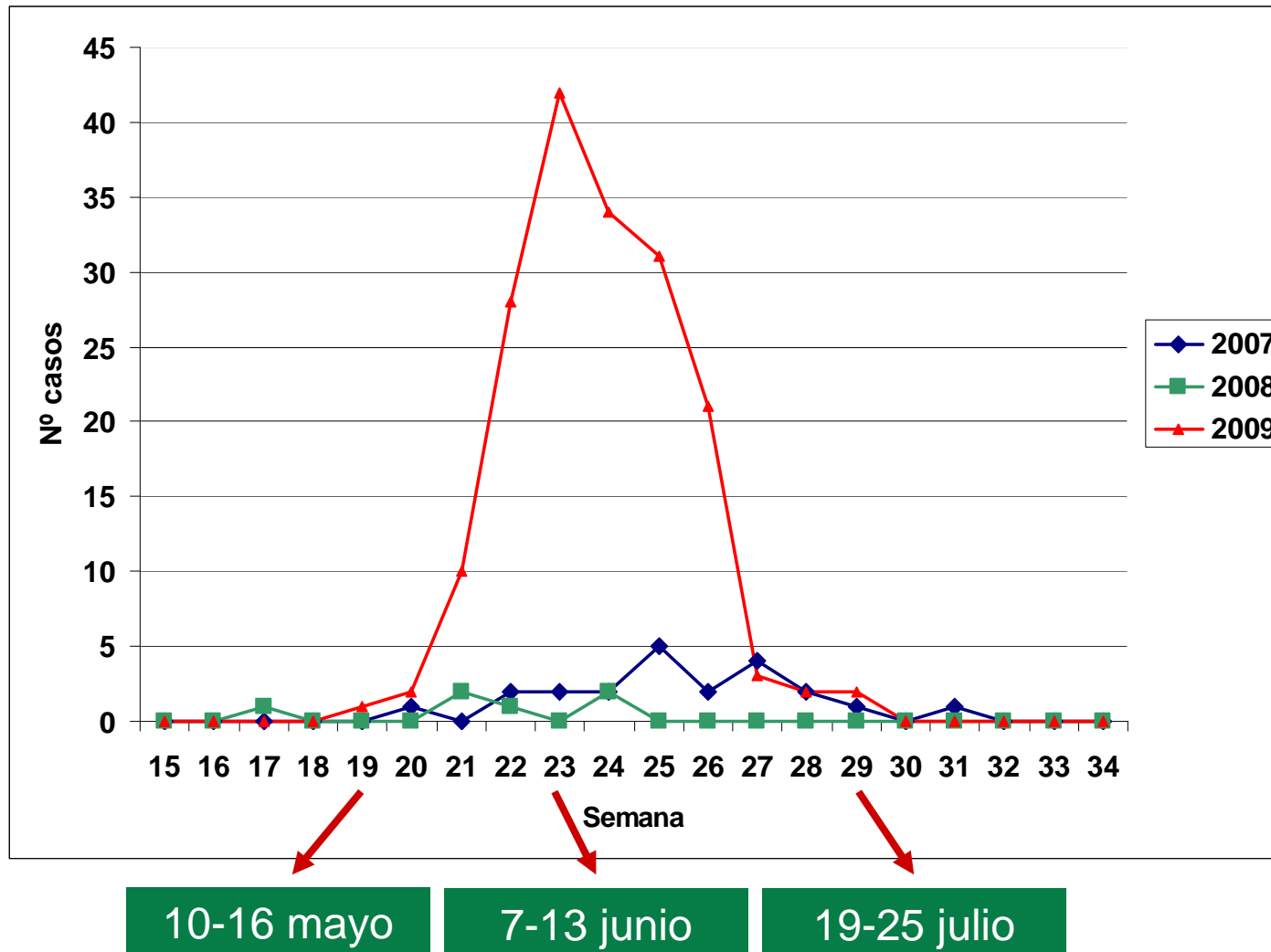
MAYO 2009: Primer caso confirmado en Chile

JUNIO 2009: Pandemia



IA 2007 - 2008 - 2009

Hospital Puerto Montt

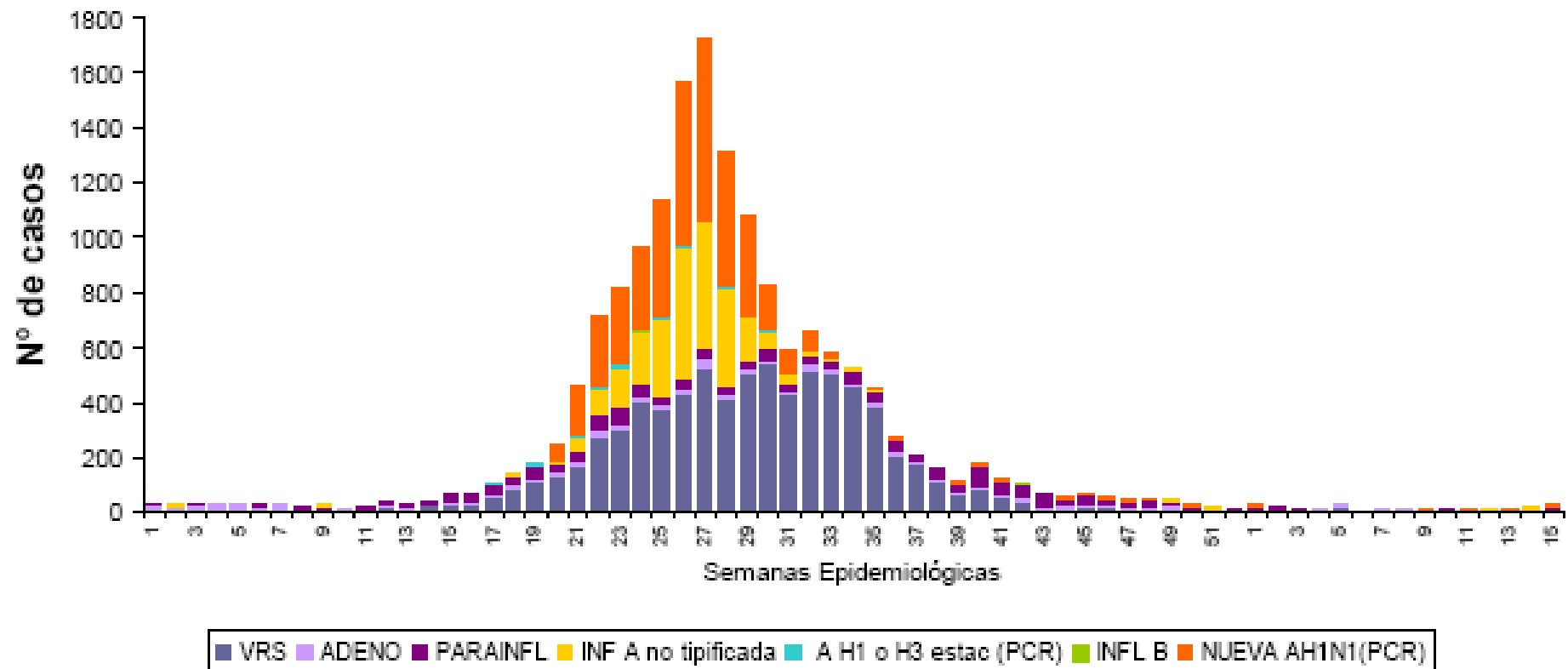




Estudio confirma que influenza humana en Chile se originó en Puerto Montt

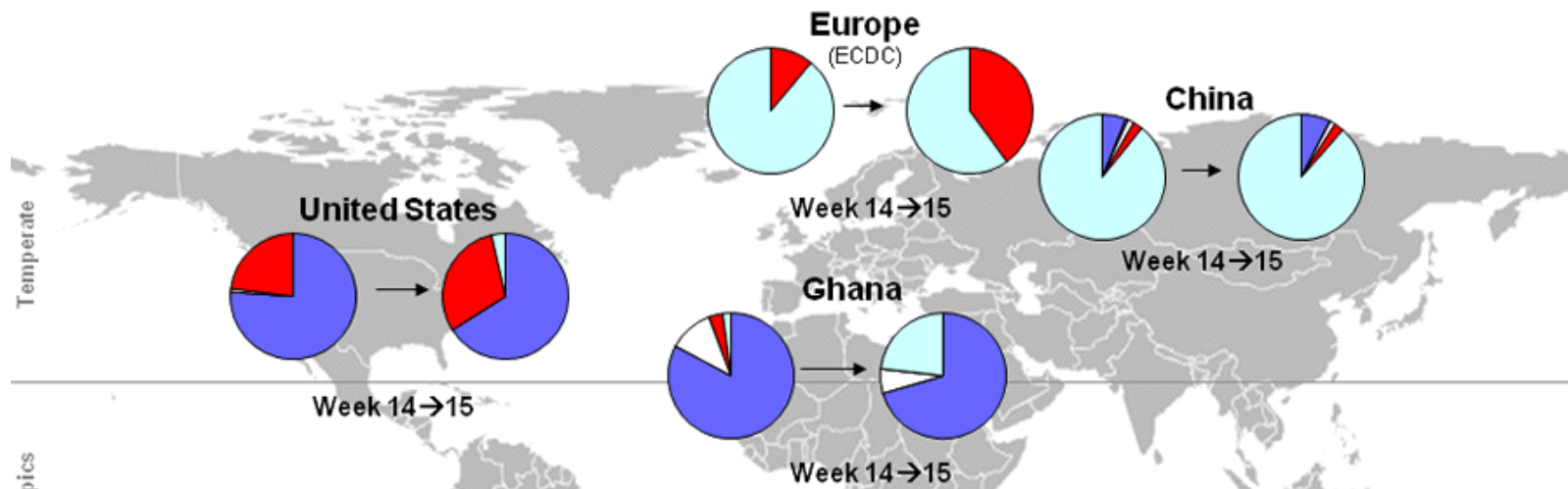
Contrario a lo que se esperaba, la epidemia de la gripe humana partió en la capital de la Décima Región un mes antes de que aparecieran los primeros casos oficiales en Santiago. En septiembre, el Minsal iniciará un estudio para medir el grado de inmunidad de la población al virus. Se tomarán muestras de sangre en tres ciudades.

Distribución virus respiratorios por semana epidemiológica, vigilancia ISP.
Chile, sem 1 a 52 de 2009 y 1 a 15 de 2010.



Proportion of Influenza Subtypes in Select Countries

Week 15: April 11-12, 2010 to April 17-18, 2010



	Week 14 Apr 4/5 - Apr 10/11						Week 15 Apr 11/12 - Apr 17/18					
	2009 H1N1	Influenza A (H1)	Influenza A (H3)	Influenza A (Unsub) *	Influenza B (total)	Total	2009 H1N1	Influenza A (H1)	Influenza A (H3)	Influenza A (Unsub) *	Influenza B (total)	Total
United States	86	0	1	26	0	113	37	0	0	17	2	56
Europe	0	0	0	1	8	9	0	0	0	6	9	15
China	51	5	14	21	752	843	47	1	9	16	562	635
Ghana	116	0	16	5	3	140	79	0	7	0	26	112

* Note: *Influenza A (Unsub)* is all untyped influenza A viruses. It does not include untypable influenza A viruses

Data Sources: China and Ghana: FluNet (<http://gamapserver.who.int/GlobalAtlas/home.asp>)
 Europe: ECDC (<http://www.ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>)
 United States: CDC

Impacto del H1N1 en los Laboratorios

- **Aumento exponencial de la demanda de exámenes**
 - Horas extraordinarias
 - Personal extra (capacitado)
 - Diagnóstico los fines de semana
 - Falta de espacio
- **Presión por resultados**
- **Requerimiento de información epidemiológica**
- **Nuevos métodos diagnósticos**
- **Logística para confirmación de H1N1 centralizada (ISP)**

**Los Laboratorios
Clínicos no estaban
preparados para
enfrentar una
pandemia y tener la
responsabilidad del
diagnóstico del caso
individual y de
proveer información
epidemiológica...pero
lo hicimos**



©1995-2007 ppsosach.com

Laboratory Surge Response to Pandemic (H1N1) 2009 Outbreak, New York City Metropolitan Area, USA

James M. Crawford, Robert Stallone, Fan Zhang, Mary Gerolimos, Diamanto D. Korologos,
Carolyn Sweetapple, Marcella de Geronimo, Yosef Dlugacz, Donna M. Armellino,
and Christine C. Ginocchio

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 16, No. 1, January 2010

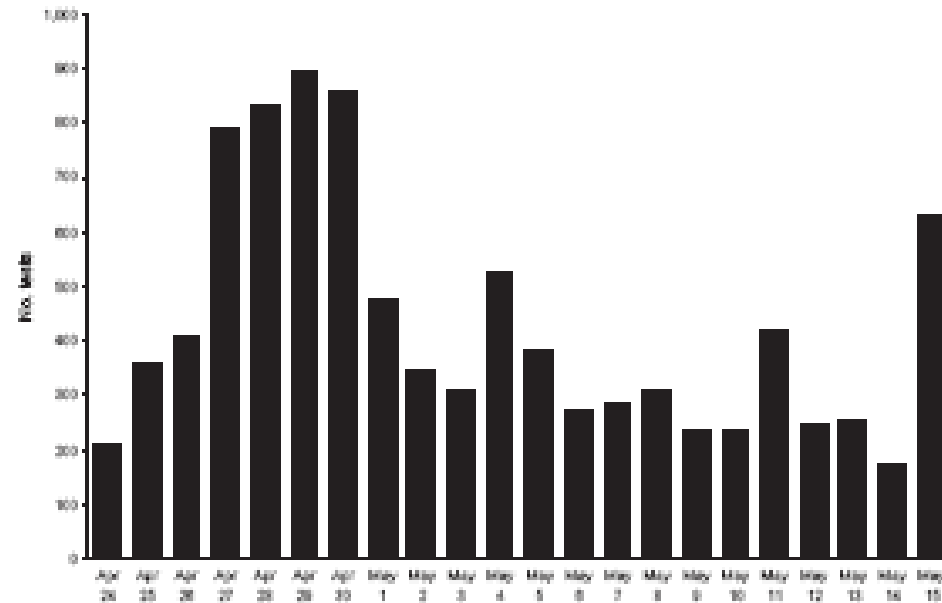


Figure 1. Daily clinical virology test volumes in the North Shore–Long Island Jewish Health System, New York City metropolitan area, USA, April 24–May 15, 2009. General clinical laboratories performed influenza A/B rapid antigen testing only. The central Clinical Virology Laboratory performed direct immunofluorescence antibody testing and R-Mix viral culture, and beginning May 2, the central Molecular Diagnostics Laboratory performed molecular testing for respiratory viruses (xTAG Respiratory Virus Panel, Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Ontario, Canada).

Lecciones aprendidas

Area Metropolitana de Nueva York

- **Definición precoz de los requerimientos**
 - Staff, insumos, LIS, planta física, etc.
- **Manejo de necesidades de staff**
 - Personal adicional, rotaciones, descanso adecuado, etc.
- **Coordinación de la red**
 - Algoritmos, priorización de envíos a confirmación
- **Sistema de información**
 - LIS, médicos, Jefatura, IIH, Administradores
- **Servicio al cliente**
 - Preguntas frecuentes, recolección de muestras, etc.
- **Relaciones públicas**
 - Información centralizada a prensa

¿Por qué hacer diagnóstico de H1N1?

- **Enfoque Clínico**

- Conocer etiología
- Evitar otros test diagnósticos
- Tratamiento específico
- Evitar uso de ATM
- Recomendaciones para evitar contagio
- Baja sensibilidad de diagnóstico clínico (38-79%)

- **Enfoque Epidemiológico**

- Vigilancia IRA
- Estudio de brotes
- Diseño de vacunas
- Estudio de virus
- Estudio de susceptibilidad a antivirales
- Prevención y control de IIH

Métodos para el diagnóstico de virus influenza

Cultivo

Serología

RT-PCR

Inmunofluorescencia

Test rápidos



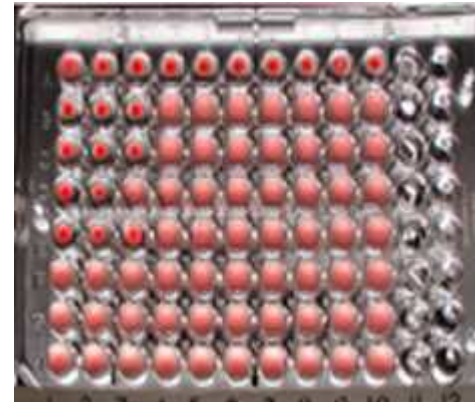
Cultivo viral



- Siembra en líneas celulares e identificación posterior
- Requiere virus vivo
- Laboratorio especializado
- Alta complejidad
- Investigación viral
- Demora varios días (shell vial, 48 horas)
- Gold estándar (?)

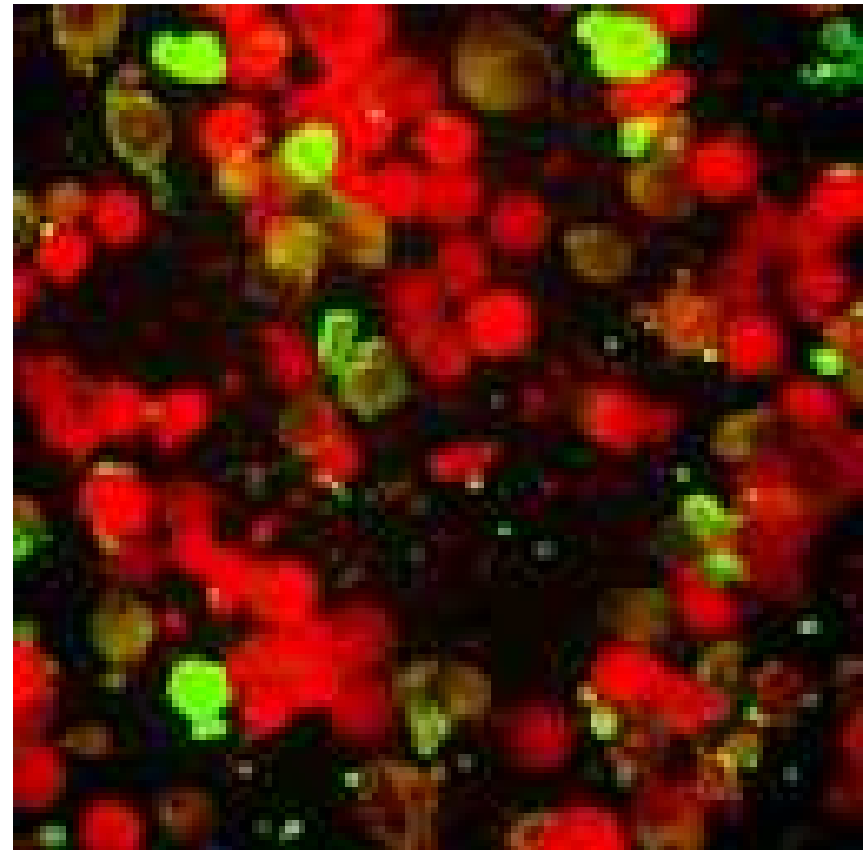
Serología

- Respuesta inmune a la infección viral
- Seroconversión
- Resultado tardío
- Investigación epidemiológica
- Laboratorio especializado
- Métodos:
 - Inhibición de la hemaglutinación
 - Fijación de complemento

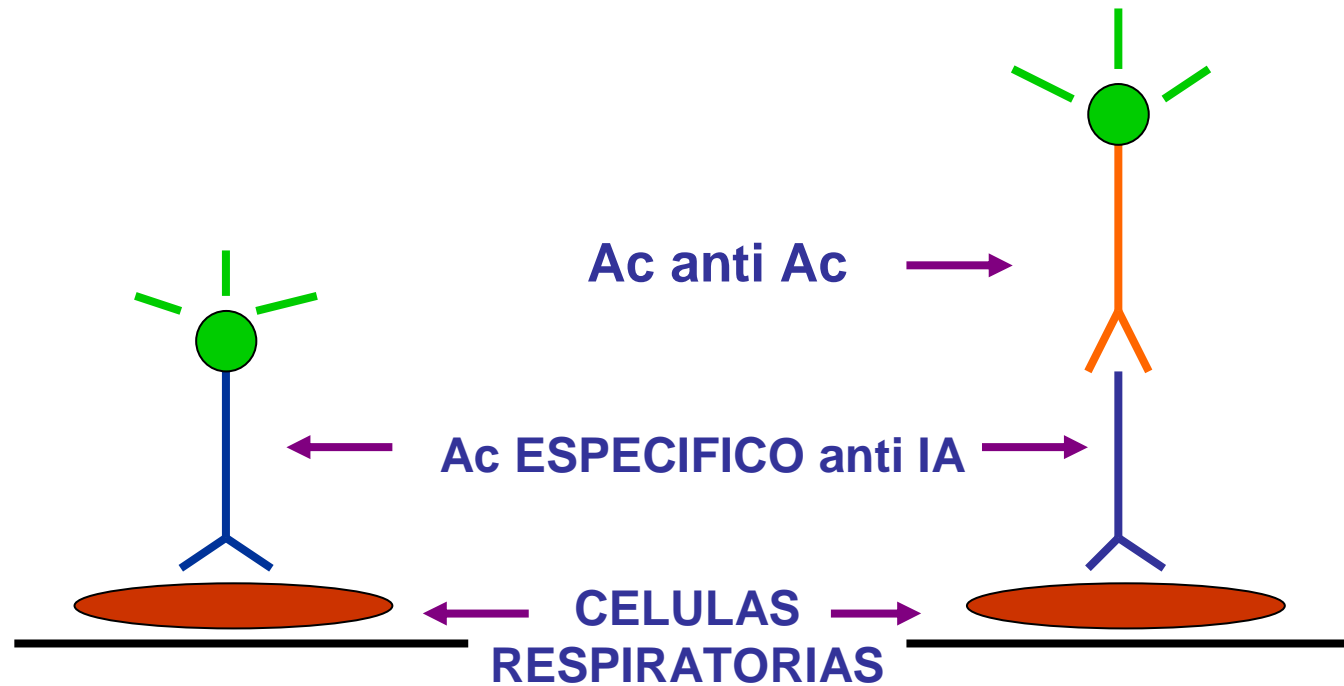


Inmunofluorescencia

- Detección de antígenos virales específicos en células respiratorias
- Acs monoclonales
- Kits comerciales incluyen varios virus respiratorios (ADV, VRS, IA, IB y PI)
- Técnica directa o indirecta



Inmunofluorescencia directa e indirecta



Ruling Out Novel H1N1 Influenza Virus Infection with Direct Fluorescent Antigen Testing

Nira R. Pollock,¹ Scott Duong,² Annie Cheng,² Linda L. Han,³
Sandra Smole,³ and James E. Kirby²

BRIEF REPORT • CID 2009:49 (1 November) • 000

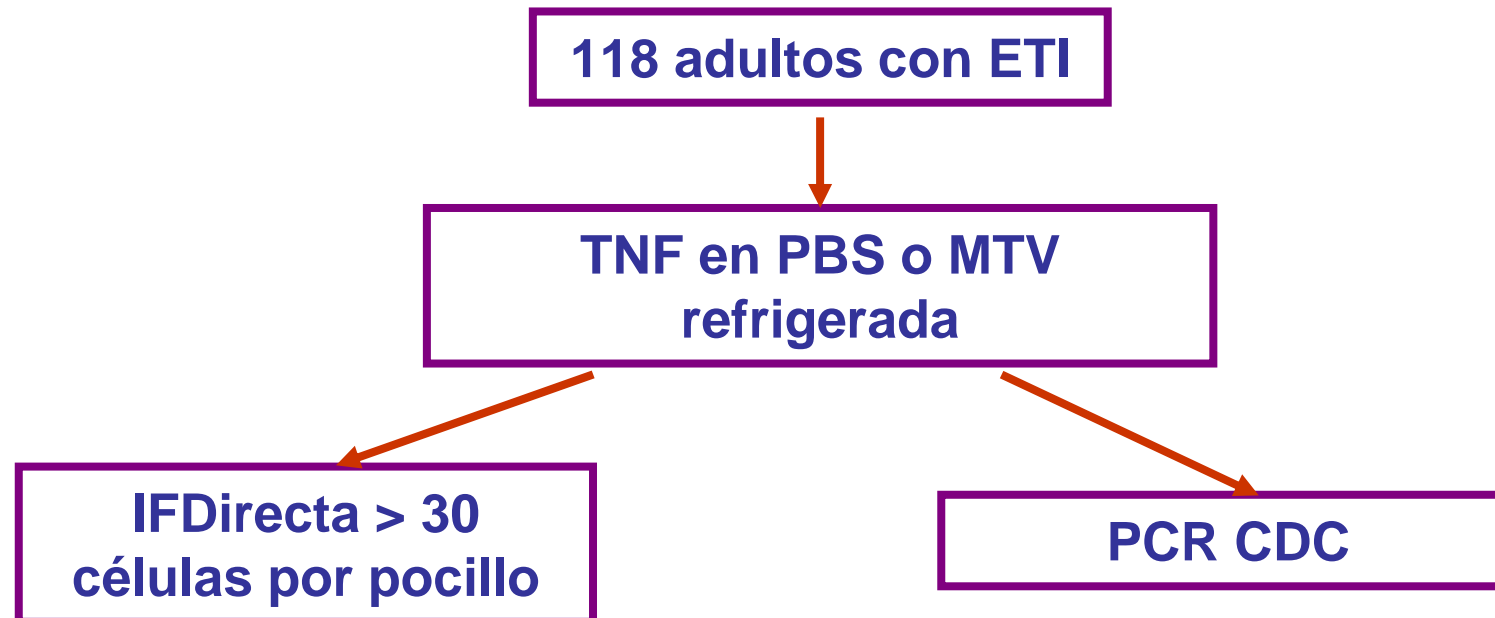
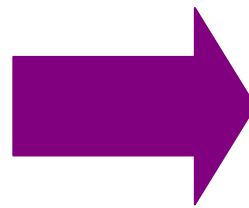


Table 1. Direct Fluorescent Antigen (DFA) versus Polymerase Chain Reaction (PCR) Test Results for Detection of Novel H1N1 Influenza Virus in Nasopharyngeal Specimens

DFA result	No. of specimens, by PCR result	
	Positive	Negative
Positive	39	2
Negative	3	67

- **Sensibilidad 93% (100%)**
- **Especificidad 97%**
 - **VPN 96%**
 - **VPP 95%**



Procesar sólo aquellas muestras con ≥ 60 células epitelio respiratorio por pocillo

Ventajas y desventajas de IF en H1N1

- S y E favorables
- Técnica poco compleja
- Permite evaluar calidad de muestra
- Detecta otros virus
- Bajo costo

- Operador dependiente
- Requiere equipamiento especial
- Proceso dura 2 a 3 h
- Varias muestras a la vez
- No diferencia subtipos



D³ UltraTM

2009 H1N1 Influenza A Virus ID Kit

REF: 01-013100.2009H1
For *in vitro* Diagnostic Use

TABLE 2: Comparison of the D³ Ultra 2009 H1N1 Influenza A Virus ID Kit and the EUA device CDC swH1N1 (swine) Influenza Virus Real-time RT-PCR Detection Panel in Direct Specimens

Fresh nasal/ nasopharyngeal Swab	EUA device swH1N1 (swine) Influenza Virus Real-time RT-PCR Detection Panel (2009 H1N1 Result)			
D ³ Ultra 2009 H1N1 Influenza A Virus ID Kit	Positive	Negative	Indeter- minate*	Total
Positive	45	0	4	45
Negative	0	1 [†]	0	1
Total	45	1	4	46
				95% CI
Sensitivity	45/45	100%		92.1-100%
Specificity	1/1	100%		N/A

IFD en Hospital Puerto Montt

Aspirado NF, 5 Mayo al 17 de Julio 2009

	PCR (+)	PCR (-)	Total
IFD (+)	102	5 (FP)	107
IFD (-)	76 (FN)	100	176
Total	178	105	283

Sensibilidad 57.3%
Especificidad 95.2%

IFD en Hospital Puerto Montt ANF 8-Mayo a 17-Julio

Adultos	PCR (+)	PCR (-)	Total
IFD (+)	58	3	61
IFD (-)	50	48	98
Total	108	51	159
Niños			
IFD (+)	44	2	46
IFD (-)	26	52	78
Total	70	54	124

Adultos: Sensibilidad 53.7% Especificidad 94.1%

Niños: Sensibilidad 62.9% Especificidad 96.3%

Sensibilidad IFD H1N1 en el país

6 centros con aspirado nasofaríngeo
ISP reporta mayor sensibilidad de IFI versus IFD

NIÑOS	ADULTOS
62.5% - 89%	47.3% - 61.5%

rRT-PCR

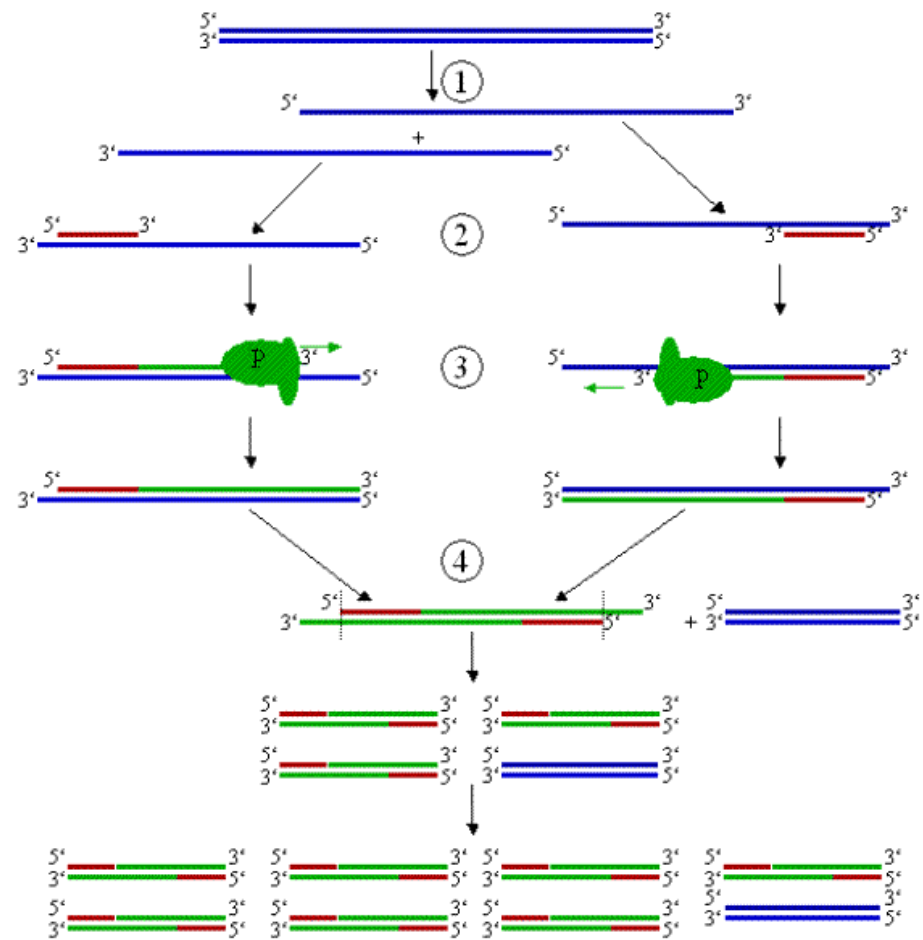


CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A(H1N1)

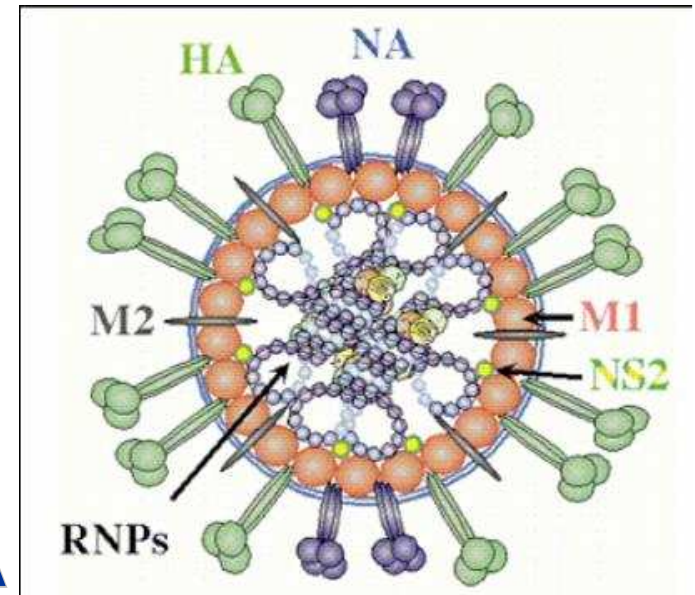
28 April 2009
revision 1 (30 April 2009)
revision 2 (6 October 2009)

The WHO Collaborating Centre for influenza at CDC Atlanta, United States of America, has made available the protocol, attached, of realtime RTPCR for influenza A(H1N1).

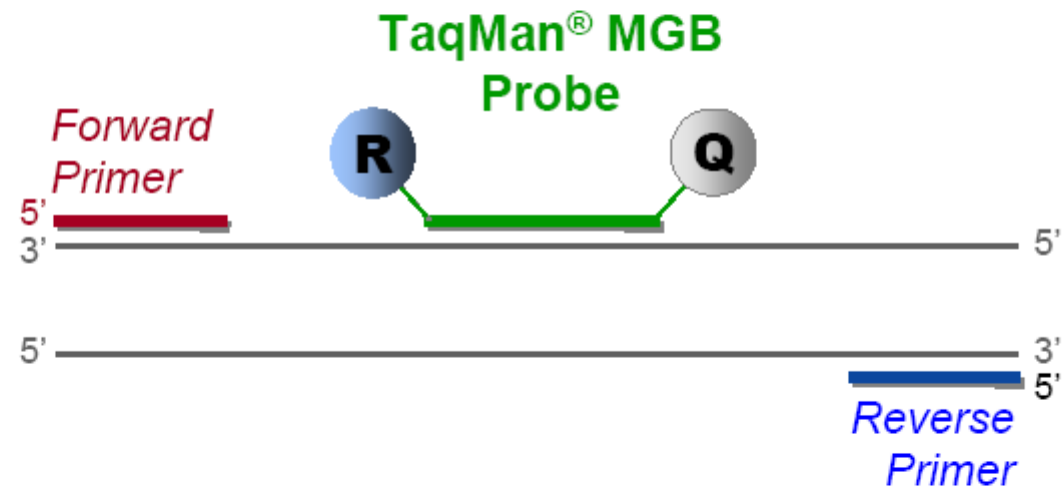
<http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptpcr/en/>



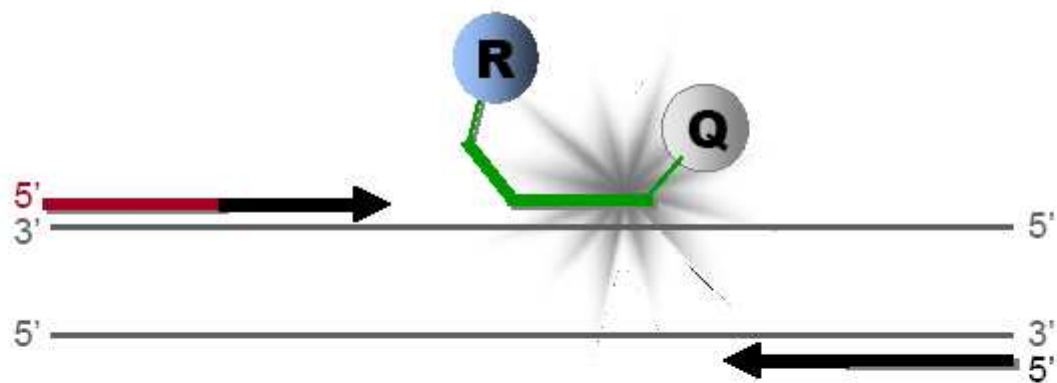
- **Primers (f y r) & sonda InfA**
 - Región conservada de proteína M
 - Detección universal de virus influenza A
- **Primers (f y r) & sonda swInfA**
 - Porción del gen de nucleoproteína de IA porcino
 - Detección universal de IA porcino
- **Primers (f y r) & sonda swH1**
 - Porción del gen de HA de H1N1
 - Detección de H1N1 pdm



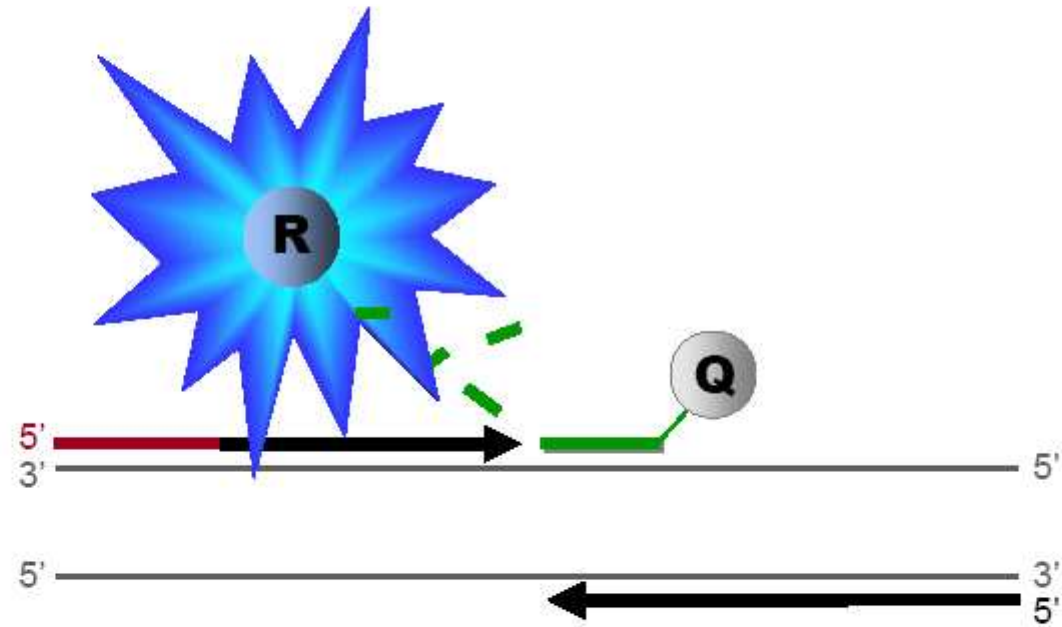
Real-time PCR



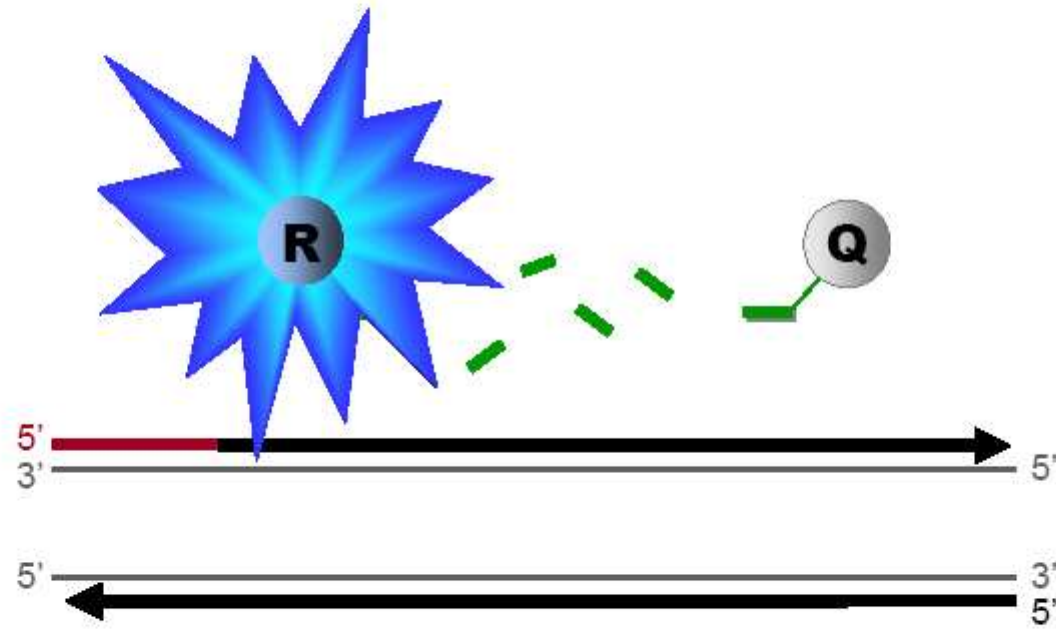
Real-time PCR



Real-time PCR



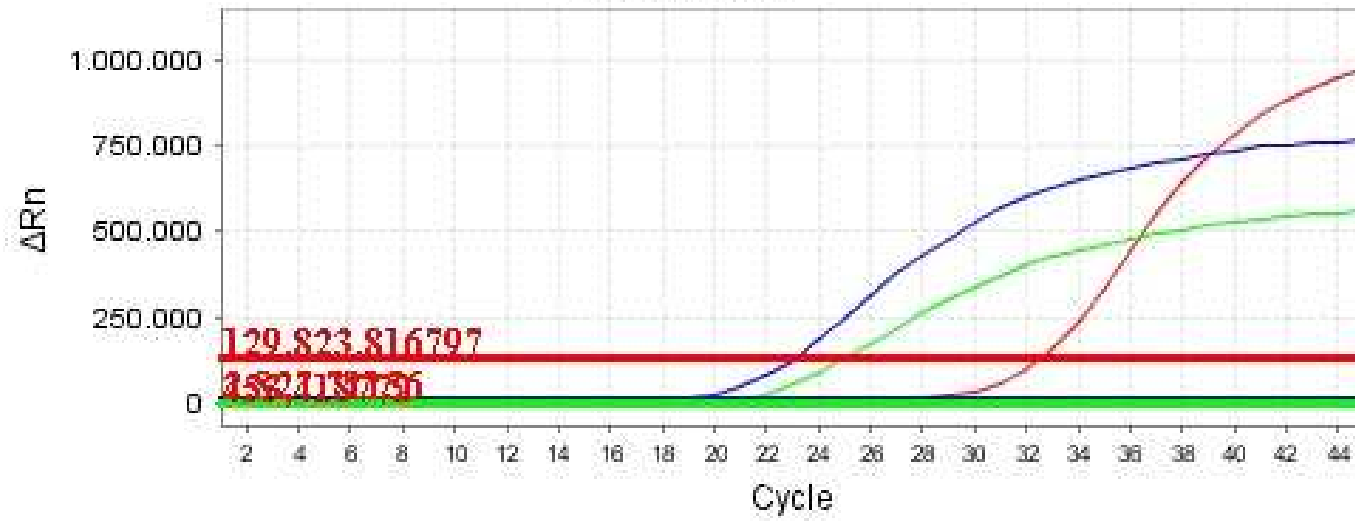
Real-time PCR



Amplification Plot

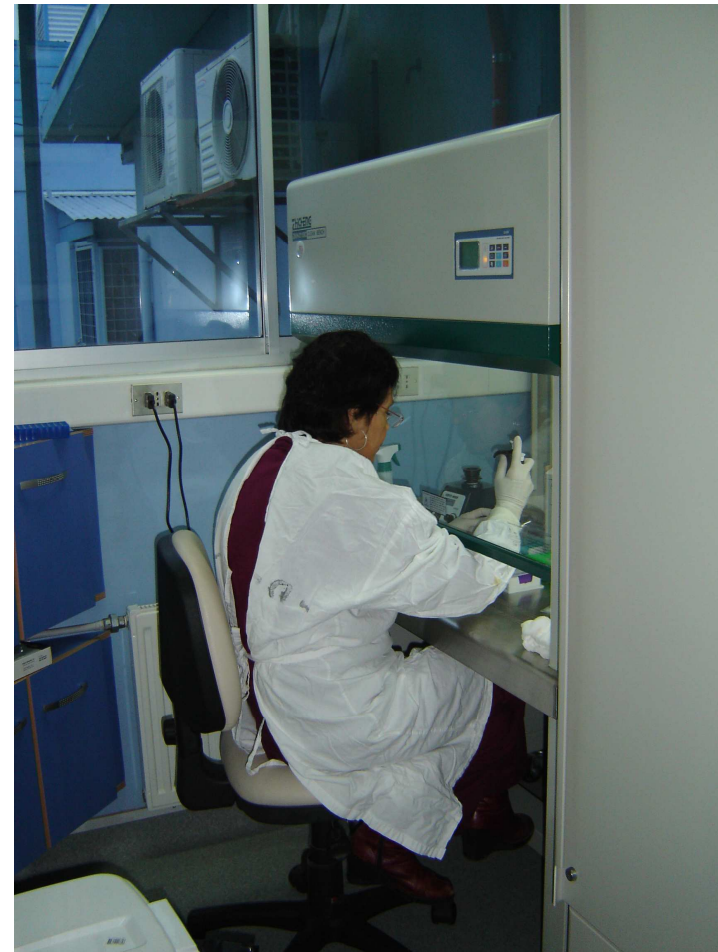
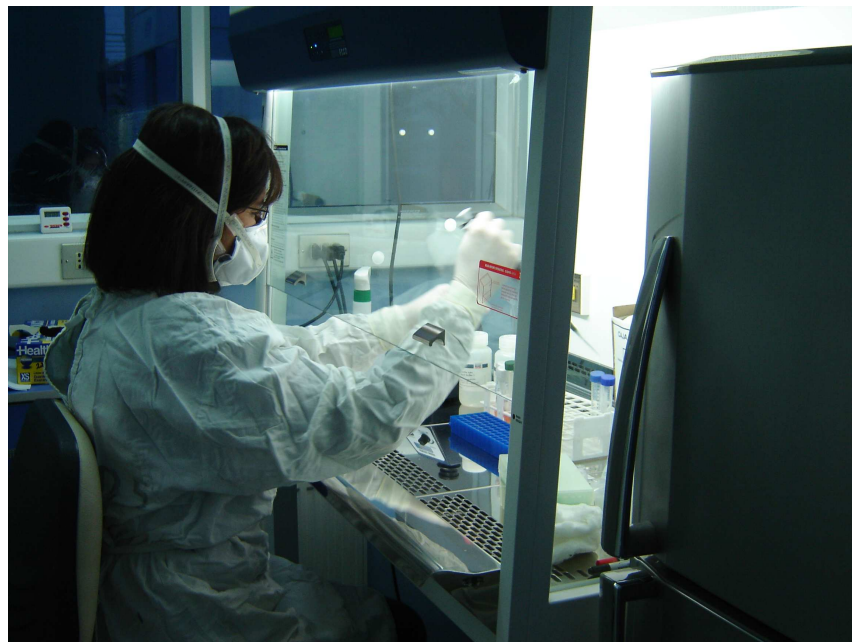


Amplification Plot



Laboratorio de PCR Hospital Puerto Montt





Ventajas y desventajas rRT-PCR H1N1

VENTAJAS

- ✓ **Gold estándar**
- ✓ **Alta sensibilidad y especificidad**
- ✓ **No requiere virus vivo**
- ✓ **Identifica subtipo**
- ✓ **Poco afectada por calidad de muestra**
- ✓ **Kits para identificar varios virus**

DESVENTAJAS

- ✓ **Equipamiento especial**
- ✓ **Alto costo**
- ✓ **Proceso dura 4 horas**
- ✓ **Falsos negativos por cambio de RNA o inhibidores**
- ✓ **Falsos positivos por contaminación**
- ✓ **Varias muestras a la vez**

Otros Protocolos RT-PCR

Detection of novel influenza A(H1N1) virus by real-time RT-PCR

David M. Whiley^{a,b,*}, Seweryn Bialasiewicz^{a,b}, Cheryl Bletchly^c, Cassandra E. Faux^{a,b},
Bruce Harrower^d, Allan R. Gould^e, Stephen B. Lambert^{a,b}, Graeme R. Nimmo^c,
Michael D. Nissen^{a,b,c}, Theo P. Sloots^{a,b,c}

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 47(2009) 303-304

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2009, p. 3454-3460

0095-1137/09/\$12.00 doi:10.1128/JCM.01103-09

Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 47, No. 11

Design and Validation of Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays for Detection of Pandemic (H1N1) 2009 Virus[▽]

Kanti Pabbaraju,^{1*} Sallene Wong,¹ Anita A. Wong,¹ Greg D. Appleyard,^{1,3} Linda Chui,^{2,4}
Xiao-Li Pang,^{2,4} Stephanie K. Yanow,^{2,5} Kevin Fonseca,^{1,3} Bonita E. Lee,^{2,6}
Julie D. Fox,^{1,3} and Jutta K. Preiksaitis^{2,7}

Short communication

Multiplex PCR tests sentinel the appearance of pandemic influenza viruses including H1N1 swine influenza

James B. Mahony^{a,*}, Todd Hatchette^b, Davor Ojkic^c, Steven J. Drews^d, Jonathan Gubbay^d, Donald E. Low^d, Martin Petric^e, Patrick Tang^e, Sylvia Chong^a, Kathy Luinstra^a, Astrid Petrich^a, Marek Smieja^a

Journal of Clinical Virology 45 (2009) 200–202

Rapid communications

EVALUATION OF FOUR REAL-TIME PCR ASSAYS FOR DETECTION OF INFLUENZA A(H1N1)V VIRUSES

J Ellis (joanna.ellis@hpa.org.uk)¹, M Iturriza¹, R Allen¹, A Bermingham¹, K Brown¹, J Gray¹, D Brown¹

¹.Virus Reference Department, Centre for Infections, Health Protection Agency, Colindale, London, United Kingdom

Test rápidos



Test rápidos para virus influenza



- **Test de screening**
- **Detectan antígenos de NP viral**
- **Rápidos (15 minutos)**
- **Varios proveedores (CLIA waived)**
- **Detectan:**
 - IA
 - IA + IB
 - IA = IB
- **Aprobados para muestras específicas**
- **Sensibilidad moderada**
- **Especificidad > 90%**

Referencias

1. **Rapid Antigen Tests for Diagnosis of Pandemic (Swine) Influenza A/H1N1. CID 2009;49:1090-3**
2. **Poor Clinical Sensitivity of Rapid Antigen Test for Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 Virus. Emerg Infect Dis 2009;15:1662-4**
3. **Clinical Performance of a rapid influenza test and comparison of nasal versus throat swabs to detect 2009 pandemic influenza A (H1N1) infection in thai children. Ped Infect Dis J 2010;29:366-7**
4. **Comparison of BD Directigen EZ Flu A+B test against the CDC real time PCR assay for detection of 2009 pandemic influenza A/H1N1 virus. J Clin Microbiol 2010;48:343-4**
5. **Comparison of a rapid antigen test with nucleic acid testing during cocirculation of pandemic IA/H1N1 2009 and seasonal IA/H3N2. J Clin Microbiol 2010;48:290-1**
6. **Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A(H1N1) virus, US,2009. MMWR, August 7,2009**
7. **Performance of rapid influenza diagnostic test during two school outbreaks of 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus infection. Connecticut, 2009. MMWR, September 25, 2009**
8. **Rapid-test sensitivity for novel swine-origin influenza A(H1N1) virus in humans. N Engl J Med 2009;361:728-729**
9. **Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak.J Clin Virol 2009;45:191-5**
10. **Rapid influenza antigen test for diagnosis of pandemic (H1N1) 2009. Emerg Infect Dis 2010;16:824-6**

Test rápidos y H1N1 pdm

TR	Virus	S %	E %	VPP	VPN	Ref
Directigen ® (BD)	A y B	46.7-49	96.5 – 100	88.6 - 100	77.3 – 89.6	1,4,6
BinaxNOW ® (Inverness)	A y B	11 - 40	93.6 - 100	77.4 - 100	47.9 – 88.2	1,2,6,9
QuikVue A+B ® (Quidel)	A y B	51 - 69	84 - 100	84 - 100	64 – 90.8	1,3,5,6, 8,10
XpectFlu ® (Remel)	A y B	47	86	92	32	7

Baja prevalencia	VPP	FP	VPN	FN
Alta prevalencia	VPP	FP	VPN	FN

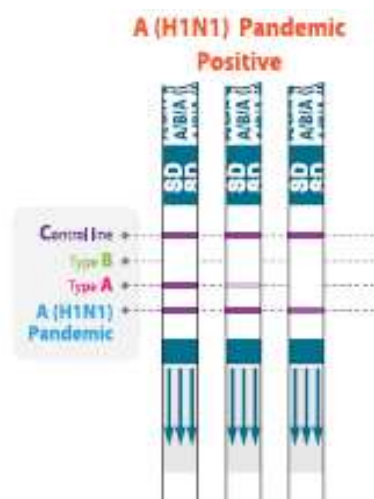
Evaluation of New Rapid Antigen Test for the Detection of Pandemic

Influenza A/H1N1 2009 Virus

JCM Accepts, published online ahead of print on 31 March 2010
 J. Clin. Microbiol. doi:10.1128/JCM.02392-09

TABLE 1. Performance of the new RAT^a compared to real-time RT-PCR for the detection of Pandemic Influenza A/H1N1 2009 virus

Detection component of the new RAT	No. of cases					% Sensitivity (95% CI)	% Specificity (95% CI)	PPV ^b (%)	NPV ^c (%)
	Total	PCR+ RAT+	PCR+ RAT-	PCR- RAT+	PCR- RAT-				
Detection component for 2009 H1N1									
Paired samples ^d	561	186	55	0	320	77 (72-82)	100 (99-100)	100	85
Unpaired sample ^e	198	55	17	1	125	76 (65-84)	99 (96-100)	98	88
Overall	759	241	72	1	445	77 (72-81)	100 (99-100)	100	86
Detection component for Influenza A									
Paired samples	561	152	89	1	319	63 (57-69)	100 (98-100)	99	78
Unpaired sample	198	42	30	0	126	58 (47-69)	100 (97-100)	100	81
Overall	759	194	119	1	445	62 (57-67)	100 (99-100)	100	79



Test rápido Chile 2009

4 centros privados de Santiago

ANF adultos y niños

SENSIBILIDAD

56.1% - 65%

ESPECIFICIDAD

92.6 – 97%

Conclusiones test rápidos H1N1

- Único método de diagnóstico rápido
- La gran mayoría no diferencia subtipo
- Alta disponibilidad y facilidad en uso
- Moderada sensibilidad (NO descarta)
- Buena especificidad
- Interpretación depende de prevalencia
- Mejor en niños, precoz y muestra OK (cantidad de antígeno)
- Menor sensibilidad que IA estacional

¿Qué hemos aprendido desde la pandemia?



