



Diagnóstico Molecular de virus respiratorios

Dra. Cristina Videla

Bioq. M Vanesa Romano



Laboratorio de Virología Clínica

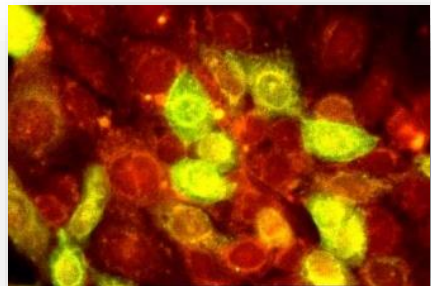
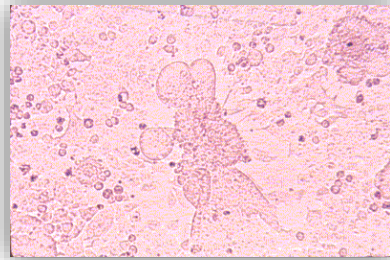


Declaro no tener conflicto de interés, no estoy relacionada con ninguna de las empresas comerciales nombradas en mi presentación

Diagnostico de virus respiratorios

Métodos clásicos

Cultivo viral



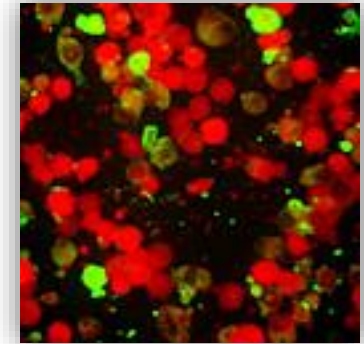
Método de referencia

Muestras

- Aspirado nasofaríngeo
- Hisopados nasal/faríngeo
- Hisopado nasal
- Aspirado traqueal
- BAL

Métodos Rápidos

IFI con AcMo



Inmunocromatograficos



Virus Respiratorios Clásicos

Responsables de 30-40% de las IRAs virales en niños <5 años

Virus	Serotipos/Variantes	Enfermedad
Sincicial Respiratorio	Grupos A y B	IRA alta y baja
Parainfluenza	1, 2, 3 y 4	IRA alta y baja
Influenza	A (H1N1, H3N2, H5N1, H7N9) B vs serotipos	Gripe
Adenovirus	Especies B, C y D Muchos serotipos y genotipos	IRA alta y baja

Virus Respiratorios incluidos en el panel respiratorio

🦠 Virus sincicial respiratorio

🦠 Adenovirus

🦠 Influenza A

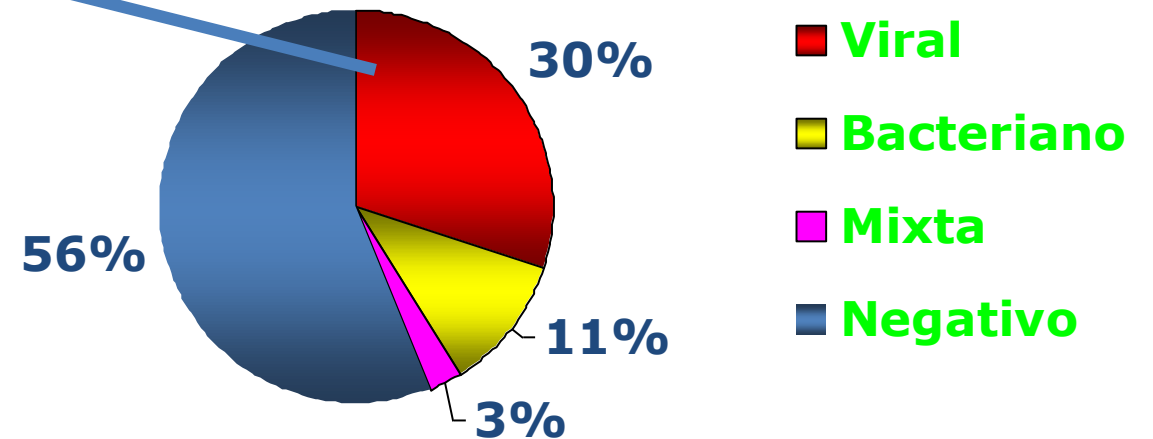
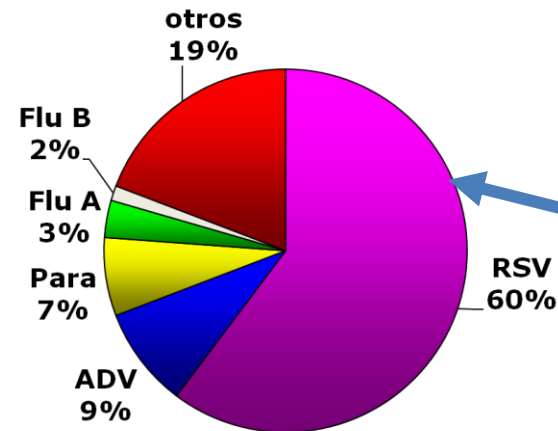
🦠 Influenza B

🦠 Parainfluenza 1-3

n= 1003 niños < 5 años con IRA baja

Métodos: IFI y cultivo

Etiología viral : 30% (301 niños)



Puede ser otro virus respiratorio no incluido en el panel?

Otros Virus Respiratorios Humanos que no se estudian

● **Rinovirus** **Especie A y B**

● **Enterovirus :** **Echo**
 Coxackie
 Entero 22 y 23

● **Coronavirus tradicionales:** **OC43**
 229E

Difíciles de cultivar
No Acs. monoclonales
Mayoría sólo IRA alta

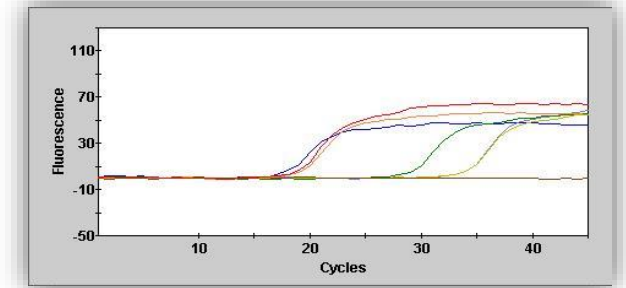
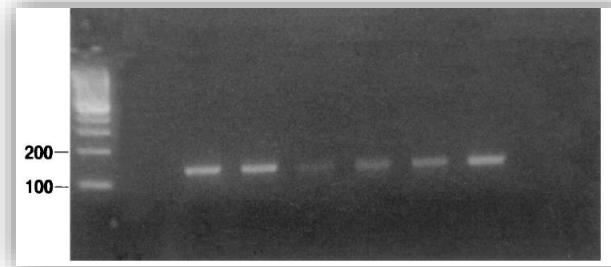
A partir del 2001 con la incorporación de la biología molecular se han descubierto:

- ❖ Metapneumovirus Humano (2001)
- ❖ Parvovirus: Bocavirus (hBoV) (2005)
- ❖ Parvo 4 (2005)
- ❖ Rinovirus Especie C (50 serotipos) (2006)
- ❖ Coronavirus:
 - ❖ HUCoV SARS (2003)
 - ❖ HUCoV NL63 (2004)
 - ❖ HUCoV HKU1 (2005)
 - ❖ Nuevo Coronavirus (2012)
- ❖ Polyomavirus: KI (2007)
- ❖ Wu (2007)

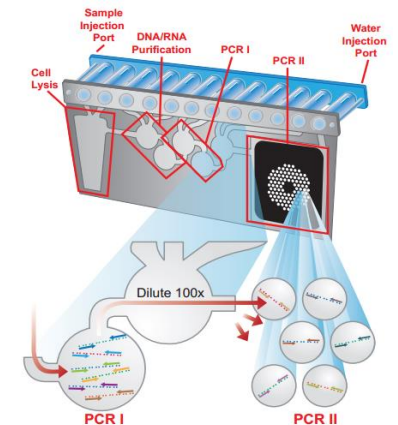
**No son cultivables
No modelo animales
No Acs monoclonales
No Koch**

Diagnostico métodos moleculares

- PCR
 - Rt-PCR
- } Individuales



- PCR en tiempo real : Permite cuantificar
- Multiplex “in house”
- Multiplex: 7 virus (Hexaplex)
- Multiplex seguido de hibridización con sondas en microesferas (Luminex) ó “microarrays”



Ensayos Moleculares Comerciales para Virus Respiratorios

Aprobados x FDA

- *ID Tag RVP (Respiratory virus Panel) Kit, Luminex* : **20 VR microarrays** en microesferas en fase líquida (2008) 6 hs
- *Film Arrays Respiratory Panel*: **18 VR+ 3 bacterias**, Sistema cerrado, automático, nested PCR y identificación por curva de melting 1h
- *Nanosphere Verigene*: **FluA, FluB y RSV**, microarrays en nanopartículas, automatizado: 3.5 h
- *Cepheid Xpert Flu/RSV XC Assay*:, **FluA, FluB y RSV** 1 h
- *Prodesse ProFLU Gne Pprobe*: **RSV FluA/B** <4h

Ensayos Moleculares Comerciales para Virus Respiratorios

- *Plex-ID (Abbott Molecular)* combina RT-PCR con espectrometría de masa :FluA/FluB 8h
- *Qiagen Artus Influenza a/B Rotorgene RT -PC kit* : FluA/FluB 4h
- *Alere i NAT FluA/B: Influenza A/B* (amplificación isotérmica) 15 min
- *Cobas Influenza A/B (Roche Diagnostics):* FluA/FluB 20 min
- *Simplexa FluA/B FocusDiagnostic* : FluA/FluB <4h
- *Quidel Molecular a+B Assay* : FluA/FluB 4hs

Comparison of 3 RVP tests (N=300, NP swabs)

- Sensitivity (%)

N	35	30	16	14	22	26	14	13	13	43	22	14
	Adeno	InfA	InfA H1/09	InfA H3	InfB	hMPV	PIV 1	PIV2	PIV3	Rh/EV	RSV A	RSV B
Luminex	74.3	100	100	92.9	95.5	100	100	100	100	93.0	86.4	92.9
GenMark	100	100	100	100	100	100	100	100	100	90.7*	100	100
BioFire*	57.1	86.2	73.3	100	77.3	96.2	100	92.3	100	83.7	86.4	100

*eSensor does not detect enteroviruses.

- Specificity (%)

	Adeno	InfA	InfA H1/09	InfA H3	InfB	hMPV	PIV 1	PIV2	PIV3	Rh/EV	RSV A	RSV B
Luminex	99.6	100	100	100	100	99.6	100	100	100	98.8	100	100
GenMark	98.9	100	100	100	99.6	99.3	100	99.3	100	95.5	100	99.3
BioFire*	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

*FA version 1.7 – reported AdV sensitivity: 83-90%
Doern et al., 2013. J Clin Microbiol; 5% increased
detection by LDT Song et al., 2016. J Clin Microbiol.

*Version 1.6

Popowitch et al. J Clin Microbiol, 2013; 51:1528-33

Multiplex o PCR en tiempo real vs métodos tradicionales

Población pediátrica

IFI: **26-38%**

Real time PCR para 6 VR: **34-53%**

Real time aumentó detección de:

RSV	7%
Influenza A	13%
Adeno	76%
PI V 1	64%
PIV 2	89%
PIV 3	30%

Ruyters J. et al. Comparison of Real time PCR Assays with Fluorescent-Antibody Assays for diagnosis of respiratory virus Infections in children. J.Clin Microbio 44(7): 2382, 2006

Población Adulta: 263 HNFC

IFI (6 VR): **11%**

Real time PCR (18 VR): **65%**

Infección Mixta: 1 agente: **76%** 2: **22%** 3 : **4%**

Real time aumentó la detección de:

RSV: 58%
Influenza A: 71%
HMPV: 53%
Adeno: 100%

Bouvet D et al, Diagnosis of community-acquired acute respiratory illness: from conventional microbiological methods to molecular detection. Patho. Biol. 2015

Detección de Influenza A por PCR vs IFI en población adulta

Periodo: 2014-2016 CEMIC

	PCR FLUA POSITIVO	PCR FLUA NEGATIVO	Total
IFI FLUA (+)	45	0	45
IFI FLUA (-)	50	776	826
Total	95	776	871

• **SENSIBILIDAD IFI vs REAL TIME: 47%**

Real time aumentó la detección : 53%

(Roche , Light Cyclor)

• Sensibilidad IFI vs REAL TIME según TIPIFICACION INFLUENZA A:

2014: 42% H1N1

2009: 57% H1N1

2015: 55% H3N2

2016: 41% H1N1

2017: 52% H3N2

N=374 FLUA(+)= 106 (28%)

Detección de virus sincicial respiratorio(RSV) por PCR vs IFI en población adulta Periodo: 2014-2016 CEMIC

	PCR RSV (+)	PCR RSV (-)	Total
IFI RSV (+)	54	0	54
IFI RSV (-)	21	658	679
Total	75	658	733

SENSIBILIDAD IFI vs REAL TIME: 72%
Real time aumentó la detección : 28%

Aportes de los Métodos Moleculares al Diagnóstico de Virus Respiratorios

- Se la considera la técnica de referencia en la actualidad para detección de virus respiratorios
- Aumenta la detección viral de los virus clásicos
 - Clásicos 30% versus Moleculares 60%**
- Permiten estudiar virus que no se cultivan o no hay AcMo (Rinovirus, Enterovirus, Coronavirus y los nuevos virus)
- O son peligrosos para su aislamiento (MERS-CoV; Flu A aviar H5N1, H9N2)
- Detectan infecciones múltiples
- Posibilidad de cuantificación

Algunos Interrogantes

- **Valor clínico de la presencia de ácido nucleico viral en Muestras Respiratorias**
 - ✓ **Es el agente etiológico?**
 - ✓ **El paciente disemina el virus?**
 - ✓ **Es necesario cuantificar?**
 - ✓ **En las infecciones mixtas cual es el principal agente?**



La detección molecular no discrimina entre virus activo e inactivo

La presencia de ácido nucleico viral puede significar:

Pacientes sintomáticos

- Agente etiológico
- Infección asintomática
- Remanente de una pasada
- Infección latente

Pacientes Asintomáticos

- Infección asintomática
- Infección insipiente
- Síntomas no conocidos ó atípicos

Pacientes sanos HRV (2-45%),
HBoV (0-44%)
CoV (0-6%)

Infecciones mixtas: 10-50%
HRV y HBoV alto porcentaje
infecciones mixtas con otros virus
(especialmente RSV)

Prolongada excreción viral
HBoV: meses
HRV: 2-3 semanas

PCRs cuantitativas o en tiempo real aumentaría la especificidad

Determinar valor de carga viral que se asocie con infección activa y enfermedad

- Importante en co-infecciones
- Excreción prolongada
- Monitorear tratamiento antiviral
- Relacionarlo con gravedad

- Será necesario la estandarización de las técnicas en las diferentes muestras respiratorias
- Contar con estándares para obtener resultados comparables

Uso de PCR digital cuantificación absoluta, no requiere curva estándar!

Co-infecciones: Un ejemplo HBoV

- HBoV se descubrió por métodos moleculares de screening en el 2005
- HBoV1 uno de los agentes virales mas frecuentes, después de RSV, HRV en las IRAs tracto inferior en niños
- Puede persistir en tracto respiratorio por meses, explicaría su presencia en pacientes asintomáticos y alta frecuencia de coinfección con otros virus y bacterias
- **Co infección con otros virus 30-80%**
- **La determinación de carga viral permitiría diferenciar entre estos dos estados: pasajero ó patógeno de IRA**
- **Infección aguda por HBoV: Mono infección Cargas virales $>10^7$ copies/ml**
Detección virus en suero Ig M e Ig G
>severidad del cuadro respiratorio

Cuantificación de virus respiratorios

TABLE IV. Human Rhinovirus (HRV) Load at Admission and Discharge in Patients With Acute Respiratory Tract Infection Associated With HRV Single Infection or HRV + RSV Co-Infection

HRV infection	Median (range) viral load at			Duration of hospital stay (days)
	admission	p	discharge	
Single infection				
HRV load:				
median	5.1x10 ⁶	0.03	7.1x10 ⁴	8.5
range	(2.3x10 ⁵ -6.1x10 ⁷)		(<1.0x10 ² -1.1x10 ⁸)	(5-16)
	↑		↑	↑
p	0.002		ns	ns
	↓		↓	↓
RSV-coinfection				
HRV load:				
median	1.3x10 ⁴	ns	1.8x10 ⁴	8.0
range	(<1.0x10 ² -1.5x10 ⁷)		(<1.0x10 ² -2.6x10 ⁷)	(2-19)
	↑		↑	
p	0.001		ns	
	↓		↓	
RSV load:				
median	1.4x10 ⁷	0.01	1.0x10 ⁴	
range	(2.2x10 ⁴ -1.8x10 ⁹)		(<1.0x10 ² -3.4x10 ⁶)	

Se determino CV HRV en población pediátrica y adulta inmunocompetente e IC hospitalizados

- Población pediátrica Inmunocompetente HRV CV >10⁵ copias/ml: asociado a síntomas de infección respiratoria baja

- En adultos IC se encontró CV < a 10⁵ copias /ml en BAL pacientes asintomáticos trasplantados de pulmón

■ Conclusión:

Cuando detectan CV HRV altas puede causar infección severa

CV moderada-baja: puede representar solo un virus espectador

TECNICAS DE SECUENCIACION NUEVA GENERACION: millones de secuencias en una corrida!!!

Técnicas de Secuenciación

1era Generación

Secuenciación por Sanger

2era Generación NGS

Secuenciación Masiva Paralela

- Pirosecuenciación: 454 Roche

- Solexa (Illumina)

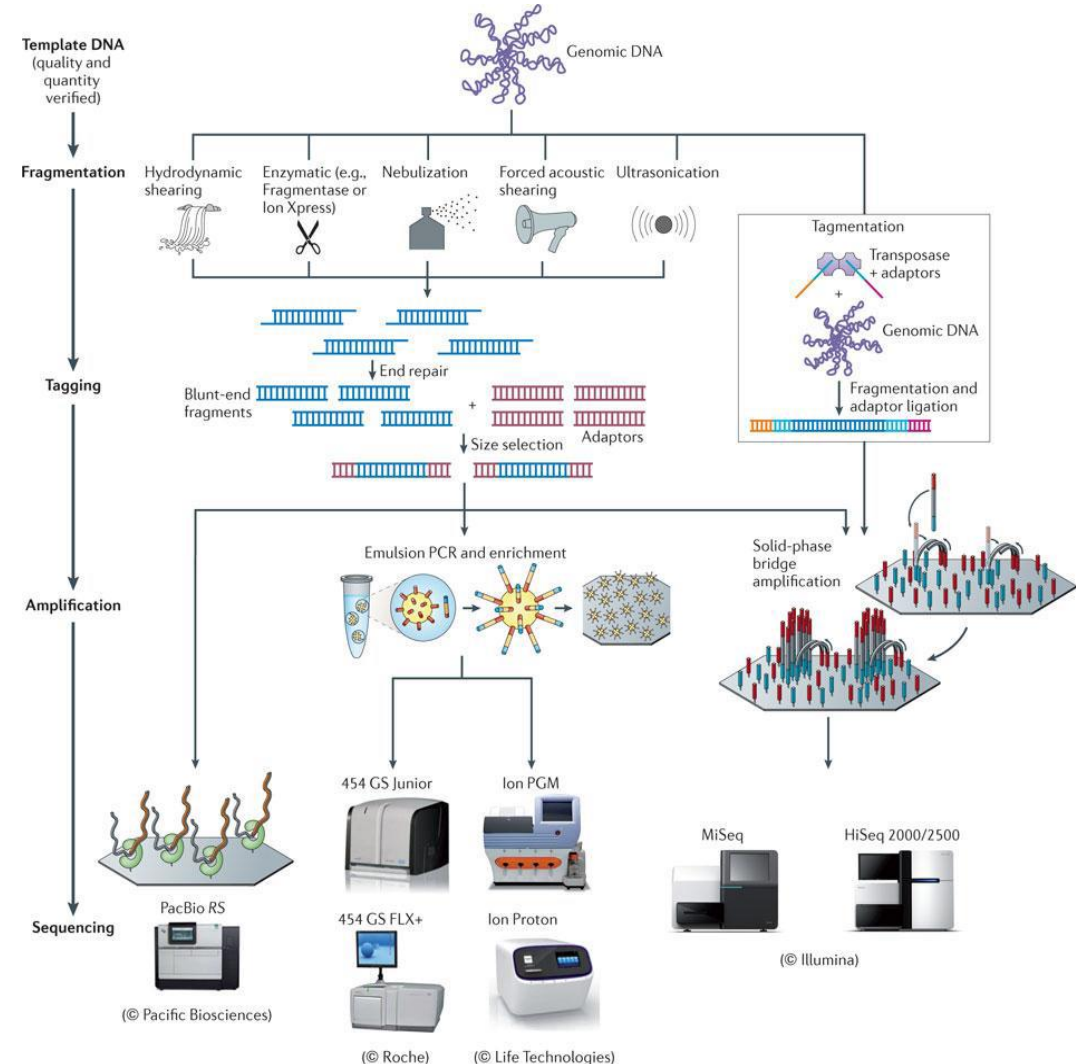
- SOLiD (ABI)

- Ion Torrent

3er Generación Next NGS

Single molecule Sequencing

- Nanopore



Análisis de datos:
Bioinformática!!!!



TECNICAS DE SECUENCIACION NUEVA GENERACIÓN: millones de secuencias en una corrida!!!

- Esta tecnología se está utilizando para estudiar el **viroma** en diversas muestras biológicas incluyendo materia fecal, muestras respiratorias
- Permite detectar nuevos virus
- Detecta cualquier agente
- Determinación de serotipos y genotipos
- Desventajas para utilizarlo en el diagnostico:
 - ✓ Alto costo y tiempo
 - ✓ Menor sensibilidad que real time PCR individual ó multiplex

Desafíos en el diagnóstico de virus respiratorios

- Determinar el rol de cada agente en las co-infecciones
- Estandarización de PCR cuantitativas o el potencial uso de PCR digital
- Aplicación e interpretación de las cargas virales en las distintas poblaciones y situaciones clínicas
- Utilización de técnicas de secuenciación masiva al diagnóstico
- Se requieren más estudios para trasladar estas herramientas a algoritmos diagnósticos que permitan un mejor manejo del paciente y la vigilancia de nuevos agentes respiratorios



Gracias por su atención !!!

vromano@cemic.edu.ar

