



Diagnóstico microbiológico de las neumonías virales

Andrés Antón Pagarolas

Unidad de Virus Respiratorios

Servicio de Microbiología

Hospital Universitari Vall d'Hebron



Infección Respiratoria. **Neumonía-adquirida en la comunidad (NAC)**

La **infección respiratoria aguda** (IRA) es la patología más frecuente a lo largo de la vida del ser humano. Alrededor del **5%** pueden ser de tracto respiratorio inferior (TRI), como bronquitis, bronquiolitis y neumonía.

10^a causa de mortalidad (2.2% fallecimientos) en adultos (15-59 años).

4^a causa de mortalidad (4.8% fallecimientos) en adultos (>60 años).

4^a causa de mortalidad (3.3% fallecimientos) en países desarrollados (ancianos).

1^a causa de mortalidad (10% fallecimientos) en países en vías de desarrollo (jóvenes).

WHO. <http://www-who.int/healthinfo/paper54.pdf>

Evidencias de infección viral están presentes en un **42-76%** de los casos de neumonía-adquirida en la comunidad (NAC) en niños, y entre un **15-65%** de las NAC en adultos, utilizando métodos moleculares. Lancet, 2011. **377**(9773): p. 1264-75

Las incidencias más altas se presentan en niños **menores de 5 años** y en adultos **mayores de 75 años**.

Lancet, 2011. **377**(9773): p. 1264-75

Infección Respiratoria. Agentes etiológicos / infección respiratoria.

Las infecciones respiratorias, destacando la NAC, están causadas por diferentes microorganismos patógenos, como bacterias, virus, hongos y parásitos. En **menos de un 50% de los casos** se llega a un diagnóstico del agente etiológico causal.

Table 1 Etiology of Community-Acquired Pneumonia*

Microorganism	Community, %	Hospital, %	Intensive Care Unit, %
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	14-19	25-27	17-22
<i>Haemophilus influenzae</i>	1-4	4-8	3-5
<i>Legionella</i> spp.	2	3-4	8-10
<i>Staphylococcus aureus</i>	0-0.2	1-3	3-7
Gram negative bacteria-Enterobacteriaceae	0-0.4	3-5	5-7
Virus	12-15	10-12	4-6
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	0-12	3-5	—
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	16-22	6-8	—
No pathogen identified	44-60	37-44	41-42

Semin Respir Crit Care Med 2012;33:220-231.

Nuevos métodos diagnósticos más sensibles
Nuevos métodos moleculares independientes de secuencia (NGS)

Vacunación: *S. pneumoniae*, *H. influenzae B* (menor %)



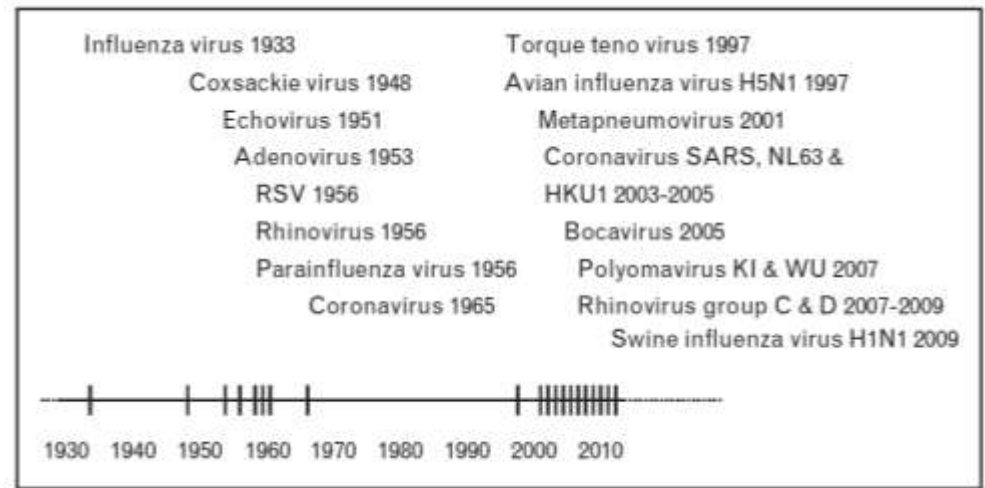
Infección Respiratoria. **Agentes etiológicos / infección respiratoria.**

Los virus respiratorios más comunes asociados a infección respiratoria son:

- **Virus de la gripe** (A, B y C)
- **Virus respiratorio sincitial** (VRS-A y B)
- **Virus parainfluenza** (HVPI-1, 2, 3, 4a, 4b)
- **Coronavirus** (HCoV-229E, NL63, OC43, HKU1)
- **Enterovirus** (HEVA, B, C y D)
- **Rinovirus** (HRV-A, B y C)
- **Parechovirus** (HPeV1-6)
- **Adenovirus** (HAdVA-F)
- **Metapneumovirus** (HMPVA y B)
- **Bocavirus** (HBoV1-4)
- **Poliomavirus** (PyV KI y WU)

Otros virus con menor frecuencia:

- Virus varicela-zoster
- Hantavirus
- Virus de Epstein Barr
- Herpesvirus 6 y 7
- Virus del herpes simple
- Mimivirus
- Citomegalovirus (CMV)
- Virus del sarampión



Infección Respiratoria. Agentes etiológicos / infección respiratoria.

Table 1. Prevalence of respiratory virus infections using molecular methods in studies conducted in several countries.

Virus	Prevalence (%)	Number of studies	Number of countries	Ref.
Influenza	6–40	7	5	[9–11,13–17,73]
Parainfluenza virus types 1–4	15–30	4	4	[6,34–37,62,64,73,81,175]
RSV	10–30	4	4	[69–71,73,79,83,142]
Adenovirus	2–4	4	4	[73,85–91,93,94]
hMPV	1–30	18	10	[763,73,151–165]
HCoV OC43	5–30	5	4	[73,177,178,197,202]
HCoV 229E	1–5	3	3	[73,179,180,198,202,205]
HCoV NL63	1–9	12	9	[73,186,187,190,197,200–203]
HCoV HKU1	1–11	9	8	[73,192,193,196,197,202–204]
Bocavirus	2.1–11.3	14	12	[773,206–216]
Rhino/Entero	12–45	6	5	[773,119–125,137–144]
Polyomavirus WU/KI	1–5	3	3	[217–223]
Parvovirus 4/5	Unknown	2	2	[224,225]

HCov: Human coronavirus; hMPV: Human metapneumovirus; RSV: Respiratory syncytial virus.
Expert Rev. Anti Infect. Ther. 8(11), 1273–1292 (2010)

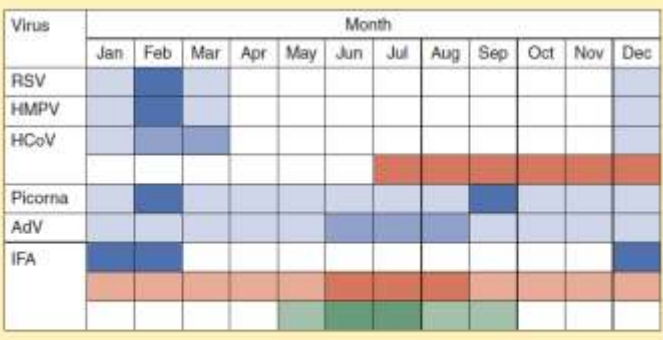


Figure 1. Schematic overview of respiratory virus seasonality. Intensity of color represents number of positive detections. Blue: temperate regions, Northern Hemisphere. Green: temperate regions, Southern Hemisphere. Red: tropical regions. AdV: Adenoviruses; HCoV: Human coronaviruses; HMPV: Human metapneumovirus; IFA: Influenza virus A; RSV: Respiratory syncytial virus.
Expert Rev. Anti Infect. Ther. 9(8), 615–626 (2011)

Cualquier virus respiratorio es capaz de causar infección de TRI.

Factores importantes a tener en cuenta y que pueden afectar a su prevalencia en NAC:

- Prevalencia.
- Estacionalidad.
- Edad / Comorbilidades.

Tabla 3. Etiología vírica de los síndromes respiratorios en niños

Virus	Catarro común	Faringitis	Laringotraqueo-bronquitis (croup)	Neumonía	Bronquiolitis
Virus respiratorio sincitial	3+	2+	2+	4+	4+
Virus parainfluenza 1	2+	2+	4+	2+	2+
Virus parainfluenza 2	2+	+	+	+	+
Virus parainfluenza 3	2+	2+	2+	3+	3+
Virus parainfluenza 4	2+	+	+	+	+
Metapneumovirus humano	2+	2+	+	+	3+
Virus influenza A	2+	2+	2+	3+	3+
Virus influenza B	2+	2+	+	+	+
Rinovirus	2+	2+	+	+	+
Coronavirus	+	+	+	+	+
Enterovirus	+	+	+	+	+
Adenovirus	2+	2+	+	+	+
Bocavirus humano	2+	2+	+	2+	3+

Símbolos de frecuencia relativa: + (caso aislado), 2+ (pequeña proporción de casos), 3+ (proporción considerable de casos), 4+ (mayoría de casos).

Tabla 2. Etiología vírica de los síndromes respiratorios en adultos

Virus	Catarro común	Faringitis	Traqueobronquitis	Neumonía
Virus respiratorio sincitial	+	+	+	-
Virus parainfluenza 1	+	+	+	-
Virus parainfluenza 2	+	+	+	-
Virus parainfluenza 3	+	+	+	-
Virus parainfluenza 4	+	+	+	-
Metapneumovirus humano	+	+	+	-
Virus influenza A	+	2+	3+	2+
Virus influenza B	+	2+	2+	+
Rinovirus	4+	2+	+	+
Coronavirus	+	+	+	+
Enterovirus	+	+	+	+
Adenovirus	+	+	+	+

Símbolos de frecuencia relativa: + (caso aislado), 2+ (pequeña proporción de casos), 3+ (proporción considerable de casos), 4+ (mayoría de casos).

Virus zoonóticos (cruzan barrera interespecie – adaptación):

- Causa de brotes epidémicos (c/ o s/ estacionalidad)
- Causa de enfermedad respiratoria grave (casos esporádicos).

Subtipos A(**H5N1**), A(**H3N2**)v, A(**H7N9**), A(**H5N1**), A(**H5N8**)

SARS-CoV

MERS-CoV

EV-D68

HAdV-14

Virus respiratorios humanos:

Desconocidos hasta el momento: se ha revelado o se revelará su presencia con los nuevos métodos moleculares de diagnóstico.

Infección Respiratoria. **Toma de la muestra.**

Importante: Determina en buena medida la sensibilidad de una técnica.

Factores a tener en cuenta:

- **Localización:** tracto respiratorio superior (TRS) / inferior (TRI).

Sensibilidad (TRS): ANF > FNF >> FOF / FF / FN

FF = frotar vigorosamente a nivel de amígdalas y faringe posterior.

FN = introducir en cavidad nasal por cada fosa c/ mismo escobillón, dejar unos segundos y retirar lentamente (no moco)

Virus con gran tropismo TRI (MERS-CoV): TRS (-) / TRI (+), posible.

- **Días desde el inicio de los síntomas:**

A más días desde +0, menor excreción viral.

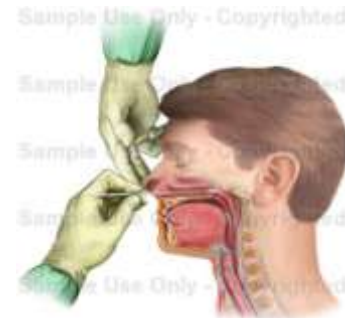
- **Conservación:**

Recomendado: MTV (SBF, antibióticos, antifúngico, indicador pH).

Sino, escobillón seco con 1 mL solución salina estéril.

Si ANF, BAL, BAS o esputo, en recipiente estéril.

Condiciones: +4 - +8 °C, 24 – 48 h.



Infección Respiratoria. **Métodos de diagnóstico microbiológico.**

En la mayoría de los casos, la **inespecificidad del cuadro clínico** hace necesaria la realización de un **diagnóstico microbiológico** para determinar el agente etiológico.

Características Principales:

Rápido: herramienta apropiada en el manejo temprano de la infección.

Preciso: permite determinar el agente etiológico causal.

Tratamiento antiviral, si es posible. Cambio pauta antibiótica.

Medidas de control para evitar transmisión nosocomial.

Reducir coste pruebas diagnósticas adicionales.

Más información (+ caracterización genética / fenotípica, + info clínica):

- Presentación clínica asociada.

- Coinfecciones virales / bacterianas asociadas (pronóstico)

- Gravedad / grupos de riesgo.

- Estacionalidad / vigilancia.

- Diseño de vacunas / antivirales (gripe, VRS, hAdV, ...)

Los métodos de diagnóstico aplicado a la infección respiratoria viral son:

- Aislamiento en cultivo celular.
- Detección de antígeno viral.
- Métodos serológicos.
- Métodos moleculares:
 - Basados en amplificación por PCR.
 - Secuenciación Sanger.
 - Next-Generation Sequencing (NGS), entre otros.

Métodos de diagnóstico microbiológico. **Aislamiento en cultivo celular**

Se basa en la replicación del virus en una monocapa celular susceptible de ser infectada. La identificación viral se realizará mediante características fenotípicas del efecto citopático, o bien mediante otros métodos de diagnóstico (IFI, IHA, ...).

Desventajas:

- Gran consumo de recursos, humanos y materiales.
- Limitada sensibilidad.
- Tiempo para la obtención de un resultado (3 – 21 días).
- Competencia con la implantación coste-efectiva de las técnicas moleculares.
- No permite el aislamiento de algunos virus, tales como HMPV, HPIV-4 y HRV-C.
- Requiere de una muestra bien recogida, y conservada en condiciones óptimas.
- Difícil aislamiento de virus del paciente con tratamiento antiviral.

Sin embargo, también tiene **ventajas** (laboratorios de referencia):

- Permite confirmar viabilidad del virus (replicación activa).
- Elevada especificidad y buena reproducibilidad.
- Permite el aislamiento y su utilización para estudios posteriores.
- No es dependiente de secuencia: permite detectar virus, aún con divergencia genética (*).

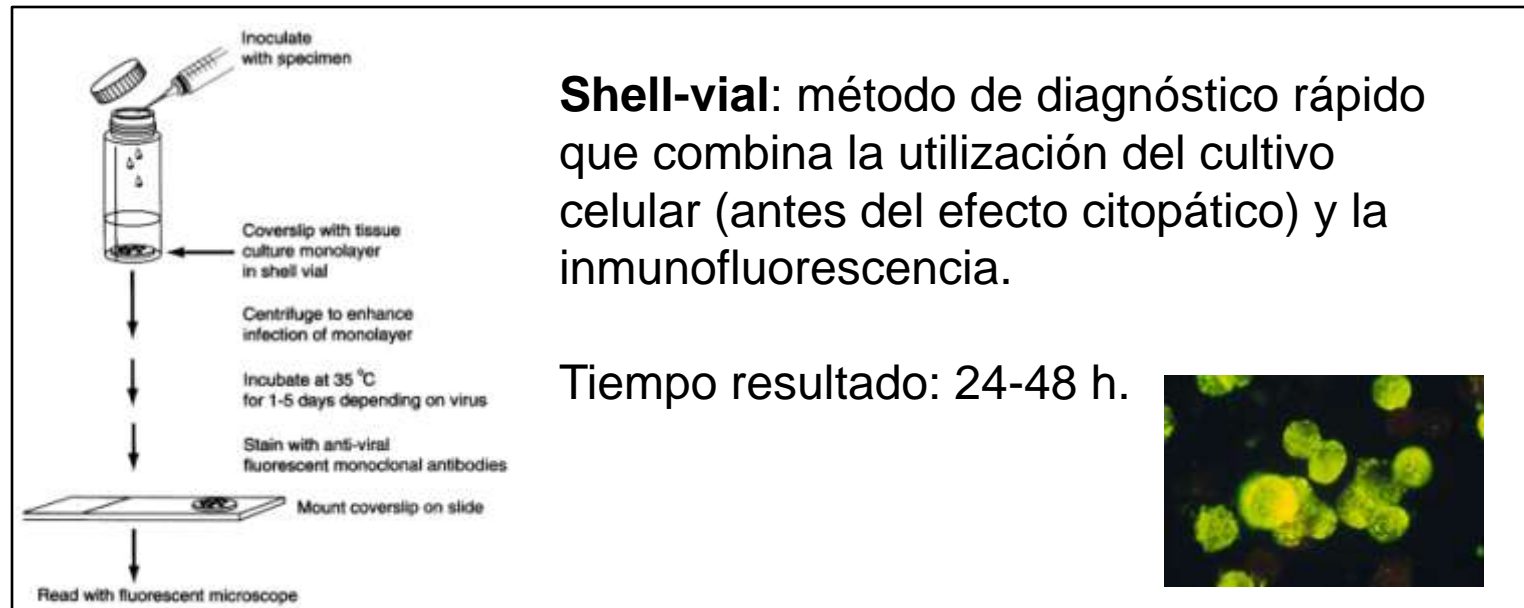
Métodos de diagnóstico microbiológico. **Aislamiento en cultivo celular**

Tabla 7

Virus respiratorios, líneas celulares y tiempo de observación de efectos citopáticos

Virus respiratorio	Tipo de línea celular	Observación de efecto citopático
VRS	Hep-2 Células primarias de riñón de mono. Fibroblastos humanos	3-7 días
<i>Metapneumovirus</i> humano	Células terciarias de riñón de mono. LLC-MK2. VERO. Hep-2	3-7 días
<i>Parainfluenza</i> humano	LLC-MK2, VERO, NCI-H292 medio con tripsina PIV1 y 2 no para PIV3	Más de 10 días
Adenovirus	Hep-2, HeLa	
Rinovirus	Fibroblastos, He-La	

Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27(3):168-177



Métodos de diagnóstico microbiológico. **Detección de antígeno viral.**

Métodos basados en la detección directa/indirecta del antígeno viral utilizando anticuerpos monoclonales (inmunocromatografía capilar, enzimoimmunoanálisis o inmunofluorescencia).

Presentan menor sensibilidad que los métodos moleculares

No se recomienda su utilización en muestras de paciente adulto:

- menor carga viral,
- periodo de excreción menor,
- menor rendimiento en la recogida de la muestra (hidratación).

Inmunofluorescencia (IF):

Detección directa o indirecta de los antígenos virales mediante anticuerpos marcados con fluoresceína (microscopio fluorescencia).

- Permiten detectar: VGA, VGB, HAdV, HVPI-1, 2, 3, VRS y HMPV.

No detecta: BoV, CoV (229E, OC43, NL63 y HKU-1), HVPI-4 y HRV

- Tiempo requerido: 60 - 120 minutos, aprox. desde la recepción de muestra.
- Bajo coste de los reactivos.
- Sensibilidad [vs. Métodos moleculares]: limitada (50-80 %). Especificidad elevada (personal entrenado), aunque posibles reacciones cruzadas.

Métodos de diagnóstico microbiológico. **Detección de antígeno viral.**

Premisa: aunque un diagnóstico preciso y completo es deseado, un diagnóstico rápido y específico va a permitir tomar decisiones a tiempo sobre el manejo del paciente.

Métodos rápidos (POC, Point-Of-Care):

- Basados en inmunocromatografía / enzimoimmunoanálisis: fácil lectura.
- Resultado rápidos (15 minutos, aproximadamente) s/ equipo adicional.
- Principalmente orientados a VRS y gripe.

Para los virus de la gripe no se recomienda su utilización, ya que incluso presenta diferencias significativas de sensibilidad y especificidad dependiendo del subtipo.

- Valores de sensibilidad (10-75%) y especificidad (50-100%) limitados.

Sencilla utilización, pero muy subjetivo (dependiente de experiencia). Por ello se recomienda su utilización por personal experimentado (microbiología 24/7, bajo sistema de calidad implantado, y con posibilidad de otras pruebas complementarias si resultado negativo).

- Valor predictivo positivo elevado en periodos epidémicos.
- Solo para muestras de TRS (aspirados o frotis nasofaríngeos).



Métodos de diagnóstico microbiológico. **Detección de antígeno viral.**

Studies comparing point-of-care tests (POCTs) by non-laboratory personnel and laboratory test results

Target	POCT device	Population	Testing personnel	Sensitivity/specificity (%) (gold standard laboratory test)	Ref.
RSV	Binax NOW (Binax Inc., Portland, ME, USA)	Paediatric	Trained nurse-led service	41.2/100 (PCR)	35
RSV	Binax Now	Paediatric	Paediatric A&E staff	87/94 (direct immunofluorescence)	46
RSV	Binax Now	Paediatric	Emergency department staff	83/83 (PCR)	47
Influenza	QuickVue (Quidel, San Diego, CA, USA)	Paediatric	Trained nurses	82/99 (cell culture and/or PCR)	68
Influenza	MSD (Meso Scale Diagnostics, Gaithersburg, MD, USA)	All age ranges	Trained medical staff	74/99 (PCR)	70
Influenza	QuickVue	Hajj pilgrims (all ages)	Trained medical staff	22/99 (PCR)	33
Influenza and RSV	QuickVue	Paediatric	Trained medical staff	62.7/98 (influenza) (PCR) 67.8/98.5 (RSV) (PCR)	69
Group A streptococcus	Signify Strep A (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA)	Paediatric	Paediatric hospital staff	56–90% / >97 (sensitivity dependent on training) (laboratory staff results using POCT)	10
Dengue	DENV NS1 Ag (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)	Patients with fever at an airport	Trained airport staff	77.3/100 (based on a combination of PCR/POCT and IgM)	71

RSV, respiratory syncytial virus; PCR, polymerase chain reaction; A&E, accident and emergency.

Journal of Hospital Infection 85 (2013) 1e7



Métodos de diagnóstico microbiológico. **Métodos serológicos.**

Tabla 10 Características diferenciales de las técnicas utilizadas en los estudios seroepidemiológicos de la infección respiratoria viral

	Ventajas	Desventajas
Fijación del complemento	Permite demostrar la circulación de virus de diferentes tipos (p. ej., gripe A y gripe B)	Baja sensibilidad Laborioso Difícilmente reproducible
Inhibición de la hemaglutinación	Establece la presencia de anticuerpos frente a diferentes tipos e incluso subtipos de virus (p. ej., gripe A H3N2, gripe A H1N1)	Falsos (+) por presencia en el suero de reactivos inespecíficos Realización e interpretación compleja y subjetiva Escasa reproducibilidad entre laboratorios Poco sensible
Inmunofluorescencia indirecta y ELISA	Técnicas relativamente sencillas y rápidas	Numerosas reacciones cruzadas entre virus relacionados por los que su aplicación es muy limitada
Neutralización	Los títulos de los anticuerpos neutralizantes son fiables y representan el estado real de protección	Sólo aplicable a virus respiratorios capaces de crecer en cultivos celulares

Tomada de Calvo et al⁷³.

An Pediatr (Barc). 2012;76(3):162.e1---162.e18

Se reduce su utilización a estudios sero-epidemiológicos.

Laboratorios de referencia: estandarización, robustez, disponibilidad de reactivos.

Métodos de diagnóstico microbiológico. **Métodos moleculares (PCR).**

Demostración de la presencia de un virus respiratorio a partir de la detección de su material genético (ARN / ADN): PCR simple, PCR multiple, Nested-PCR, PCR en tiempo real, NASBA, LAMP, PCR+microarrays, PCR+EIA

Ventajas:

- Rápido.
- Elevada sensibilidad (hasta 5 veces superior a det. antígeno).
- Identificar / detectar diferentes dianas (diferentes canales) (multiplex).
- Posibilidad de detectar mutaciones puntuales, p. ej. asociadas a resistencia.
- Realizar estudios de epidemiología molecular (identificar clonalidad).
- No se ve afectado por pequeñas concentraciones residuales de antiviral.
- Capacidad para detectar virus no viables (*).
- Posibilidad de automatización: menor coste humano, menos errores.

Inconvenientes:

- Presencia de inhibidores.
- Exige ser revisado de forma periódica para evitar pérdida de sensibilidad por acumulación de mutaciones en las regiones diana (iniciadores y sondas) en cepas circulantes (problema: sistemas comerciales).
- Elevado coste vs. métodos detección de antígeno (IF).

Métodos de diagnóstico microbiológico. **Métodos moleculares (PCR).**

TABLA 2. Características de los métodos moleculares disponibles para detectar virus gripales

Método	Ventajas	Desventajas
PCR simple	Sensible y específico Permite análisis posteriores del producto amplificado	Una diana por ensayo
PCR múltiple	Sensible y específico Permite detectar más de una diana por ensayo y el análisis del producto amplificado	Los métodos no comerciales requieren una optimización exhaustiva para asegurar la ausencia de falsos negativos y la competición entre iniciadores
PCR-EIA	Sensible y específico Elevado rendimiento Puede ser múltiple	No permite el análisis posterior de los productos Requiere evaluación y validación minuciosa antes de la rutinización
PCR en tiempo real	Sensible y específico Rápido Permite cuantificar Puede ser múltiple	Requiere equipamiento específico No siempre es posible el análisis del producto La capacidad de analizar varios genes o patógenos en formato múltiple está limitada por las características del termociclador
NASBA	Sensible y específico Permite cuantificar	Utiliza 3 enzimas Procedimiento largo y costoso No siempre es posible el análisis del producto
Microarrays	Sensible y específico Detección de muchas dianas en un solo ensayo	Requiere equipamiento específico y amplio desarrollo No permite el análisis posterior de los productos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; PCR-EIA: PCR acoplada a enzimoimmunoanálisis.

Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26 Supl 9:15-25

Métodos rápidos:

VENTAJAS

- Simplicidad de uso
- Extracción + PCR + lectura
- Resultado rápido.
- Alta sensibilidad / especificidad.

INCONVENIENTES

- Coste elevado.
- Patógeno-específico.



Métodos de diagnóstico microbiológico. **Métodos moleculares (PCR).**

Table 2. Desirable and Essential Attributes of Molecular Diagnostic Platforms for the Pneumonia Etiology Research for Child Health Project

Desirable	Essential
Flexibility to modify existing targets or incorporate new ones	Ability to detect target pathogens
Ease of use, workflow, and space	Demonstrated high analytical sensitivity and specificity
Rapid turnaround times	Demonstrated high clinical sensitivity and specificity
Nucleic acid extraction procedure included in overall process (and automated)	Ability to process a variety of respiratory tract specimens
Small specimen volume requirements	Specimen collection requirements well-characterized and suitable for field studies
Readily available reagents with long expiry dates and room-temperature storage requirements	Inclusion of control specimens and quality control procedures
Capacity to provide quantitative or semiquantitative results	Available maintenance and support
Licensed with an accreditation authority	Acceptable time frame for development
Comprehensive cost information available	

Presencia = ¿infección activa o colonización?

- En un paciente sintomático, un resultado positivo puede ser:
 - Agente causal de la infección sintomática (VG, VRS, HMPV)
 - Agente causal de una infección asintomática (RV)
 - Excreción prolongada de infección pasada (hBoV, RV)
 - Infección latente o colonización.
- En un paciente asintomático, un resultado positivo (TRS / TRI) puede ser:
 - Es realmente una infección asintomática (persistencia prolongada).
 - Infección incipiente.
 - Presenta signos y síntomas no reconocidos o no habituales.

Co-infecciones o Co-detecciones (10-50 %)

Asociados a mayor gravedad (controversia) → ¿PCR cuantitativa?
Posibles asociaciones: determinadas por estacionalidad / prevalencia.

Solución: estudios de prevalencia comparando población sintomática – asintomática.

PCR cuantitativa

Sería necesario realizar la estandarización de una técnica de PCR cuantitativa aplicada a la determinación de la carga viral en muestra respiratoria, de modo que los resultados pudieran ser comparables, para poder extrapolar diferencias observables en la carga viral en relación a:

- Determinar un valor presuntivo de infección viral activa (valor umbral),
Importante en co-detecciones – Excreciones prolongadas
- Monitorizar su evolución correlacionada con la gravedad,
- o bien la respuesta frente al tratamiento antiviral.

Carga viral también requiere estandarización protocolo recogida de la muestra.

Métodos de diagnóstico microbiológico. **Tratamiento antiviral / profilaxis.**

	Treatment	Prevention
Influenza A and B viruses	Oseltamivir (oral); zanamivir (inhalation, intravenous); peramivir (intravenous)	Vaccines (inactivated, live); oseltamivir; zanamivir
Influenza A virus	Amantadine (oral); rimantadine (oral)	..
Respiratory syncytial virus	Ribavirin (inhalation, intravenous)	Palivizumab (intramuscular)
Adenovirus	Cidofovir (intravenous)	Vaccine for types 4 and 7*
Rhinovirus	Pleconaril†	Alfa interferon (intranasal)
Enteroviruses	Pleconaril†	..
Human metapneumovirus	Ribavirin (intravenous)	..
Hantavirus	Ribavirin (intravenous)	..
Varicella-zoster virus	Aciclovir (intravenous)	Vaccine

*Long successful use in US military conscripts, no production now. †Has been used for compassionate cases.

Table 3: Possibilities for antiviral treatment and prevention of severe viral pneumonia

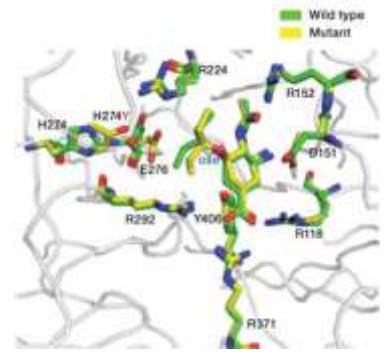
F. Pozo et al. / Journal of Clinical Virology 57 (2013) 5–12

Lancet 2011; 377: 1264–75

Table 1
Amino acid substitutions associated with altered antiviral susceptibility of influenza viruses recovered from surveillance and/or clinical cases.

Virus type and subtype	Amino acid substitutions ^a associated with reduced inhibition (RI) for		highly reduced inhibition (HRI) for		M2 ion-channel blockers in M2
	Oseltamivir in NA	Zanamivir in NA	Oseltamivir in NA	Zanamivir in NA	
A(H1N1) and A(H1N1)pdm09	I223K (I222K) I223R (I222R)	I223R (I222R)	Y155H (Y155H) H275Y (H274Y) N295S (N294S)	Y155H (Y155H)	L26F V27A A30T S31N G34E
A(H3N2)		E119I R292K	E110V E119I R292K N294S		L26F V27A A30T S31N G34E
B	D197N (D198N) D197E (D198E) D197Y (D198Y) I221V (I222V) I221T (I222T)	D197N (D198N) D197E (D198E) D197Y (D198Y) I221T (I222T) R374K (R371K)	R150K (R152K) R374K (R371K)	R150K (R152K)	N/A ^b

^a In bold the most prevalent amino acid substitutions; in parentheses the residue position in N2 NA numbering.
^b Not applicable as M2 ion-channel blockers do not act against type B influenza viruses.



Métodos de diagnóstico microbiológico. **Tratamiento antiviral / profilaxis.**

Funciones del laboratorio:

- Detectar resistencia a los antivirales (INAs, adamantanos) en el paciente con tratamiento antiviral sin negativizar:
¿PCR es demasiado sensible?

Cambio tratamiento antiviral.

Evitar transmisión cepa resistente en hospital y en la comunidad.

- Monitorizar estado de la resistencia en cepas circulantes (antivirales, Palivizumab) durante la temporada.

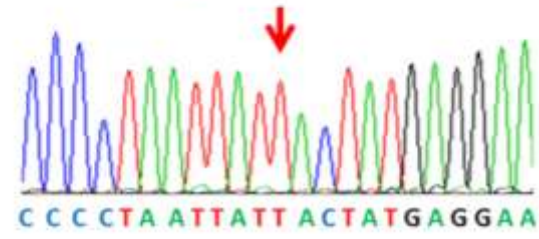
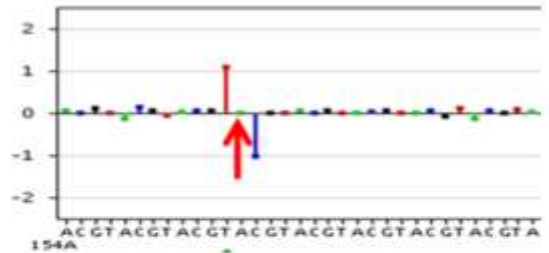
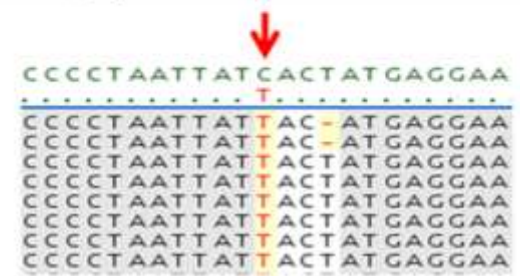
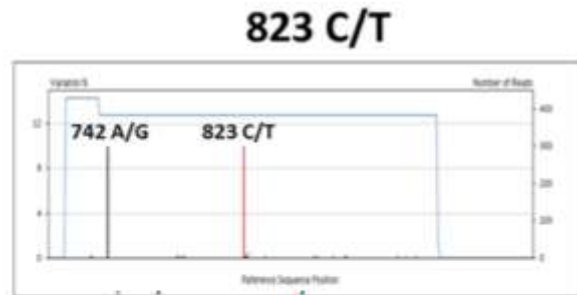
Ensayos genotípicos: secuenciación sanger ($\geq 20\%$), NGS ($< 20\%$), SNP-PCR.

Ensayos fenotípicos (lab. Referencia): virus – [antiviral]

- Detección variantes gripales con diferencias antigénicas a las cepas vacunales.

Secuenciación (HA / NA) – Análisis filogenético.

IHA (antisueros y antígenos referencia)

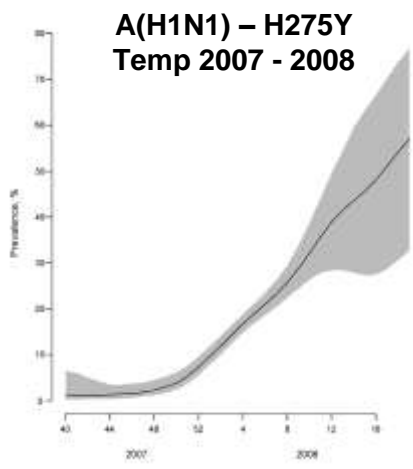
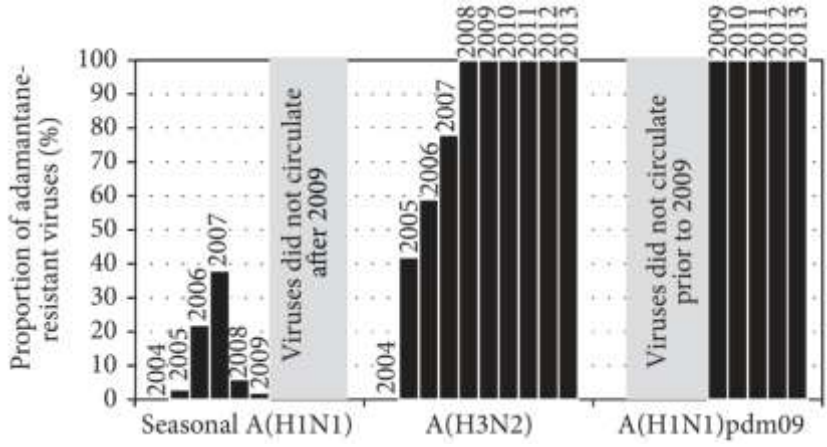


Resistencia antivirales (gripe). Estado actual.

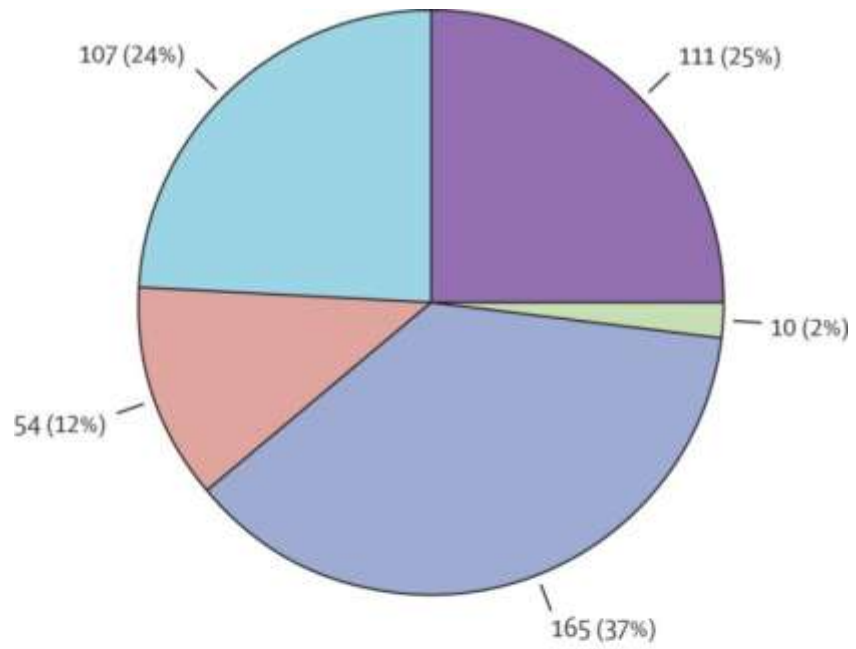
Table 1. Characteristics of recent globally circulating human influenza viruses: 2003–2011

Type/subtype	Drug susceptibility profile (molecular marker)			Circulated during 2008–2009	Circulated during 2010–2011	Circulated in absence of drug	Retained virulence
	M2 blockers	Oseltamivir	Zanamivir				
H1N1pdm09	R (S31N)	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
A/H1N1, clade 2A (seasonal)	S	S	S	Yes	No	Yes	Yes
A/H1N1, clade 2B (seasonal)	S	R (H274Y)	S	Yes	No	Yes	Yes
A/H1N1, clade 2C (seasonal)	R (S31N)	S	S	Yes	No	Yes	Yes
A/H1N1, reassortants (seasonal)	R (S31N)	R (H274Y)	S	Yes	No	Yes	Unk
A/H3N2	R (S31N)	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes
B	N/A	S	S	Yes	Yes	Yes	Unk

A/H1N1pdm09, 2009 pandemic influenza (H1N1) viruses; H274Y, substitution in neuraminidase; S31N, substitution in M2; N/A, not applicable; R, resistant; S, susceptible; Unk, unknown.



Resistencia antivirales (gripe). Estado actual.



- Immunosuppressed patients exposed to antiviral drugs
- Immunosuppressed patients with no reported exposure to antiviral drugs
- Associated with drug use, including treatment and prophylaxis
- No known association with drug use, including known or suspected cases of person-to-person transmission
- Preliminary notification*

Figure: Clinical background of reported cases of oseltamivir-resistant A H1N1 2009 viruses (n=447)
 *Insufficient clinical information available or investigations ongoing, as of April, 2011.

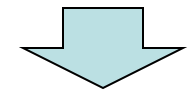
Lancet Infect Dis. 2012 Mar;12(3):240-8

Method of testing	Neuraminidase inhibitor			
	Oseltamivir	Zanamivir	Peramivir	Laninamivir
Neuraminidase inhibition assay†				
No. virus isolates tested‡	1,811	1,811	1,431	352
No. oseltamivir susceptible (mean IC ₅₀ ± SD), nmol/L	1,792	1,811	1,412	352
	(0.19 ± 0.14)	(0.18 ± 0.06)	(0.06 ± 0.02)	(0.23 ± 0.06)
No. oseltamivir resistant (mean IC ₅₀ ± SD), nmol/L	19	0	19	0
	(181.31 ± 6.83)		(177.71 ± 6.83)	
Resistance, %	1.1	0	1.3	0
Pyrosequencing§				
No. clinical specimens tested	3,157	NA	3,157	NA
No. H275 wild-type	3,117	NA	3,117	NA
No. H275 variants	40	NA	40	NA
Resistance, %	1.3	NA	1.3	NA
Total				
No. virus tested	4,968	1,11	4,586	352
No. resistant viruses	59	0	59	0
Resistance, %	1.2	0	1.3	0

*IC₅₀, 50% inhibitory concentration; NA, not applicable.
 †H275Y confirmed in virus isolate by pyrosequencing and full neuraminidase sequencing.
 ‡Most (89.6%) influenza A(H1N1)pdm09 virus isolates were characterized as A/California/7/2009-like, the influenza A (H1N1) component of the 2013–2014 Northern Hemisphere influenza vaccine.
 §Includes pyrosequencing data from New York contract laboratory and data submitted by 19 state public health laboratories in Arizona, California, Colorado, Delaware, Florida, Georgia, Hawaii, Idaho, Maine, Maryland, Massachusetts, Michigan, Minnesota, New York, Pennsylvania, Texas, Utah, Washington, and Wisconsin.

Emerg Infect Dis. 2015;21(1):136-41

Most patients infected with an oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 virus had no prior exposure to oseltamivir. These findings are consistent with **a low, and locally variable, level of circulation of resistant viruses**.



VIGILANCIA VIROLÓGICA
 (paciente hospitalizado)

Resistencia antivirales (gripe). Estado actual.

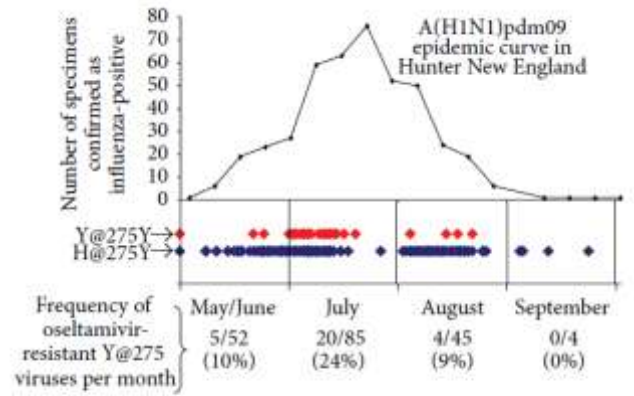
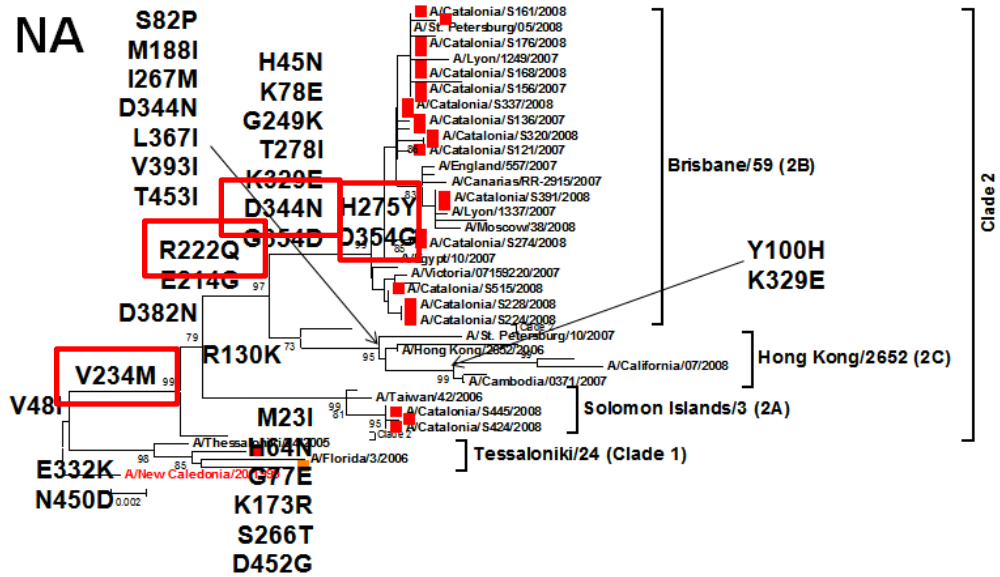
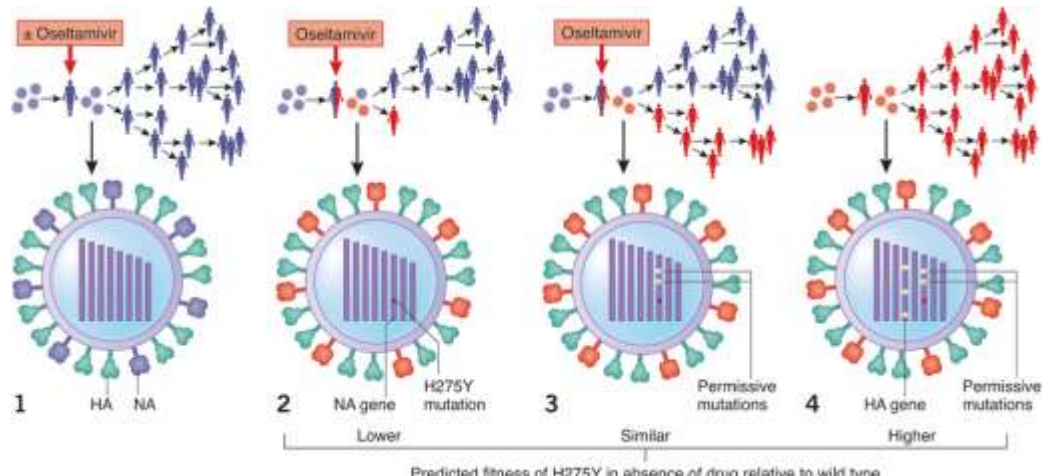
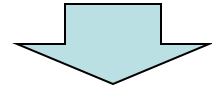


FIGURE 3: Frequency of oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 viruses (Y@275) compared to oseltamivir-sensitive viruses (H@275) in the Hunter New England region of Australia in 2011. Scientifica (Cairo). 2014;2014:430629

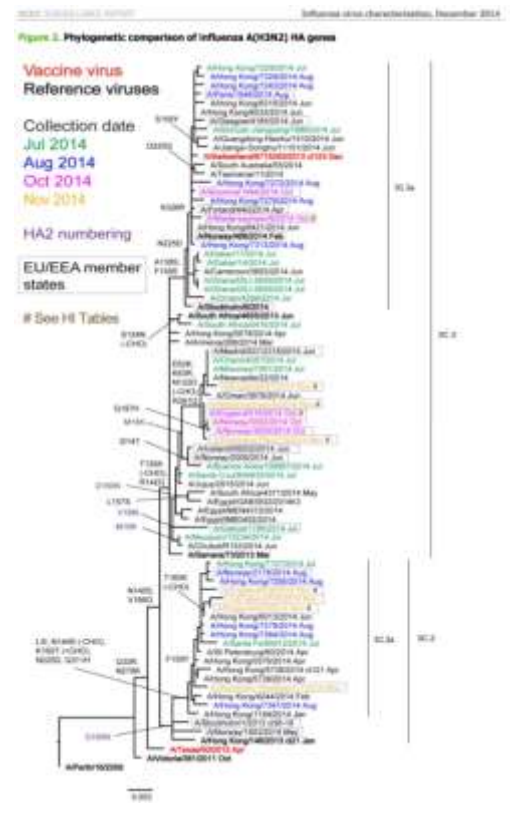
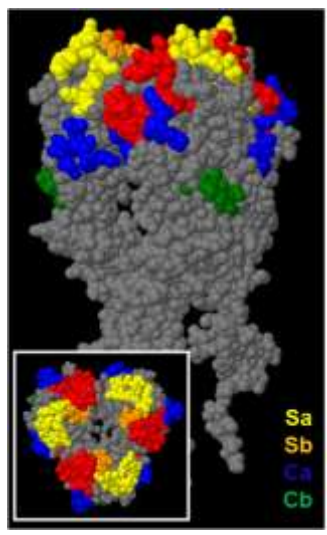
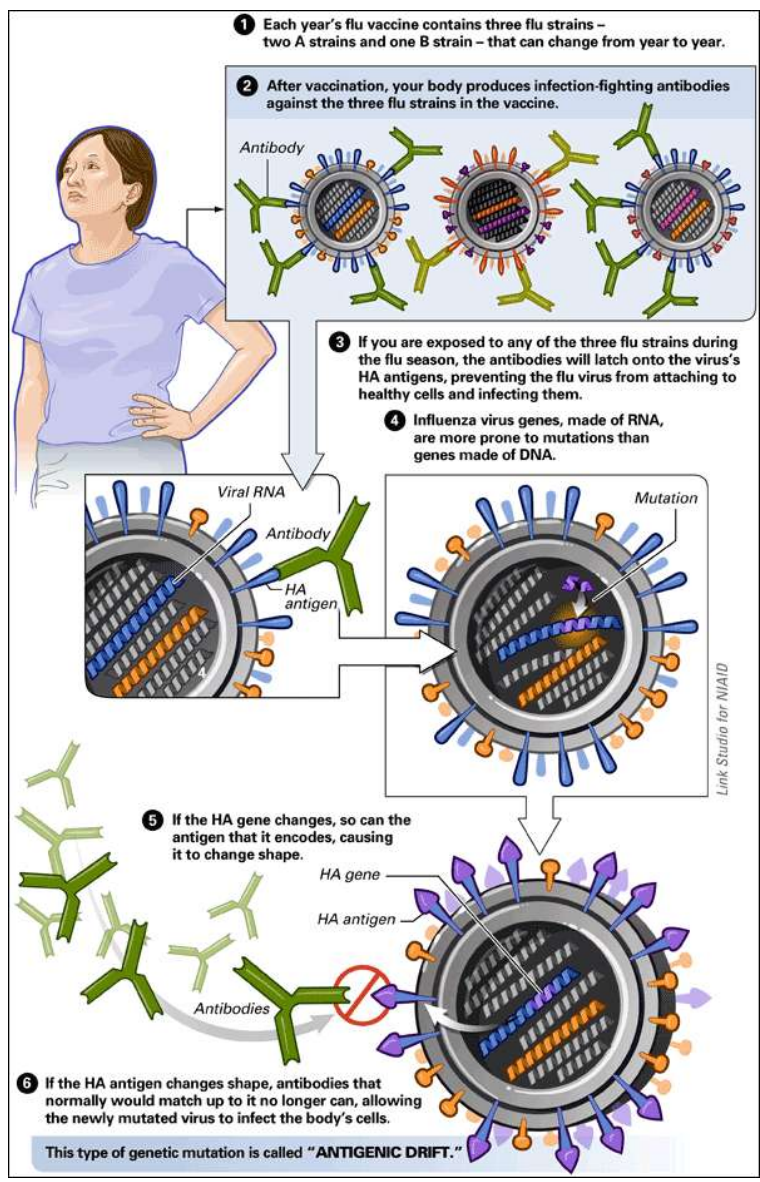
Mutaciones de Compensación (+H275Y): R222Q, V234M y D344N (ausencia de presión farmacológica)

A(H1N1)pdm09 H275Y viruses was detected among patients without prior oseltamivir exposure
V241I, N369K y N386S
 ¿mutaciones de compensación?



US A(H1N1)pdm09 2013-2014:
 All had V241I and N369K.
 ≈10% of resistant viruses and
 ≈20% of susceptible viruses had
 an additional substitution (N386K)

Métodos de diagnóstico microbiológico. **Epidemiología molecular (gripe).**



ECDC SURVEILLANCE REPORT Influenza virus characterisation, December 2014

Table 2. Antigenic analysis of A(H3N2) viruses by HI (guinea pig RBC with 20nM oseltamivir)

Strain	Collection date	Passage history	Pair-wise amino acid differences															
			A/Paris/19/2009	A/Bangkok/1/2010	A/Beijing/11/2009	A/Bangkok/1/2010	A/Bangkok/1/2010	A/Bangkok/1/2010	A/Bangkok/1/2010	A/Bangkok/1/2010	A/Bangkok/1/2010	A/Bangkok/1/2010	A/Bangkok/1/2010	A/Bangkok/1/2010	A/Bangkok/1/2010	A/Bangkok/1/2010	A/Bangkok/1/2010	
A/Paris/19/2009	03/05/09	03/05/09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
A/Bangkok/1/2010	01/01/10	01/01/10	440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
A/Beijing/11/2009	03/03/09	03/03/09	440	1280	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
A/Bangkok/1/2010	01/01/10	01/01/10	440	1280	1280	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
A/Bangkok/1/2010	01/01/10	01/01/10	440	1280	1280	440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
A/Bangkok/1/2010	01/01/10	01/01/10	440	1280	1280	440	440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
A/Bangkok/1/2010	01/01/10	01/01/10	440	1280	1280	440	440	440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
A/Bangkok/1/2010	01/01/10	01/01/10	440	1280	1280	440	440	440	440	0	0	0	0	0	0	0	0	
A/Bangkok/1/2010	01/01/10	01/01/10	440	1280	1280	440	440	440	440	440	0	0	0	0	0	0	0	
A/Bangkok/1/2010	01/01/10	01/01/10	440	1280	1280	440	440	440	440	440	440	0	0	0	0	0	0	
A/Bangkok/1/2010	01/01/10	01/01/10	440	1280	1280	440	440	440	440	440	440	440	0	0	0	0	0	
A/Bangkok/1/2010	01/01/10	01/01/10	440	1280	1280	440	440	440	440	440	440	440	440	0	0	0	0	
A/Bangkok/1/2010	01/01/10	01/01/10	440	1280	1280	440	440	440	440	440	440	440	440	440	0	0	0	
A/Bangkok/1/2010	01/01/10	01/01/10	440	1280	1280	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	0	0	
A/Bangkok/1/2010	01/01/10	01/01/10	440	1280	1280	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	0	
A/Bangkok/1/2010	01/01/10	01/01/10	440	1280	1280	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	440	0

Eficacia vacunal

Métodos de diagnóstico microbiológico. **Epidemiología molecular (gripe).**

RAPID COMMUNICATIONS

Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009-2010

A Kilander¹, R Rykkievik¹, S G Dudman¹, O Hungnes (olav.hungnes@fhi.no)¹
¹ Department of Virology, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway

LETTERS

Association of D222G substitution in haemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) with severe disease

G C Mak¹, K W Au¹, L S Tai¹, K C Chuang¹, K C Cheng¹, T C Shiu¹, W Lim (willim@paciflic.net.hk)¹
¹ Centre for Health Protection, Department of Health, Hong Kong SAR

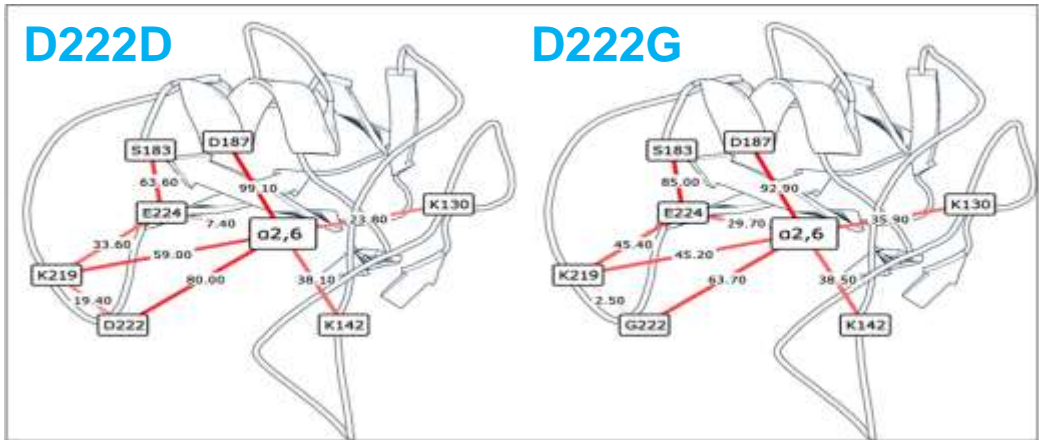
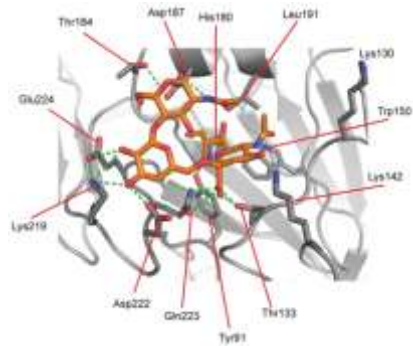
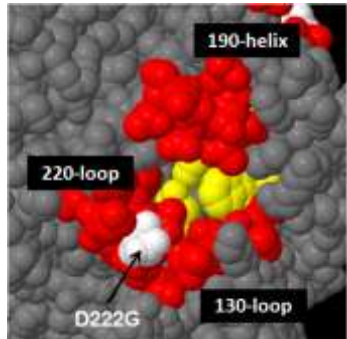
LETTERS

Occurrence of haemagglutinin mutation D222G in pandemic influenza A(H1N1) infected patients in the West of Scotland, United Kingdom, 2009-10

R S Miller¹, A R MacLean (Alasdair.Maclean@ggc.scot.nhs.uk)¹, R N Gunson¹, W F Carman¹
¹ West of Scotland Specialist Virology Centre, Glasgow, United Kingdom

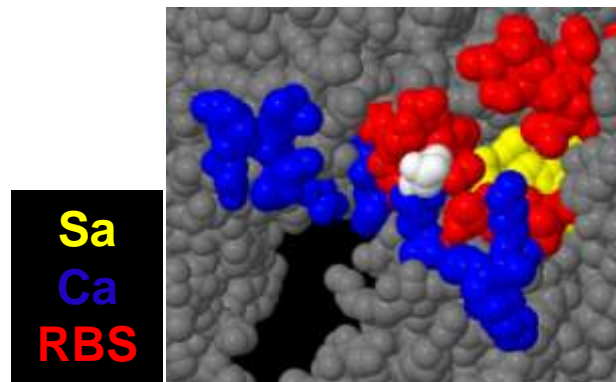
Alteración tropismo

2009-2010: D222E
 2010-2011: D222E/G



J Virol. 2010 Nov;84(22):11802-13

D222G/N en epítipo Ca (no altera antigenicidad)



Antigenic sites of influenza A (H1N1) 2009 virus

Sa					Sb					Ca					Cb																																		
124	125	153	154	155	156	157	159	160	161	162	163	164	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	137	138	139	140	141	142	166	167	168	169	170	203	204	205	221	222	235	236	237	70	71	72	73	74	75
P	N	K	K	G	N	S	P	K	L	S	K	S	T	S	A	D	Q	Q	S	L	Y	Q	N	A	P	H	A	G	A	K	I	N	D	K	G	S	S	R	D	E	P	G	L	S	T	A	S	S	

Métodos de diagnóstico microbiológico. **Epidemiología molecular (gripe).**

TABLE 2

Prevalence of haemagglutinin gene (HA1) 222 genotypes by clinical outcome (mild, severe non-fatal, fatal disease), influenza A(H1N1)pdm09 cases, Norway, 2009/10 (n=462)

HA1 222 genotype	Clinical outcome ^a					Total n (%)
	Mild n (%)	Severe non-fatal n (%)	Fatal n (%)	Severe including fatal n (%)	Unknown n (%)	
222D wild type	329 (86.4)	40 (76.9)	15 (57.7)	55 (70.5)	2 (66.7)	386 (83.5)
222G	0 (0)	5 (9.6)	8 (30.8)	13 (16.7)	0 (0)	13 (2.8)
222E	51 (13.4)	5 (9.6)	2 (7.7)	7 (9.0)	1 (33.3)	59 (12.8)
222N	1 (0.3)	2 (3.8)	1 (3.8) ^b	3 (3.8) ^b	0 (0)	4 (0.9) ^b
Total	381 (100)	52 (100)	26 (100)	78 (100)	3 (100)	462 (100)

- ^a Severe non-fatal and fatal cases are shown separately and jointly.
- ^b Additionally, one fatal 222G case harboured 222N virus as a quasispecies.

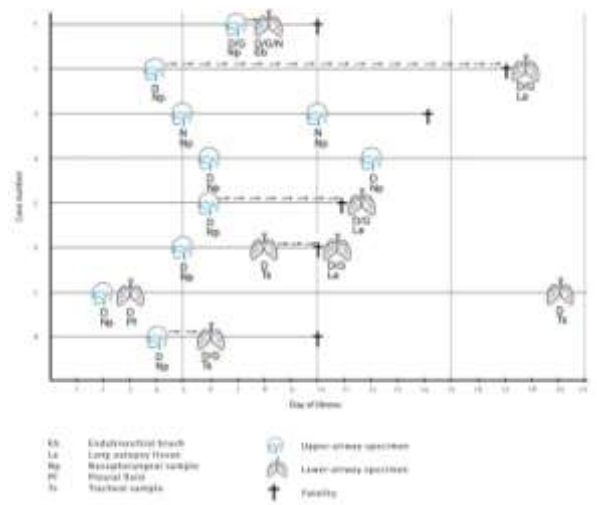
TABLE 3

Prevalence of haemagglutinin gene (HA1) 222 genotypes in paired^a upper and lower respiratory tract samples, influenza A(H1N1)pdm09 cases, Norway, 2009/10 (n=8)

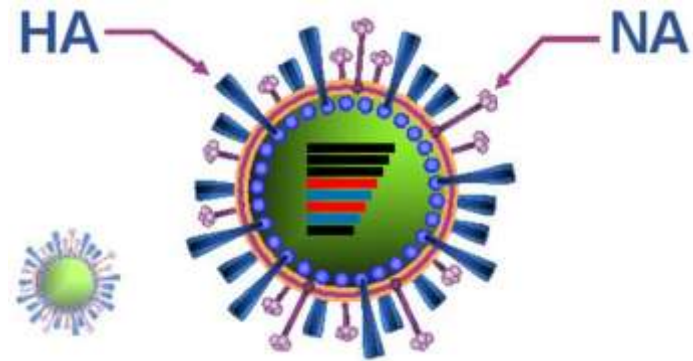
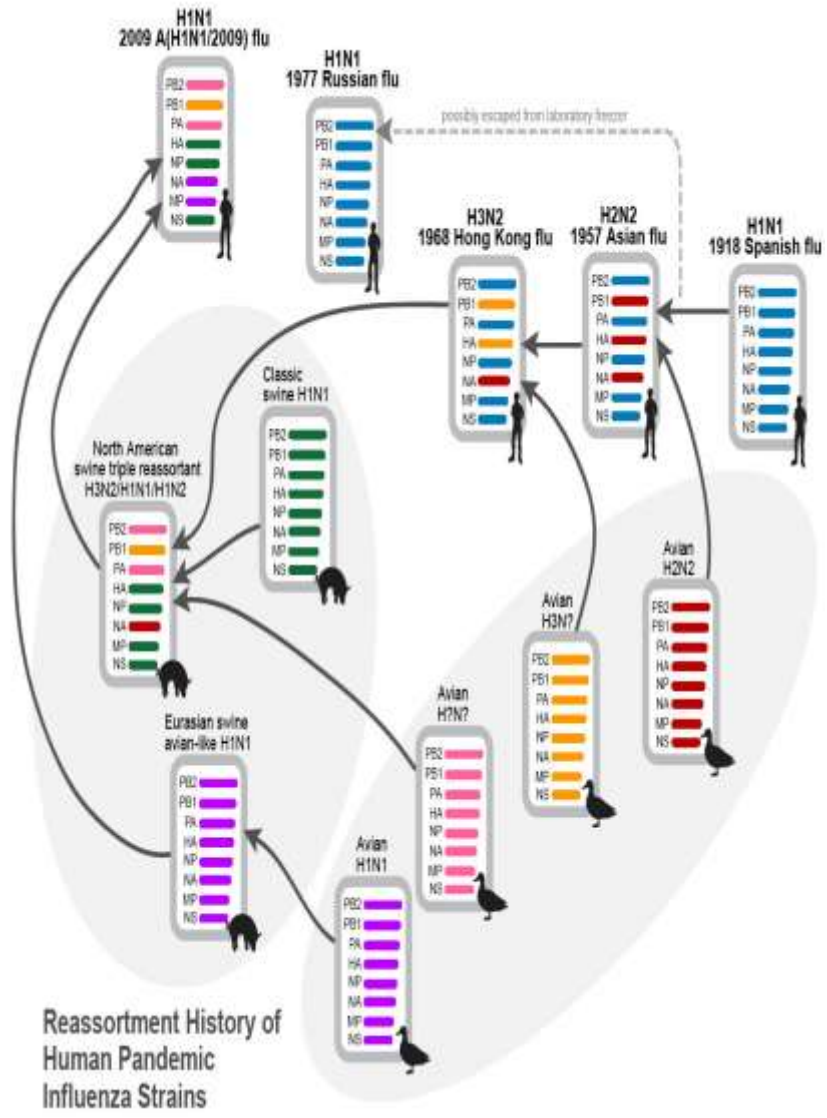
HA1 222 genotype		Number of patients
Upper respiratory tract sample ^b	Lower respiratory tract sample ^c	
222D	222D	5
222G	222G	2
222D/G mix	222D/G mix	1

- ^a The samples were collected from the same patients on the same day.
- ^b Upper respiratory tract samples included nasopharyngeal swabs/aspirates, nasal swabs and throat swabs.
- ^c Lower respiratory tract samples included tracheal aspirates and lung autopsy material.

Figure 3
Divergence of mutations in the haemagglutinin gene (HA1) through the course of illness in influenza A(H1N1)pdm09 cases with initial nasopharyngeal, Norway, 2009/10

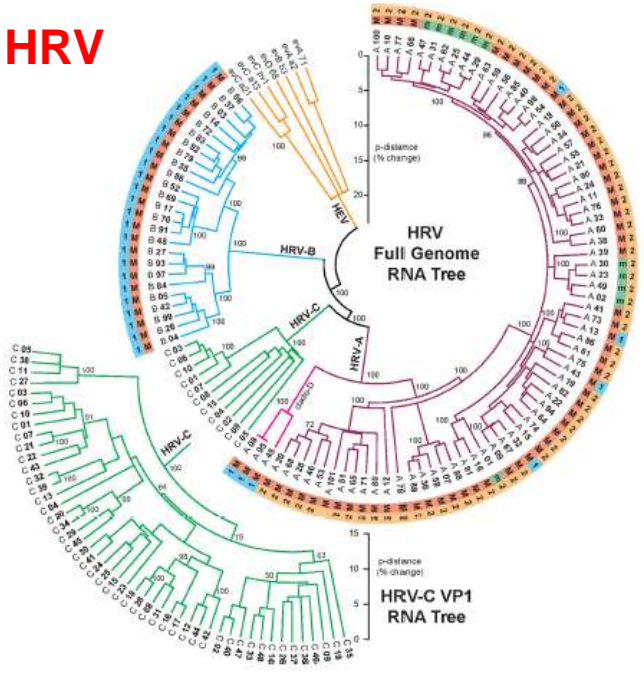


Reordenamiento

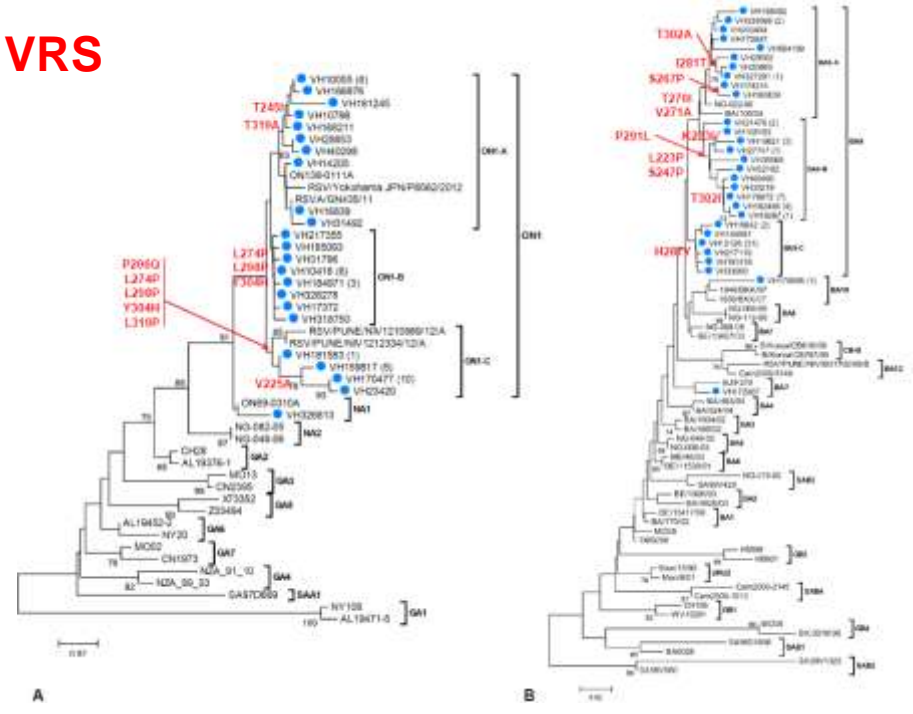


Métodos moleculares. Epidemiología molecular.

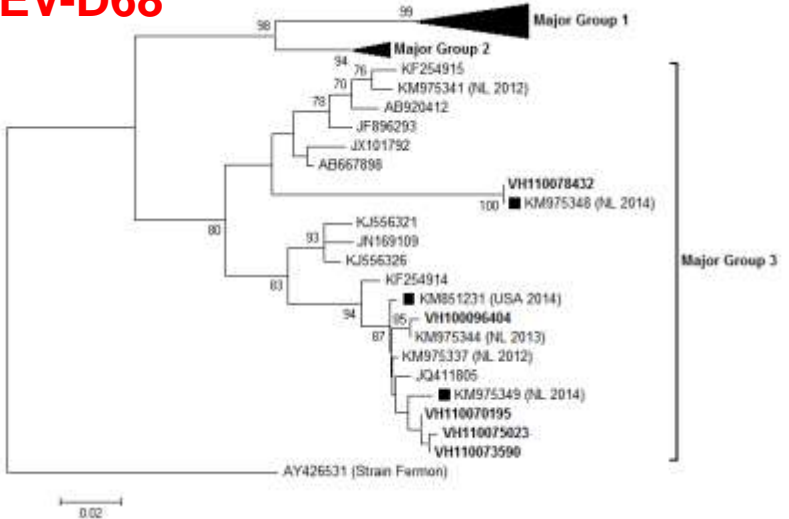
HRV



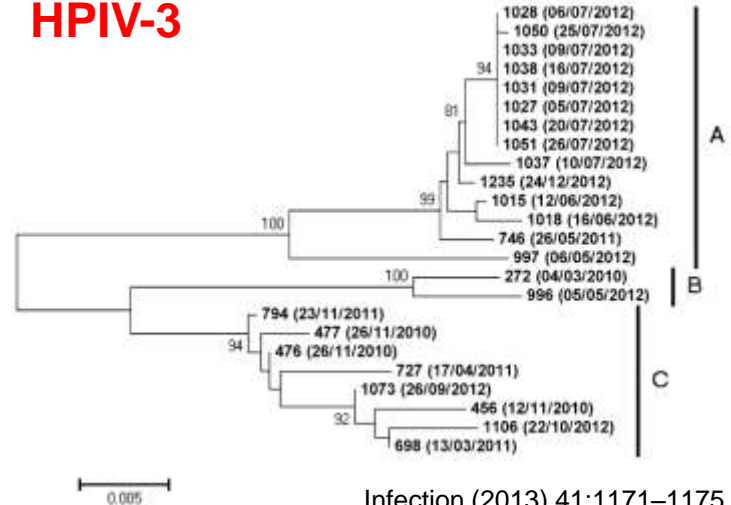
VRS



EV-D68



HPIV-3

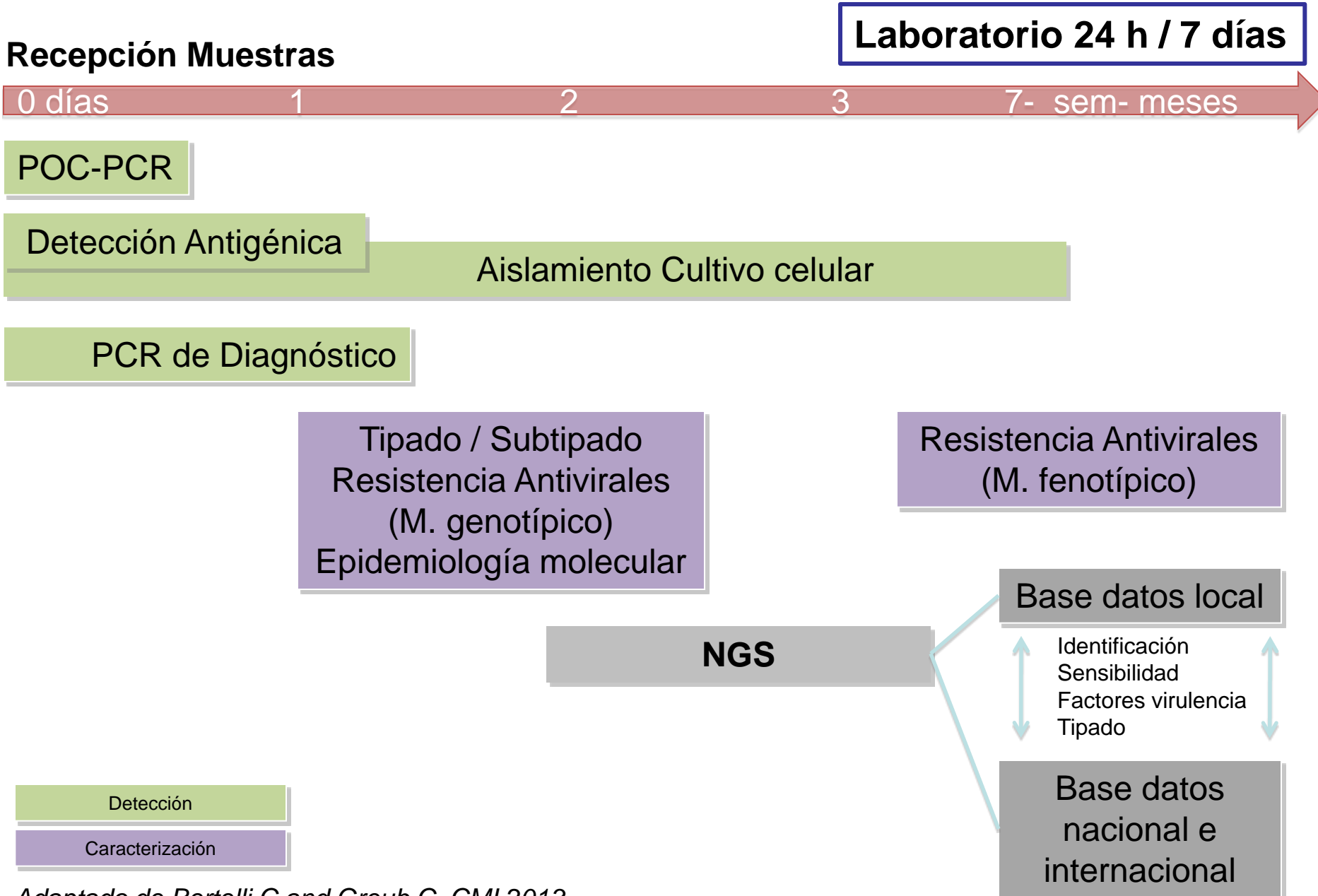


Gimferrer et al (2014). Journal of Clinical Virology (2014). In press

Gimferrer et al (2014). Enferm Infecc Microbiol Clin (2014). In press

Infection (2013) 41:1171–1175

Métodos de diagnóstico microbiológico. **Tiempo generación resultados.**



Adaptado de Bertelli C and Greub C. CMI 2013

Métodos de diagnóstico microbiológico. Conclusiones.

- Las técnicas de diagnóstico microbiológico han evolucionado hacia técnicas más sensibles y específicas, que han permitido y permitirán la identificación de nuevos agentes etiológicos. Sin embargo, no hay que menospreciar las técnicas más clásicas.
- Un diagnóstico rápido de los virus respiratorios en las primeras horas desde el inicio de los síntomas puede ser útil en la toma de decisiones en el manejo del paciente.
- Pero si además es preciso, proporcionará una valiosa información sobre el papel de los virus respiratorios en la IRA, especialmente en la neumonía.
- Por la elevada sensibilidad de los métodos moleculares, son necesarios estudios para comparar la prevalencia de los diferentes virus respiratorios, tanto en paciente sintomático como asintomático, para interpretar el papel de las coinfecciones y la gravedad clínica que pueda estar asociada.
- Un laboratorio, no sólo debe ofrecer diagnóstico de rutina, sino también identificar y caracterizar los virus circulantes para un mejor conocimiento sobre su estacionalidad, variabilidad, útil no solo a nivel clínico sino también a nivel comunitario (Salud Pública).
- Se deben invertir los máximos esfuerzos y recursos en el diseño de nuevos antivirales y vacunas frente a los virus respiratorios más prevalentes, y con mayor impacto clínico en determinadas cohortes de pacientes (inmunodeprimidos).