



Flujo de trabajo del diagnóstico virológico en el Centro nacional de gripe

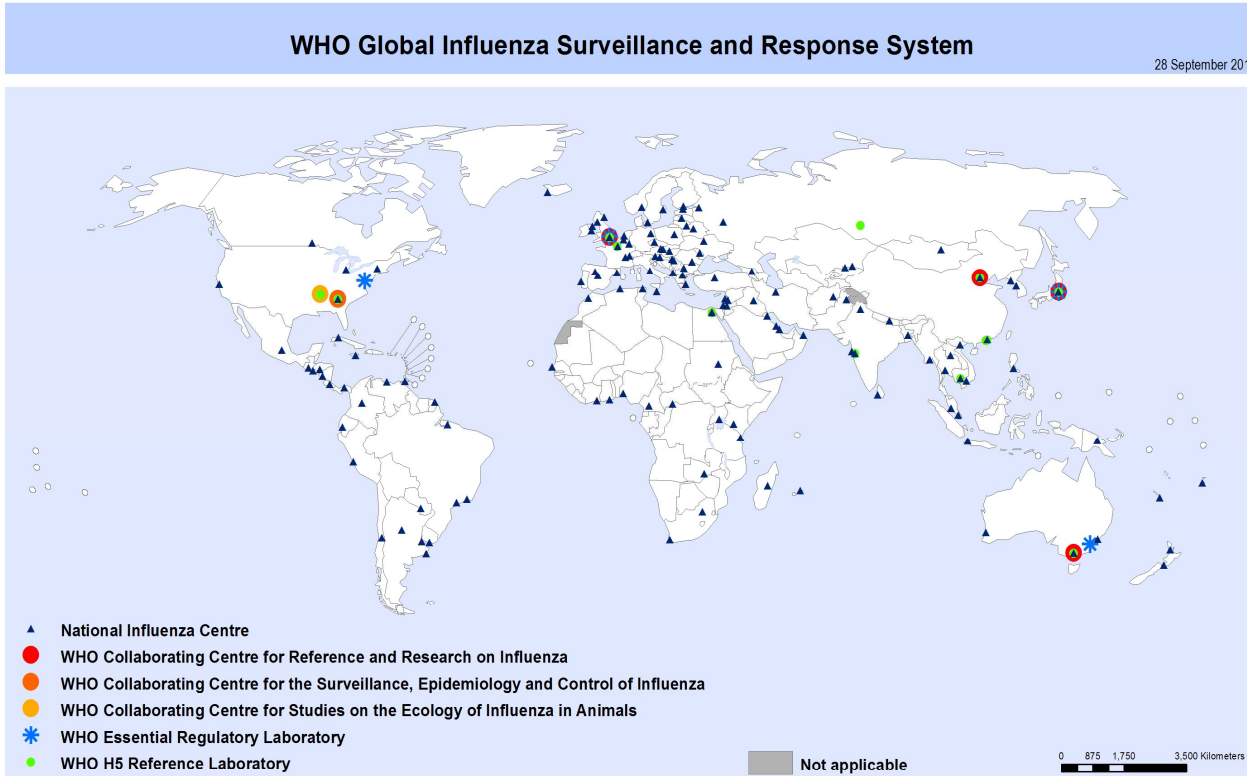
Dr. Iván Sanz Muñoz

Centro Nacional de Gripe de Valladolid
Servicio de Microbiología e Inmunología
Hospital Clínico Universitario de Valladolid

Red Global de Vigilancia de la gripe



THE WHO GLOBAL INFLUENZA SURVEILLANCE NETWORK



The boundaries and names shown, and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS), WHO
Map Production: Global Influenza Programme
World Health Organization

World Health Organization
© WHO 2015. All rights reserved.

146 Centros Nacionales de Gripe

4 Centros Colaboradores

Vigilancia de los virus de la gripe



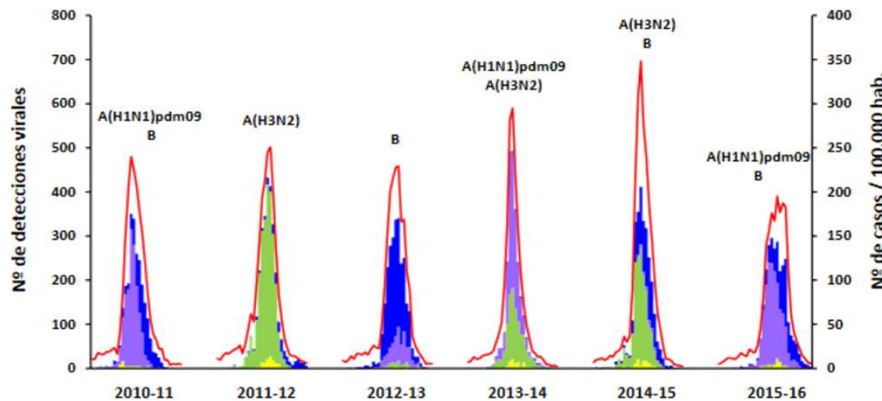
GLOBAL INFLUENZA SURVEILLANCE AND RESPONSE SYSTEM (GISRS)



Vigilancia clínica



Vigilancia epidemiológica



Objetivo: Asistencial

- Identificación de aislamientos
- Resistencias a antivirales
- Patogenia
- Patrones de excreción viral

Objetivo: Seguimiento y prevención

- Evaluación de la circulación gripal
- Identificación de cepas circulantes
- Consenso sobre cepas vacunales
- Evaluación de la eficacia y efectividad vacunal

Red Global de Vigilancia de la gripe



Tareas de los Centros Nacionales de Gripe

- Detección molecular de virus de la gripe
- Cultivo de virus de la gripe
- Caracterización antigénica y genética
- Almacenamiento de cepas
- Remisión de cepas a los centros referencia colaboradores de la OMS
- Monitorización de susceptibilidad a antivirales
- Reporte electrónico de datos epidemiológicos y virológicos nacionales e internacionales
- Análisis de la inmunidad de la población y de la eficacia y efectividad vacunal

Influenza	Key tasks of the network	
Influenza surveillance		
ECDC influenza programme	Since its establishment, ERLI-Net has been working to improve EU national influenza reference laboratory capabilities and capacity. In order to ensure the reporting of accurate virological data to EISN, laboratories participating in ERLI-Net must be able to perform a range of key virological technical tasks.	READ MORE ON ECDC SITE
European Influenza Surveillance Network (EISN)	Key tasks include:	
European Reference Laboratory Network for Human Influenza (ERLI-Net)	<ul style="list-style-type: none">• Direct detection of influenza virus types A and B using molecular methodology;• Influenza virus culture, essential to retain for vaccine strain formulation;• Determination of type and subtype of seasonal influenza using specific nucleic acid amplifications;• Ability to detect viruses with pandemic potential (H5 or other avian influenza virus strains);• Antigenic characterisation of seasonal influenza strains (ideally supported by genetic characterisation);• Storage of clinical specimens and virus isolates;• Shipment of virus isolates and/or clinical specimens to the WHO CC in London;• Participation in external quality assurance (EQA) exercises;• Electronic reporting of data nationally and internationally.	RELATED HEALTH TOPICS
Key tasks		
• Laboratory surveillance of influenza		
• Virology Task Groups		
• Influenza laboratory quality control		
• Biosafety		

Flujo de Trabajo en el NIC



Selection of clinical specimens for virus isolation and of viruses for shipment from National Influenza Centres to WHO Collaborating Centres

6 December 2010

This is an update to the document published on WHO's website on 22 October 2010.

Global influenza virological surveillance relies on antigenic characterization (Haemagglutination Inhibition (HI) and Virus Neutralization (VN) assays) supported by gene sequencing (predominantly for HA and NA) of influenza viruses, the results of which form the foundation of influenza epidemic/pandemic risk assessment and selection/development of seasonal/pandemic vaccine viruses. In this whole process, virus isolates are essential. Virus isolates are also required to monitor influenza antiviral drug resistance using phenotypic assays. Therefore performing virus isolation has been one of the Terms of Reference for National Influenza Centres (NICs)¹ of the Global Influenza Surveillance Network (GISN).

In recent years molecular technology has been widely used, particularly during the pandemic A(H1N1) 2009 and the number of laboratories performing virus isolation has decreased. To ensure that in future, sufficient and representative viruses are shared with the GISN, this document aims to help laboratories to select clinical specimens for virus isolation and to determine which virus isolates should be shared with the GISN through shipment to a WHO Collaborating Centre (CC)². These recommendations also describe how to combine the use of polymerase chain reaction (PCR) and virus isolation. Details on optimal specimen storage and transport are also described.

Principles of selection of specimens for virus isolation:

- PCR can be used for rapid detection of influenza in clinical specimens.
- Depending on the numbers of positive specimens, taking into consideration the epidemiological and clinical information available and relevant biosafety requirements, all or a proportion of those positive specimens can then be selected for virus isolation.

A recommended way of combining the use of PCR and virus isolation is illustrated in Figure 1, taking into consideration of advantages of each technology, needs for global influenza virological surveillance and practicality of NICs.

Recommendations to NICs for selection of clinical specimens/virus isolates to send to a WHO CC on Influenza:

NICs are strongly recommended to perform virus isolation wherever possible and to send, in a timely manner, representative virus isolates to one of the WHO CCs for further characterization. Where laboratories do not have the capacity to perform virus isolation, or as requested by the WHO CC, those labs may send clinical specimens.

¿Por qué trabajamos como trabajamos?

El objetivo es:

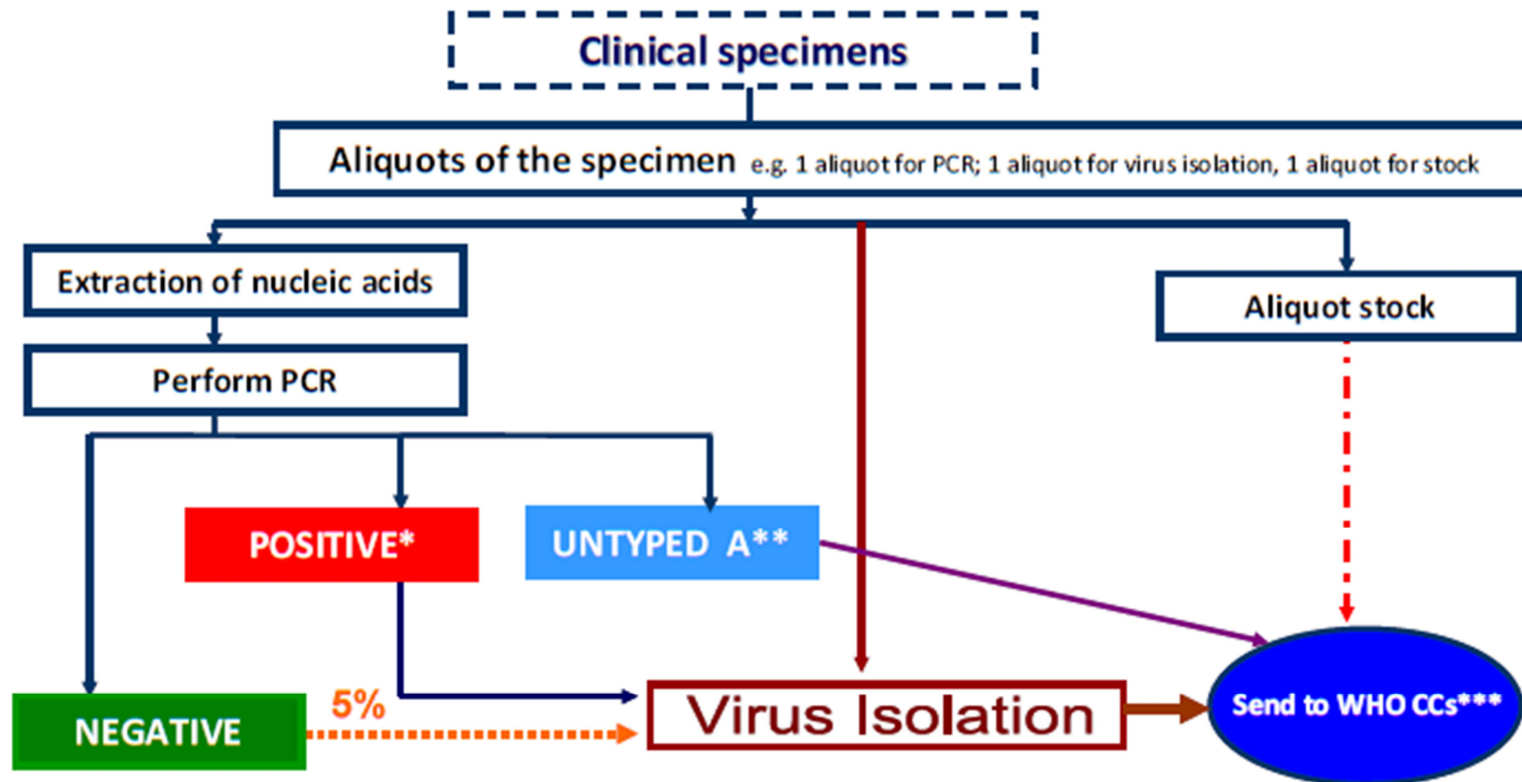
- Saber que cepas están circulando
- Intensidad de esa circulación
- Presencia de resistencias a antivirales y mutaciones patogénicas



Saber cuales son las cepas idóneas para incluir en la vacuna estacional de la siguiente temporada de gripe

Vigilancia de los virus de la gripe

Fig. 1 Selection of specimens for virus isolation and shipment of viruses to WHO CCs by NICs

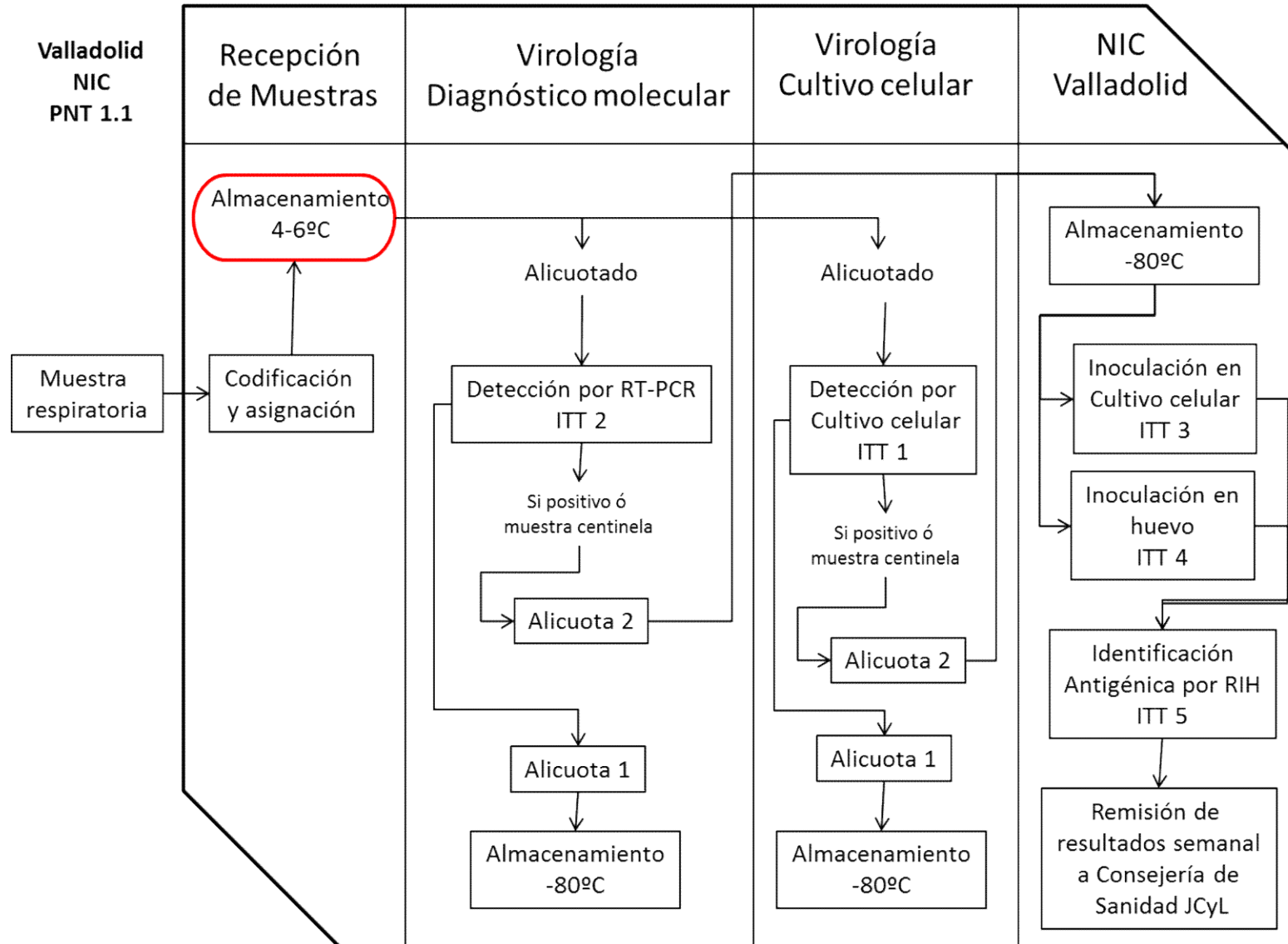


- *Selection of positives chosen according to criteria in document
- **Untyped A's by PCR should be sent to a WHO CC if circumstances are unusual

- ***Selection of isolates chosen according to criteria in document

Vigilancia de los virus de la gripe

Flujo de Trabajo de las muestras centinelas y hospitalarias en el HCUV y Valladolid NIC



Identificación de los virus de la gripe



Muestra respiratoria

Diagnóstico molecular (DM)

- Lactantes < 1 año
- UVI y UVIP
- Red Centinela
- Peticiones especiales
- Protocolo NeumoPed

Cultivo celular

- Resto de peticiones

Ventajas

- Mayor sensibilidad y especificidad
- Diagnóstico rápido, incluso en 1 hora
- Identificación de varios patógenos a la vez
- Limite de detección muy bajo

Desventajas

- No permite ver la viabilidad del virus
- Más susceptible a contaminaciones cruzadas
- Equipamiento más caro

Ventajas

- Permite saber si el virus es viable

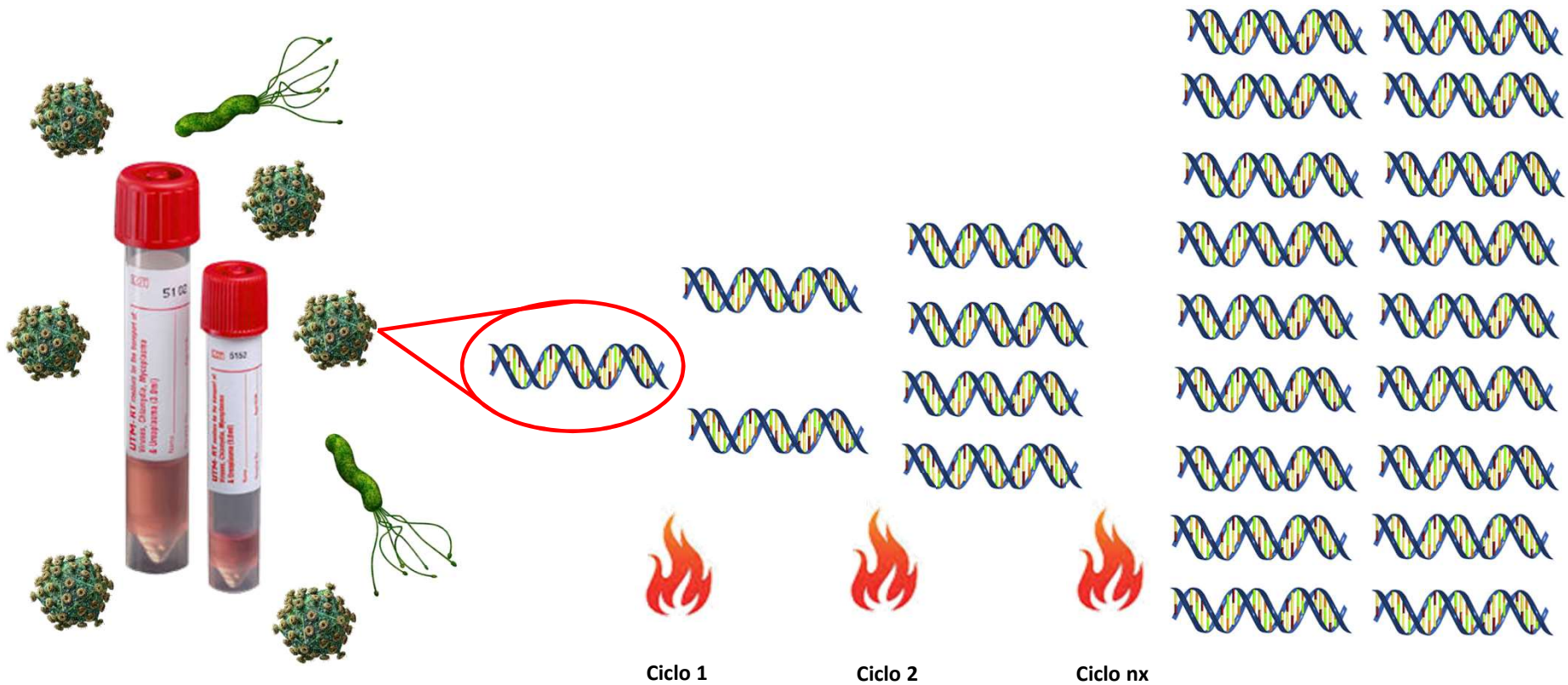
Desventajas

- Necesita métodos accesorios para detectar el crecimiento del virus (microscopía fluorescente, hemaglutinación, etc.)
- Protocolo muy laborioso y largo
- Baja sensibilidad pero alta especificidad

Identificación de los virus de la gripe

Diagnóstico Molecular de virus respiratorios

- El DM tiene como objetivo detectar material genético del virus para confirmar su presencia
- Se basa en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)



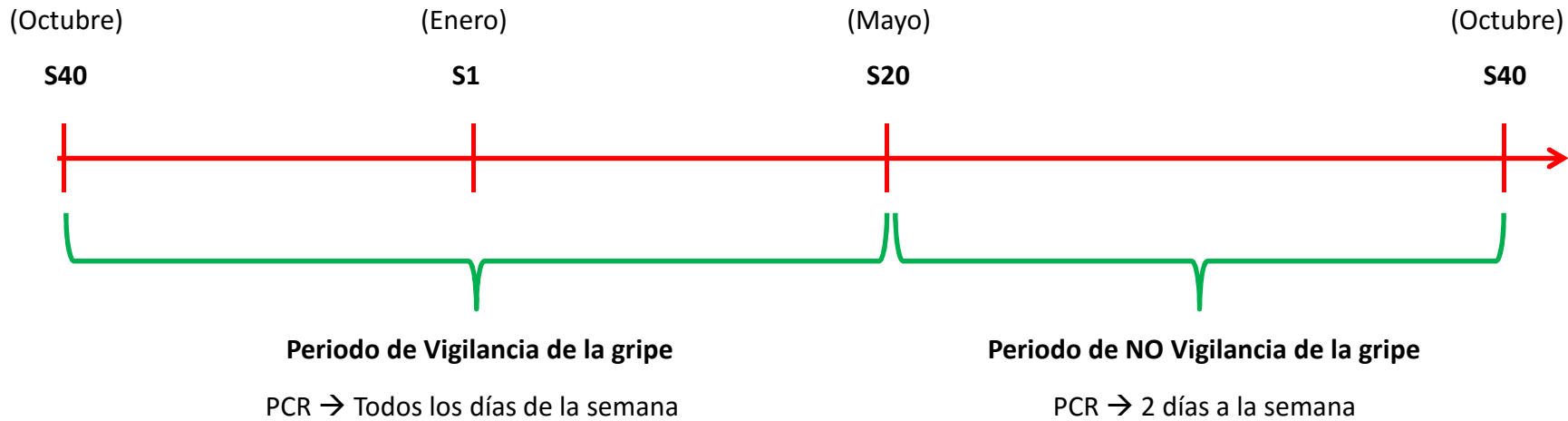
Identificación de los virus de la gripe

Diagnóstico Molecular de virus respiratorios

MagPix



- Gripe A
- Gripe A/H1pdm09
- Gripe A/H3N2
- Gripe A/H1N1
- Gripe B
- VRS A
- VRS B
- Bocavirus
- Metapneumovirus
- Enterovirus/Rinovirus
- Coronavirus OC43
- Coronavirus HKU1
- Coronavirus NL63
- Coronavirus 229E
- Parainfluenza 1
- Parainfluenza 2
- Parainfluenza 3
- Parainfluenza 4
- Adenovirus
- *M. pneumoniae*
- *C. pneumoniae*
- *L. pneumophila*



Identificación de los virus de la gripe

Diagnóstico Molecular de virus respiratorios



Después de este diagnóstico existen 7 supuestos:

- Detección de gripe A, incluido el subtipo (A/H1N1pdm09, A/H3N2)
- Detección de gripe A, sin subtipo
- Detección de gripe B
- Detección de otro virus respiratorio
- Detección de bacterias atípicas
- Detección de co-infecciones de varios de estos
- Resultado negativo

Gripe A sin subtipo

Gripe B

- Siempre que existan gripes A sin subtipar se han de remitir al Centro Colaborador de la OMS
- Normalmente estos casos son por baja carga viral o por la propia evolución de los subtipos, pero a veces pueden ser casos aviáres o porcinos (muy infrecuentemente)
- Para su subtipo utilizamos varias PCRs diferentes
 - CDC Subtyping Panel (H1p, H3, H1)
 - Clondiag
 - Roche A/H1N1p subtyping panel
 - Cepheid....

Identificación de linajes
Victoria y Yamagata

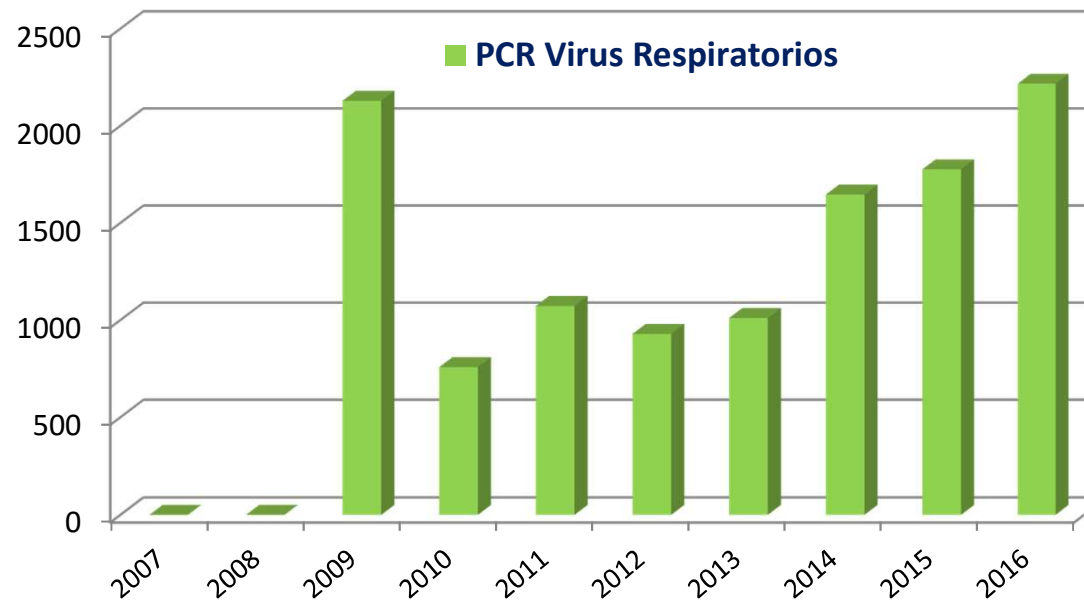


PCR In-house

Identificación de los virus de la gripe



Diagnóstico Molecular de virus respiratorios



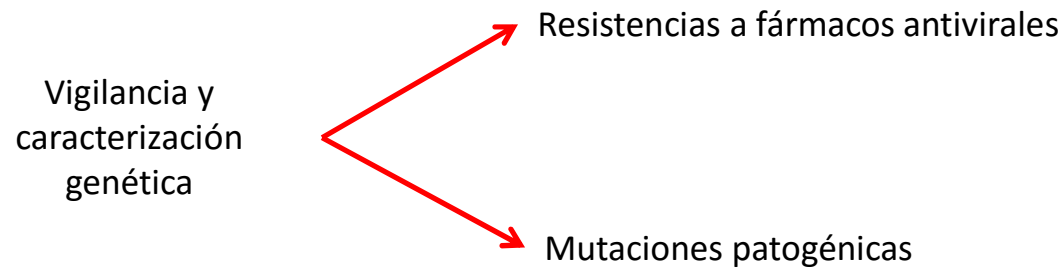
Desde el año 2009:

- Gran número de peticiones en la pandemia debido a la emergencia del subtipo A/H1N1pdm09
- Continuo ascenso del número de peticiones de virus respiratorios hasta el año 2016
- En estos momentos el número de peticiones está en número similar a las obtenidas en la pandemia
- El DM para virus respiratorios supone $\approx 20\%$ de las peticiones para DM de todo el laboratorio

Identificación de los virus de la gripe



Diagnóstico Molecular de virus respiratorios



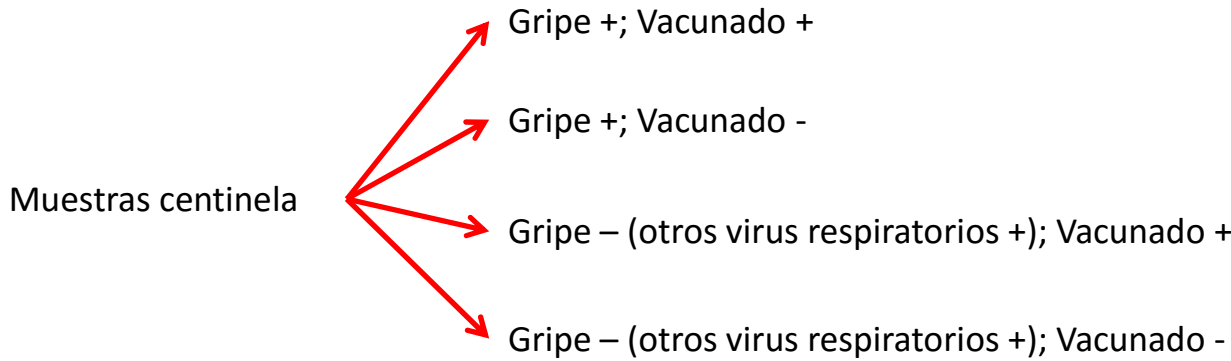
```
ATGAAGGCAAGACTACTGGTCCTGTTATGTGCAATTGCAGCTACAGATG  
ATGAAAGCAAAACTACTGATCCTGTTATGTGCACTTACAGCTACAGATG  
ATGAAAGCAAAACTACTGATCCTGTTGTGTGCACTTTCAGCTACAGATG  
ATGAAGGCAAGACTACTGGTCCTGTTATGTGCACTTGCAGCTACAGATG  
ATGAAGGCAATACTATTAGTCTTGCTATGTACATTTGCAGCCACAAATG  
ATGGAGGCAAGACTACTGGTCCTGTTATGTGCAATTTGCAGCTACAAATG
```



Identificación de los virus de la gripe



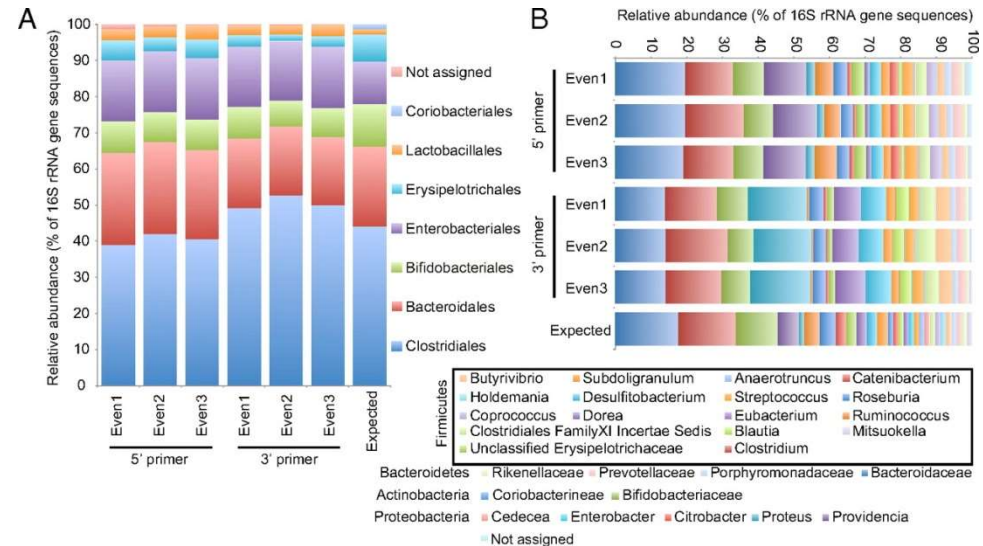
Diagnóstico Molecular de virus respiratorios



Análisis del microbioma nasofaríngeo mediante estudio del gen 16s

Objetivo: Conocer las diferencias en el microbioma nasofaríngeo humano entre individuos infectados y no infectados por gripe

Es necesario recoger una muestra nasofaríngea con una torunda para bacterias además del frotis para virus



Identificación de los virus de la gripe

Cultivo Celular (CC) y Cultivo en huevo embrionado de gallina

- El objetivo del cultivo celular es conocer la presencia de virus de la gripe (y otros virus respiratorios), conocer su viabilidad y aumentar la carga viral

Cultivo en células

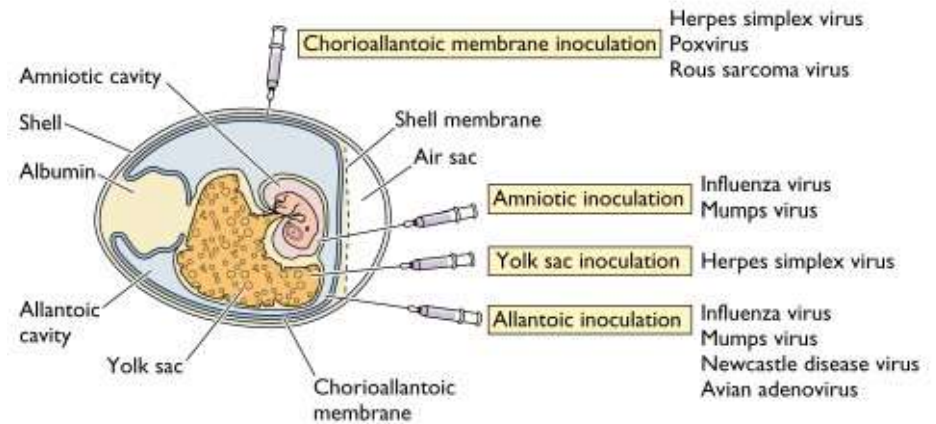
- Shell vials



- Frascos Flask



Cultivo en huevo embrionado de gallina



Todas las cepas tras ser cultivadas recibirán un nombre como:

A/Valladolid/159/2013

A/Burgos/24/2014

A/Salamanca/26/2014

Red Global de Vigilancia de la gripe



Tareas de los Centros Nacionales de Gripe

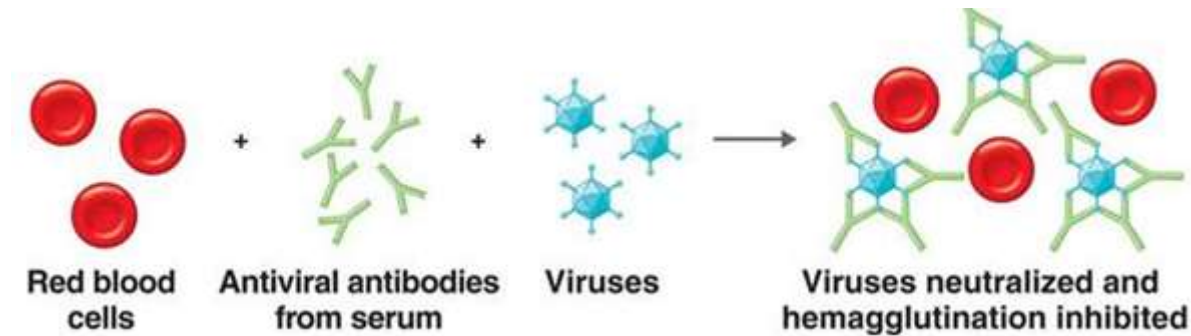
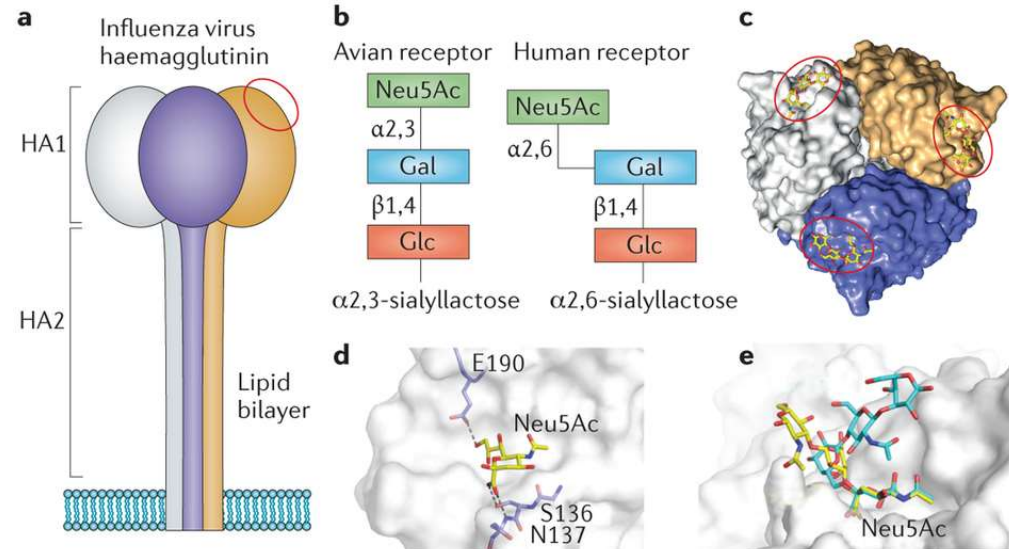
- Detección molecular de virus de la gripe
- Cultivo de virus de la gripe
- Caracterización antigénica y genética
- Almacenamiento de cepas
- Remisión de cepas a los centros referencia colaboradores de la OMS
- Monitorización de susceptibilidad a antivirales
- Reporte electrónico de datos epidemiológicos y virológicos nacionales e internacionales
- Análisis de la inmunidad de la población y de la eficacia y efectividad vacunal

Influenza	Key tasks of the network	
Influenza surveillance	Since its establishment, ERLI-Net has been working to improve EU national influenza reference laboratory capabilities and capacity. In order to ensure the reporting of accurate virological data to EISN, laboratories participating in ERLI-Net must be able to perform a range of key virological technical tasks.	READ MORE ON ECDC SITE
ECDC influenza programme	Key tasks include:	Influenza and other Respiratory Viruses Programme
European Influenza Surveillance Network (EISN)	<ul style="list-style-type: none">• Direct detection of influenza virus types A and B using molecular methodology;• Influenza virus culture, essential to retain for vaccine strain formulation;• Determination of type and subtype of seasonal influenza using specific nucleic acid amplifications;• Ability to detect viruses with pandemic potential (H5 or other avian influenza virus strains);• Antigenic characterisation of seasonal influenza strains (ideally supported by genetic characterisation);• Storage of clinical specimens and virus isolates;• Shipment of virus isolates and/or clinical specimens to the WHO CC in London;• Participation in external quality assurance (EQA) exercises;• Electronic reporting of data nationally and internationally.	RELATED HEALTH TOPICS
European Reference Laboratory Network for Human Influenza (ERLI-Net)		
Key tasks		
• Laboratory surveillance of influenza		
• Virology Task Groups		
• Influenza laboratory quality control		
• Biosafety		

Ensayos serológicos con gripe

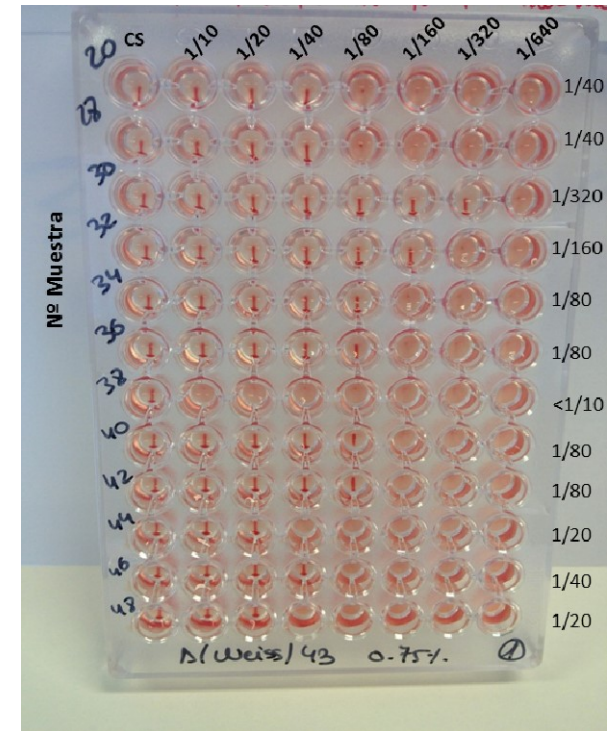
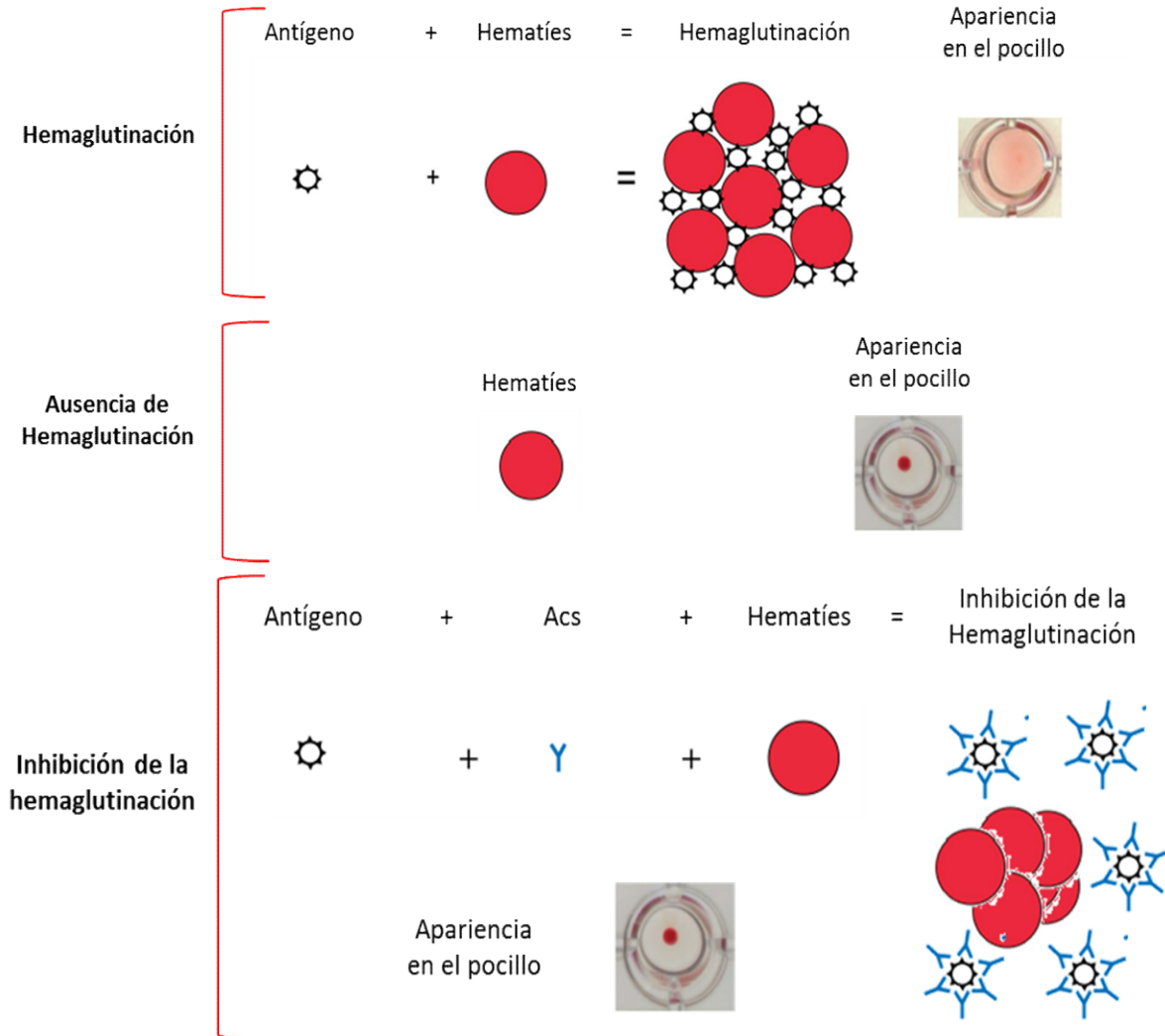
Reacción de Inhibición de Hemaglutinación (RIH)

- Es la prueba recomendada por la OMS para determinar las características antigénicas de los virus de la gripe en el Programa Mundial de Vigilancia de Gripe
- Reacción basada en la capacidad de la HA de unirse específicamente a los receptores de ácido siálico de los eritrocitos



Ensayos serológicos con gripe

Reacción de Inhibición de Hemaglutinación (RIH)



Ensayos serológicos con gripe

Reacción de Inhibición de Hemaglutinación (RIH)

- Caracterización antigénica

El objetivo es conocer las características antigénicas del virus a estudio y compararlas con los ya existentes

Reactivos de identificación de la OMS



Aliquot label	Virus subtype / lineage	ANTISERA				
		A(H1)pdm09	A(H3)	B/Wis/1/2010 (Yamagata)	B/Bris/60/2008 (Victoria)	Normal sheep
Reference Virus A	A/California/7/2009	5120	<40	<40	<40	<40
Reference Virus B	A/Victoria/361/2011	80	1280	<40	<40	<40
Reference Virus C	B/Wisconsin/1/2010	<40	<40	320	40	<40
Reference Virus D	B/Brisbane/60/2008	<40	<40	<40	20480	<40
Virus isolate 1	B/Wisconsin/1/2010-like	<40	<40	640	<40	<40
Virus isolate 2	A/Victoria/361/2011	80	1280	<40	<40	<40
Virus isolate 3	A/Victoria/361/2011	80	2560	<40	<40	<40
Virus isolate 4	A/California/7/2009	2560	<40	<40	<40	<40

Homologous titres are shown in red, test virus classifications are highlighted in green.

Ensayos serológicos con gripe

Reacción de Inhibición de Hemaglutinación (RIH)

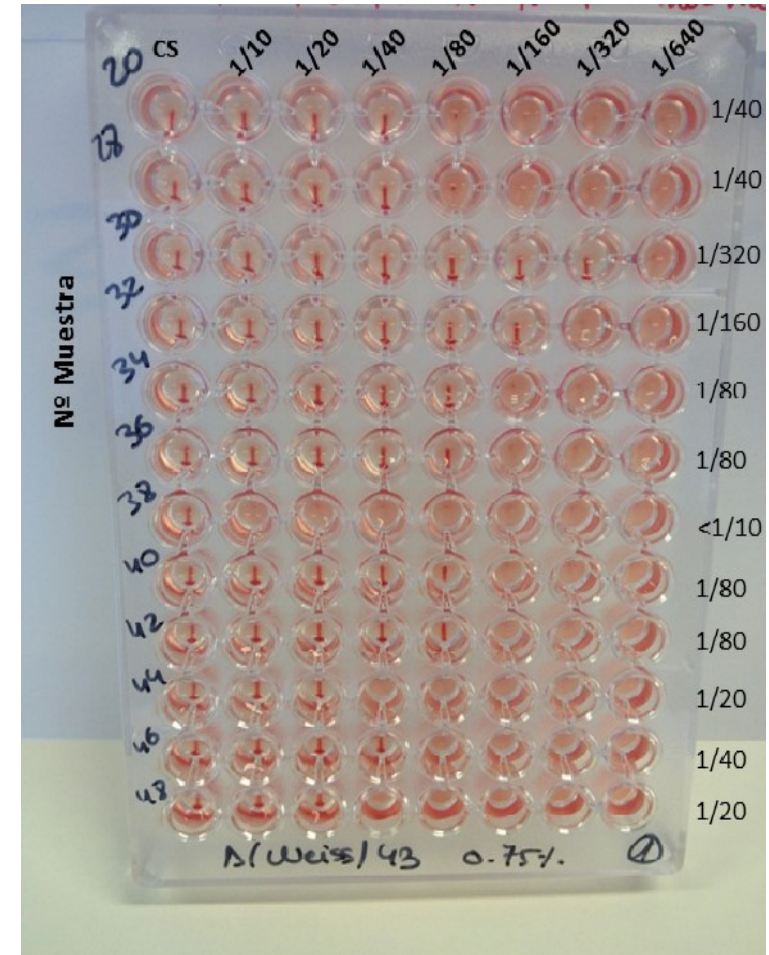
- Determinación del título de Acs pre y post-vacunales

El objetivo es conocer:

- Protección de la población antes de la vacunación
- Inmunización producida por la vacunación
- Seroprotección alcanzada

Otros objetivos

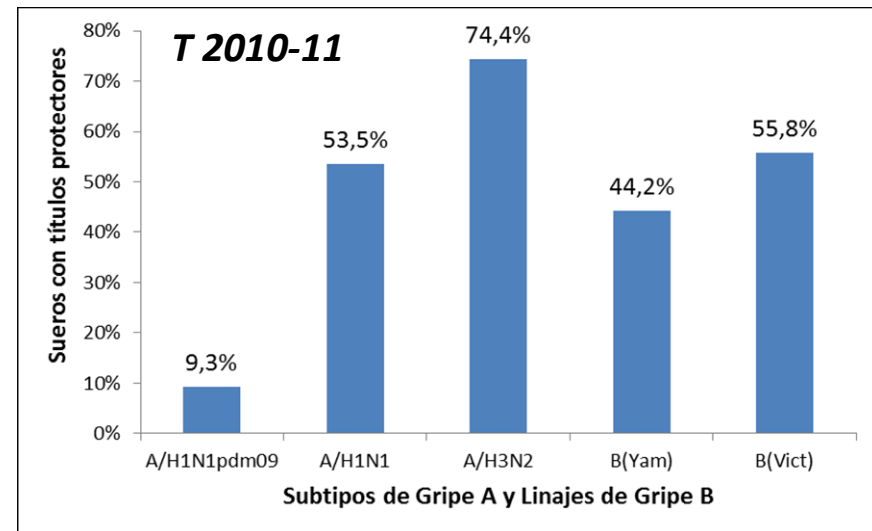
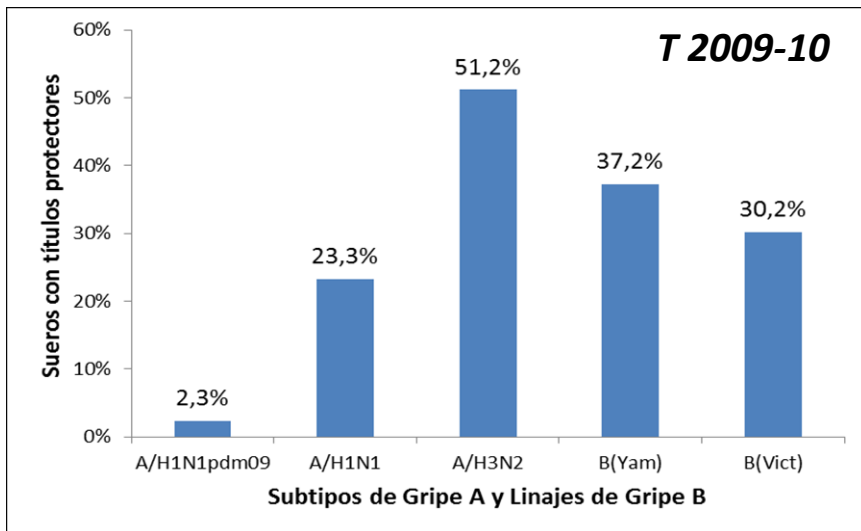
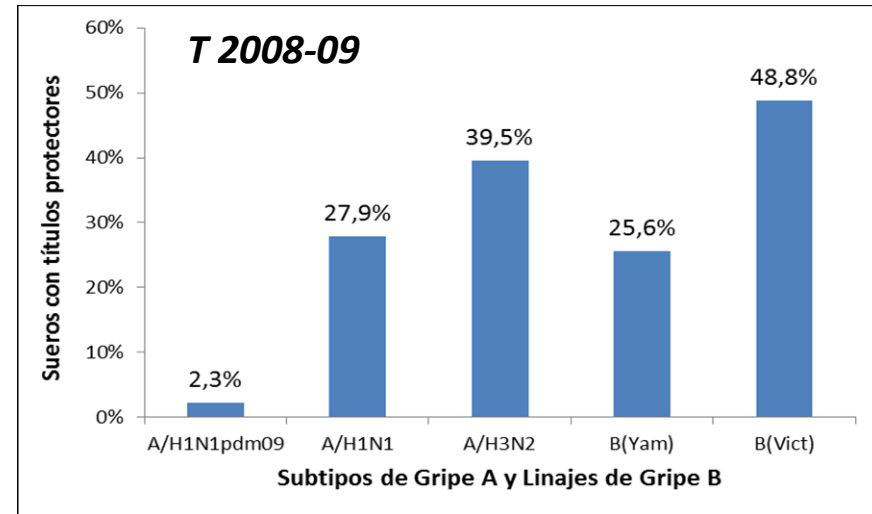
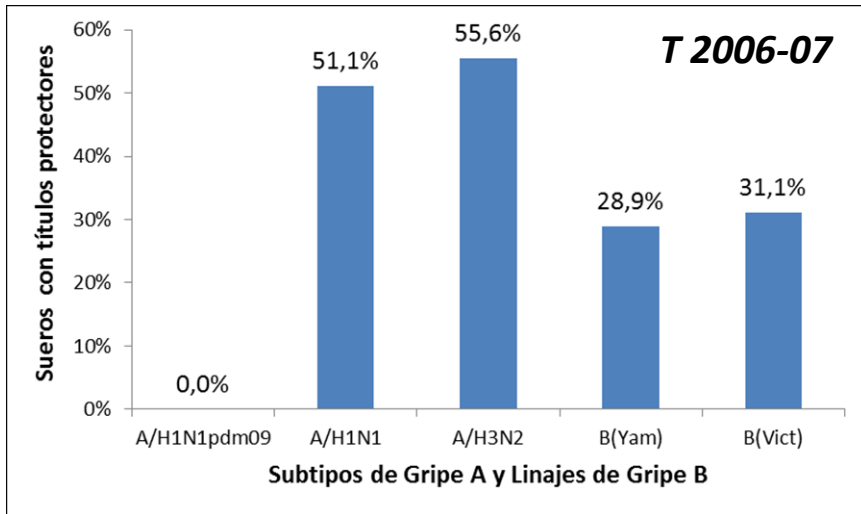
- Seroprotección frente a virus no incluidos en la vacuna
- Inmunización heterotípica y protección cruzada



Ensayos serológicos con gripe



Reacción de Inhibición de Hemaglutinación (RIH)



Ensayos serológicos con gripe

Reacción de Inhibición de Hemaglutinación (RIH)



Subtipo o linaje	Criterio EMA	Cohortes			
		2006-07	2008-09	2009-10	2010-11
A/H1N1pdm09	Tasa Seroprotección	13,3	20,9	23,3	86,0
	Tasa Seroconversión	13,3	14,0	20,9	79,1
	Razón de Incremento	3,6	4,7	3,8	38,8
A/H1N1	Tasa Seroprotección	82,2	83,7	58,1	67,4
	Tasa Seroconversión	42,2	60,5	16,3	16,3
	Razón de Incremento	3,3	7,6	2,1	1,7
A/H3N2	Tasa Seroprotección	93,3	90,7	83,7	95,3
	Tasa Seroconversión	62,2	74,4	30,2	51,2
	Razón de Incremento	5,8	12,9	2,7	3,9
B/Yamagata	Tasa Seroprotección	42,2	60,5	46,5	53,5
	Tasa Seroconversión	11,1	34,9	4,7	4,7
	Razón de Incremento	1,7	4,6	1,4	1,4
B/Victoria	Tasa Seroprotección	64,4	62,8	44,2	81,4
	Tasa Seroconversión	35,6	9,3	14,0	25,6
	Razón de Incremento	4,3	1,5	1,9	2,6

*Color verde: Valor superior al *cut-off* del criterio EMA

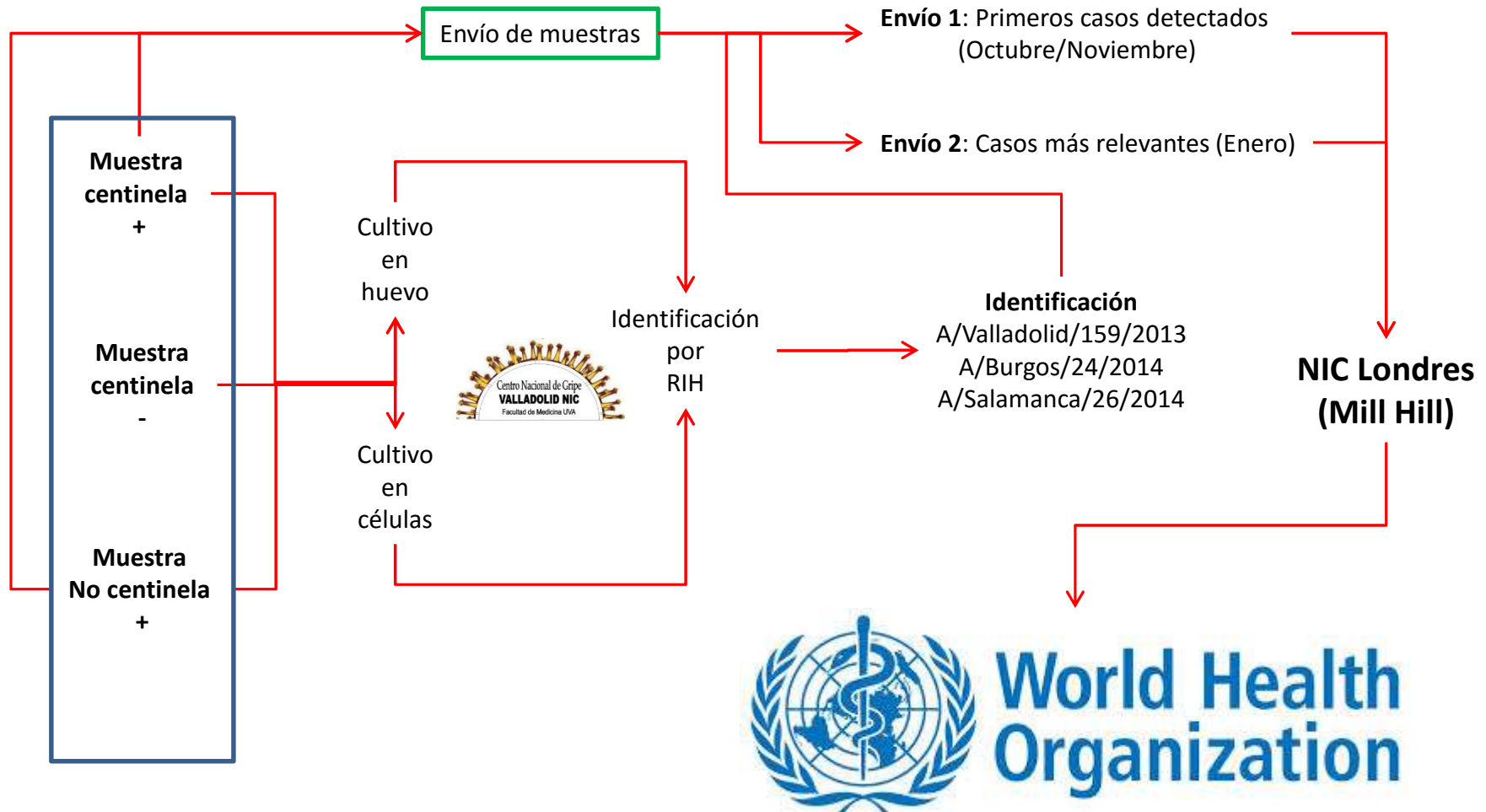
**Color rojo: Valor inferior al *cut-off* del criterio EMA

Red Global de Vigilancia de la gripe



Contribución al desarrollo y mejora de la vacuna antigripal

Objetivo: Asesorar a la OMS en la creación y desarrollo de la vacuna antigripal de la siguiente temporada



Red Global de Vigilancia de la gripe

Médicos Centinela:

- Vuestra labor es importante
- Lo que hacéis no cae en saco roto ni solo incrementa el peso de los CV
- El dinero gastado en esto tiene varios objetivos:
 - Mejorar la vigilancia y “adelantarse” a la gripe
 - Mejorar las vacunas antigripales
 - Mejorar la atención a los pacientes a nivel ambulatorio y hospitalario



¡¡Muchas gracias por vuestra atención!!



Programa:

11:30. "Perspectivas futuras de la gripe".

Dr. Raúl Ortiz de Lejarazu.

12:00. "Aspectos prácticos de la recogida de muestras en vigilancia epidemiológica"

Dra. Silvia Rojo Tello

12:30. "Temporada 2016-2017".

Dr. Tomás Vega Alonso

13:00. "Cálculo de umbrales y niveles de intensidad"

D. José Eugenio Lozano Alonso"

13:30. "Flujo de trabajo del diagnóstico virológico en el Centro nacional de gripe"

Dr. Iván Sanz Muñoz"

14:00 Comida

16:00 Visita al laboratorio de microbiología del Hospital Clínico de Valladolid (Centro Nacional de Gripe). 60-90 minutos