

# Aspecte privind investigațiile de laborator pentru gripă în sezonul 2019-2020

Lazăr Mihaela, Mihai Maria Elena, Cherciu Carmen, Ivanciuc Alina, Bistriceanu Iulia, Pascu Cătălina

Laboratorul Infecției Respiratorii Virale

Institutul Național de Cercetare Dezvoltare Medico – Militară „Cantacuzino”

# Virusurile gripale

- **Virusurile gripale A**

Sunt împărțite în subtipuri pe baza a două proteine aflate pe suprafața virusului:

- hemaglutinina (H)
- neuraminidaza (N).

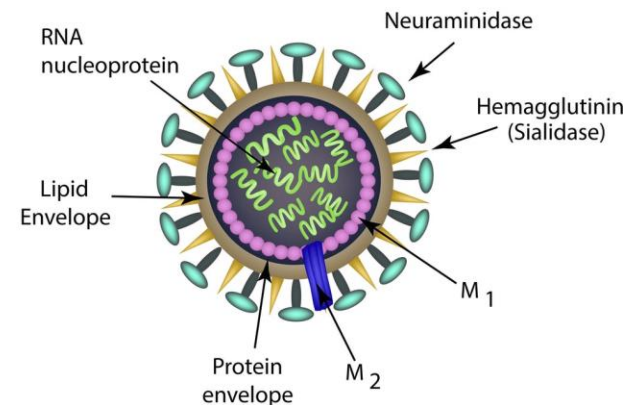
Există 18 subtipuri diferite de hemaglutinina (de la H1 la H18) și 11 subtipuri diferite de neuraminidaza (de la N1 la N11).

Subtipurile actuale ale virusurilor gripale A întâlnite la oameni sunt: A(H1N1) și A(H3N2).

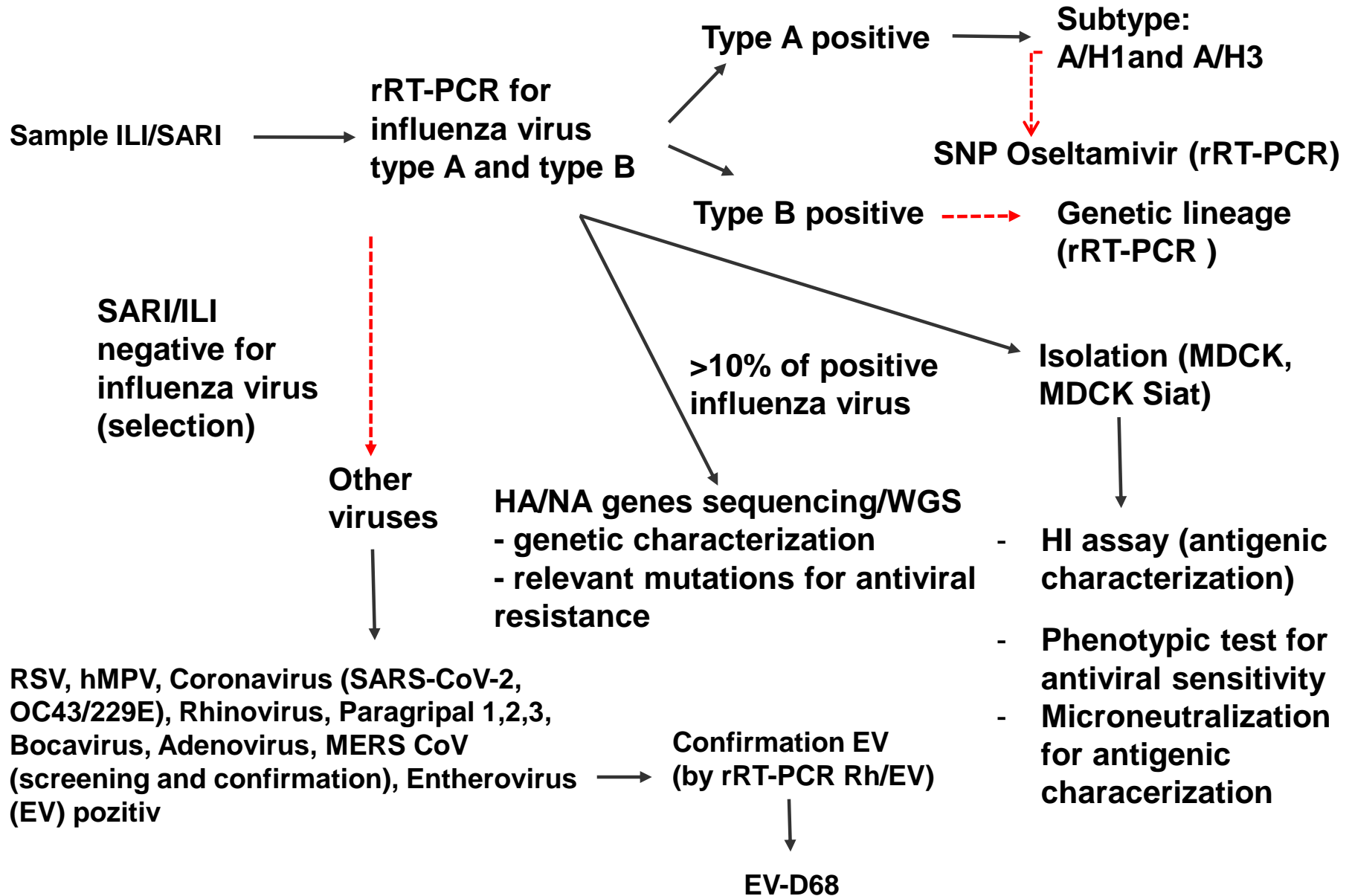
În primăvara anului 2009, a fost identificat un nou virus gripal A(H1N1) diferit de virusurile gripale umane A(H1N1), care circulau la acel moment. Noul virus a provocat pandemia cunoscută sub denumirea de “gripa porcină”, deoarece conține gene de la virusurile gripale umane, porcine și aviare.

- **Virusurile gripale B**

Acestea nu sunt împărțite în subtipuri, dar se divid în linii și tulpini gripale. În prezent, circulă în rândul populației virusurile gripale B care aparțin uneia dintre cele două linii: B/Yamagata și B/Victoria.



# Algoritmul de diagnostic pentru gripă și alte infecții respiratorii



# Metodele de analiză a virusurilor gripale utilizate în laborator (IC)



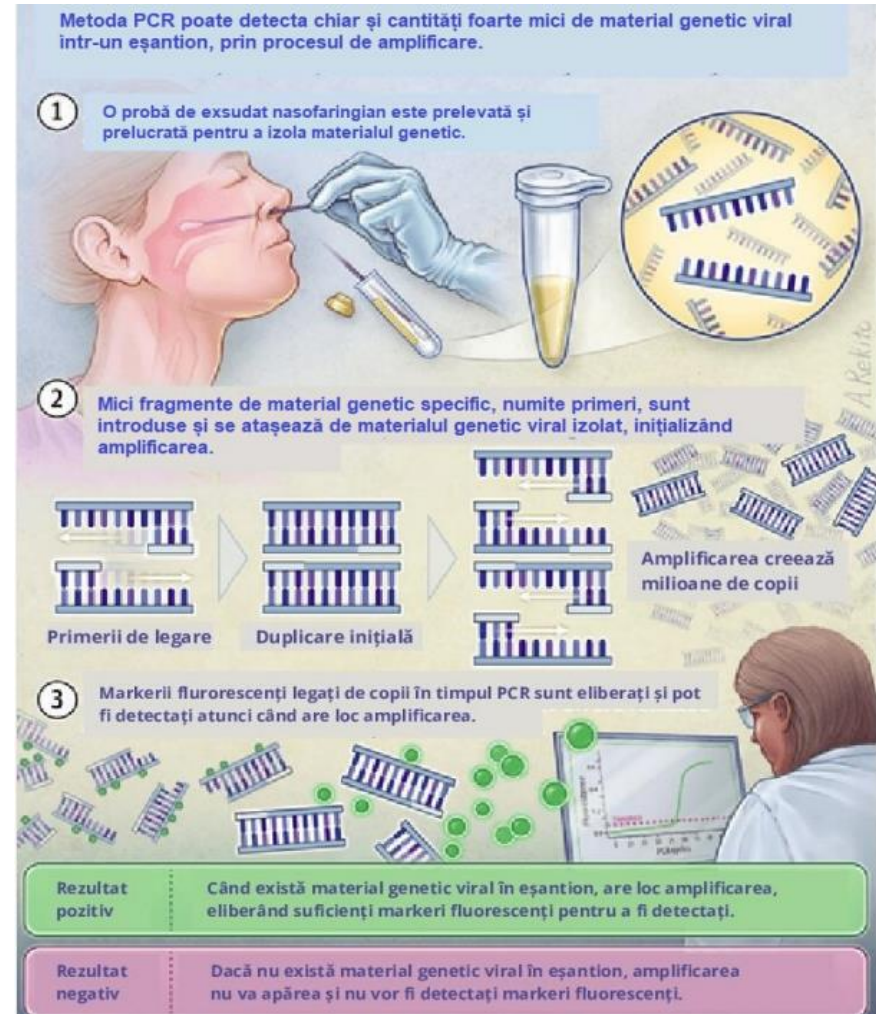
- Testarea – modalitatea de a stabili diagnosticul corect cu scopul:
  - monitorizarea evoluției gripei
  - monitorizarea și investigarea etiologică a focarelor, în special a celor de colectivitate
  - cunoașterea severității infecției gripale în populația României
  - monitorizarea circulației și a rezistenței la antivirale a virusurilor gripale umane
- **Detectie real- time rRT-PCR** de tip duplex, a virusului gripal tip A /B și subtip H1/H3. Reacția de amplificare în lanț în timp real (Real-Time RT- PCR) pentru detecția genei matrix (M) a virusului gripal de tip A și B, a genei glicoproteinei de suprafață – hemaglutinina tipului A, subtipul H1, H3, H5, H7, H9 și neuraminidazei NA N1, N2 pentru detecția moleculară a liniilor genetice ale virusului gripal tip B.

Metoda include un panel de primeri oligonucleotidici și sonde (Taqman/ MGB) marcate, specifici fiecărui tip/ subtip viral/ linie genetică, recomandați de către OMS și profilul temic specific, suportand optimizarea și validarea la fiecare nou sezon epidemic mai ales pentru subtipul A/H3 care înregistrează cea mai mare variabilitate genetică în urma propagării acestuia în populația umană.
- Identificarea anticorpilor de virus gripal din seruri pereche prin **testul de hemaglutinoinhibare-HI**.
- Identificarea antigenică a tulpinilor de virus gripal izolate din cultură celulară, circulante în sezonul epidemic de gripă (testul hemaglutinoinhibare-HI) inclusiv a liniilor antigenice ale virusului gripal tip B (linia B/Victoria și B/Yamagata). Antigene și antiseruri de referință - The Worldwide Influenza Centre - Francis Crick Institute, Londra, UK (centrul colaborator OMS).
- Identificarea susceptibilității la antivirale a tulpinilor de virus gripal izolate circulante (detectie moleculară SNP real-time RT-PCR, **testarea fenotipică a inhibării activității neuraminidazei - NA virusului gripal**.
- Analiza genetică a tulpinilor circulante de virus gripal, **secvențiere clasică Sanger și NGS**.

## Detectia virusurilor non-gripale în laborator se realizează prin:

- Detectie moleculară de tip multiplex pentru PCR clasic cu vizualizarea rezultatelor in gel de agaroză și real-time RT-PCR.

# Testul RT-PCR pentru detectarea virusurilor gripale



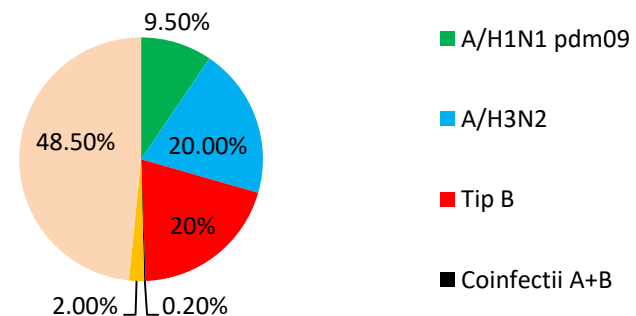
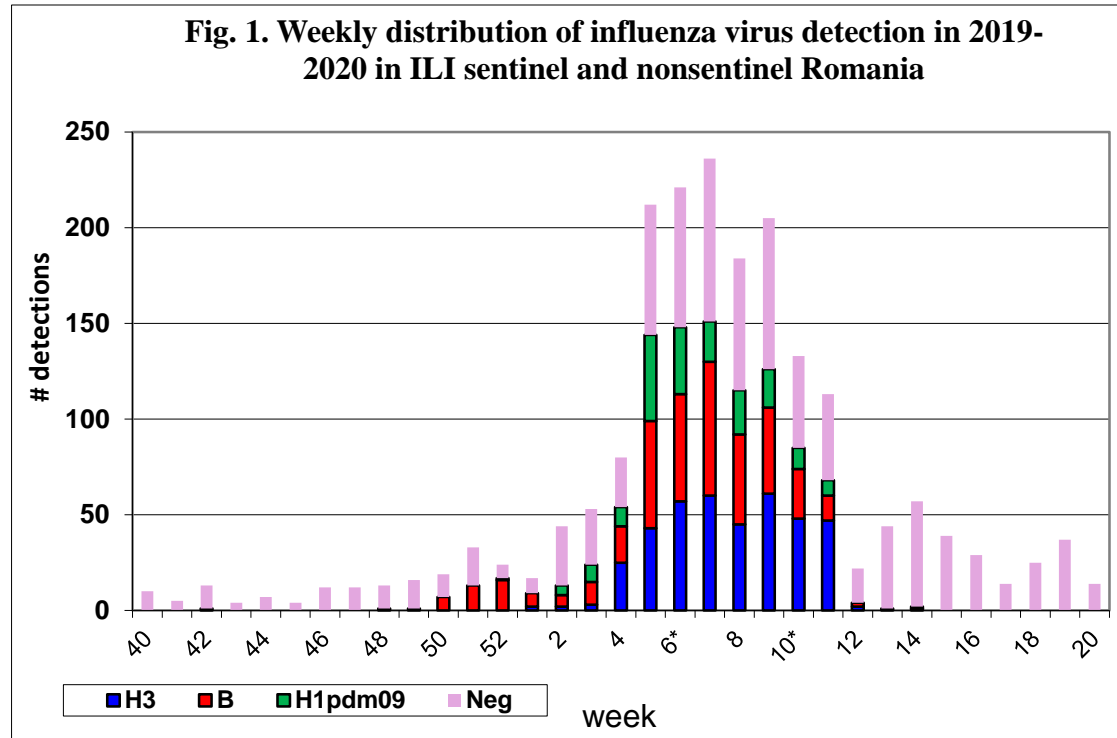
# ILI în sistemul santinelă si non-santinelă sezon 2019-2020

## 1991 specimene testate (IC)

**Pozitive virusuri respiratorii: 1024 (51,5)%**

- **Tip A: 586 (57,4%)**
  - **H1N1 pdm09: 189 (32%)**
  - **H3N2: 397 (67%)**
- **Tip B: 398 (39 %)**, Linia genetica B Victoria.
- **Coinfectie A cu B: 4 (0,4%)**
- **Alte virusuri respiratorii: 36 (3,5%)**
- **Negativi: 967 (48,5%).**

**Fig. 1. Weekly distribution of influenza virus detection in 2019-2020 in ILI sentinel and nonsentinel Romania**



**Fig.2 Distributia virusurilor gripale in probe ILI**

# SARI în sistemul santinelă și non-santinelă sezon 2019-2020: 517 specimene testate (IC)

- Pozitive virusuri respiratorii: 236 (45,6%):
  - H1N1 pdm09: 82
  - H3N2: 91
  - Tip B: 56 (10,8%), linia genetică B Victoria
  - Coinfecție A cu B: 1(0,2%)
- Alte virusuri respiratorii: 6 (1,1%) (din care 3 RSV)
- Negativi: 281 (54,3%)

Figure 3. Weekly distribution of SARI cases 2019-2020

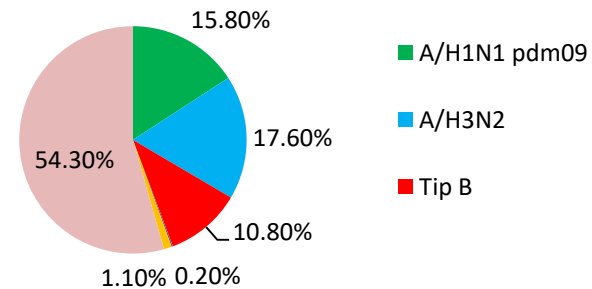
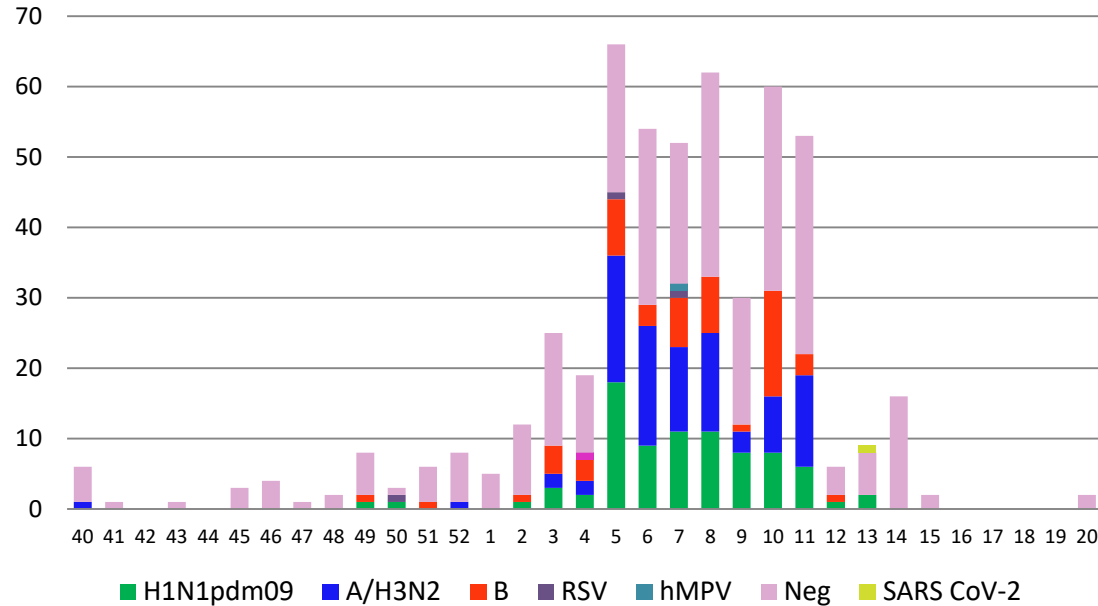


Fig.4 Distributia virusurilor gripale in probe SARI

# Multiplicarea și izolarea virusului gripal

- Scopul: caracterizarea antigenică și genetică a tulpinilor precum și pentru identificarea sensibilității/rezistenței la antivirale.
- Datele obținute în urma acestor analize aprofundate completează datele de supraveghere
- Substratul de multiplicare a virusului gripal - 2 linii celulare:
  - MDCK (Madin Darby celule de rinichi de câine – conțin receptori cu acid sialic legat  $\alpha$ - (2,3) și  $\alpha$ - (2,6) galactoză
  - MDCK-Siat-1 ( MDCK- linie modificată genetic:  $\alpha$ - (2,6) galactoză)
- Substratul de multiplicare a tulpinilor de referință-virus gripal:
  - Ouă embrionate de 10 zile.

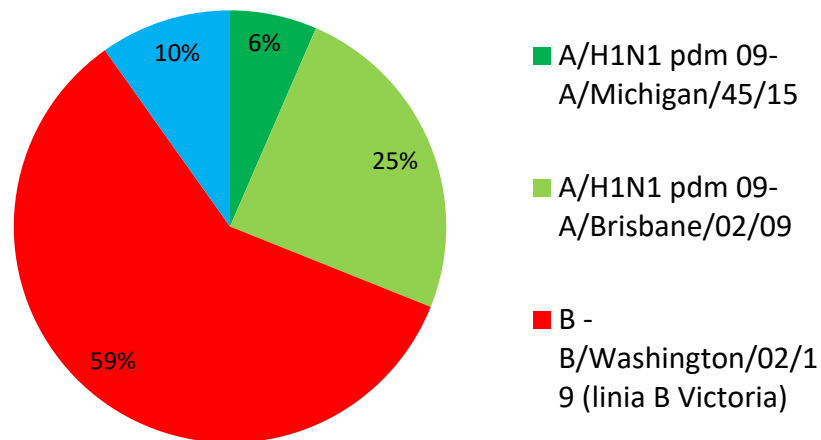
Caracterizarea antigenică analizează proprietățile antigenice ale virusului pentru a cunoaște cât de asemănător este cu tulpinile de referință.

## Testarea sensibilitatii la antivirale (oseltamivir) a tulpinilor de virus gripal izolate

22 tulpini izolate in cultura celulara (3 A/H1N1pdm09, 6 A/H3N2, 13 B) au fost testate fenotipic pentru sensibilitate la antivirale (oseltamivir).

Toate tulpinile testate au prezentat sensibilitate la oseltamivir.

**Fig.5 Caracterizarea antigenica a tulpinilor de virus gripal izolate in sezonul 2019/20 (N = 61)**





# Caracterizarea genetica a virusului gripal in sezonul 2019/2020

## (N = 159)

Au fost secventiate (metoda Sanger sau NGS) 159 tulpini de virus gripal din care 10 A/H1N1 pdm09, 38 H3N2 si 91 tip B. Investigarea epidemiilor prin detectarea variantelor de virus gripal circulante, identificarea mutațiilor de rezistență la antivirale, caracterizarea antigenică și genetică secvențierea pentru prima data a **întregului genom al virusului gripal**, prin utilizarea platformei de secvențiere de la Illumina.

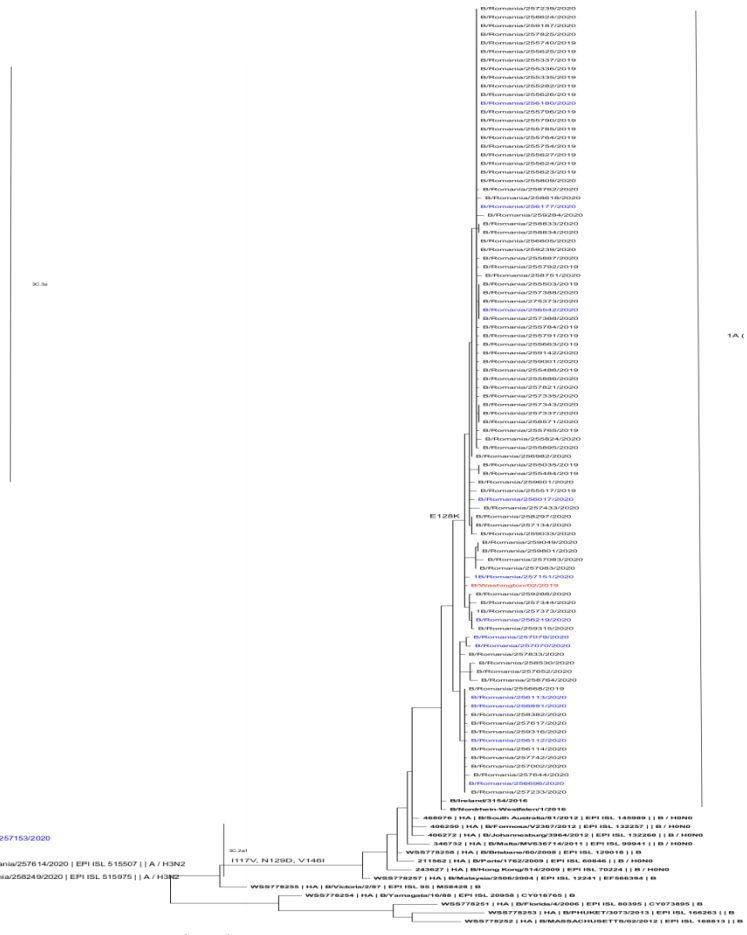
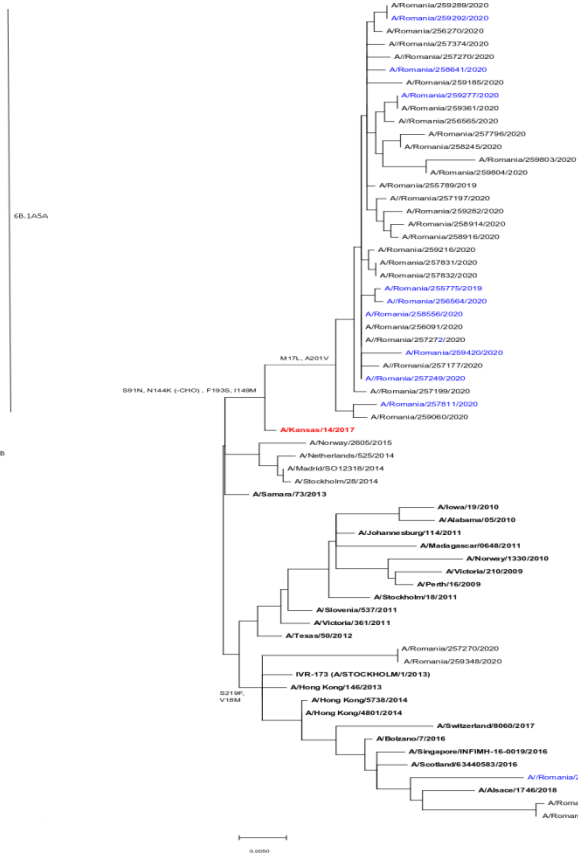
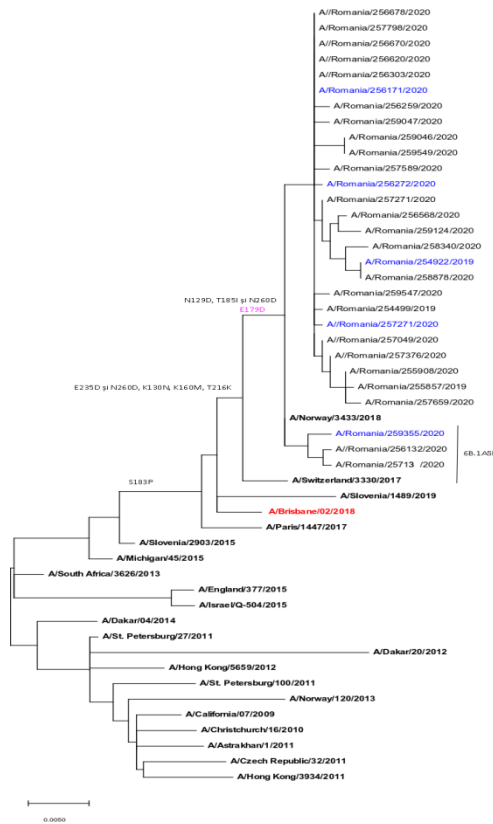


Figura 6 Analiza hemaglutininei (HA) tulpinilor reprezentative de A(H1N1)pdm09. Din subclada 6B.1A se desprind alte "ramuri", majoritatea virusurilor analizate poartă substituția de aminoacizi S183P în HA1.

Figura 7 Analiza filogenetică a hemaglutininei virusurilor gripale A/H3 reprezentative identificate în România prin comparare cu tulpini de referință.

Figura 8. Analiza filogenetică a tulpinilor de B (B-Victoria) isolate în România în relație cu tulpini de referință

### **Compoziția vaccinului gripal recomandată pentru sezonul 2019-2020 în emisfera nordică**

- A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09-like virus;
- A/Kansas/14/2017 (H3N2)-like virus;
- B/Colorado/06/2017-like virus (B/Victoria/2/87 lineage);
- B/Phuket/3073/2013-like virus (B/Yamagata/16/88 lineage)

### **Compoziția vaccinului gripal recomandată pentru sezonul 2019-2020 în emisfera nordică**

- *Egg-based Vaccines*
  - A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09-like virus;
  - A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2)-like virus;
  - B/Washington/02/2019 (B/Victoria lineage)-like virus;
  - B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage)-like virus (quadrivalent vaccines only).
- *Cell- or recombinant-based Vaccines*
  - A/Hawaii/70/2019 (H1N1)pdm09-like virus;
  - A/Hong Kong/45/2019 (H3N2)-like virus;
  - B/Washington/02/2019 (B/Victoria lineage)-like virus;
  - B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage)-like virus (quadrivalent vaccines only).

## Factori care pot influenta calitatea rezultatelor

- **Erori personale** in realizarea testelor, in interpretarea rezultatelor, înregistrarea si raportarea rezultatelor
  - Pot apărea erori randomice –ex. erori in pipetari
- **Erori legate de reactivi**, controale pozitive/negative utilizate in testari
  - Pot apărea erori sistematice – ex. variatii in temperatura de incubare, schimbarea lotului de reactivi etc.
- **Erori datorate calității probelor**, care pot contine inhibitori PCR
  - Inhibitorii PCR pot conduce la rezultate fals negative sau rezultate cantitative incorecte, acid nucleic degradat

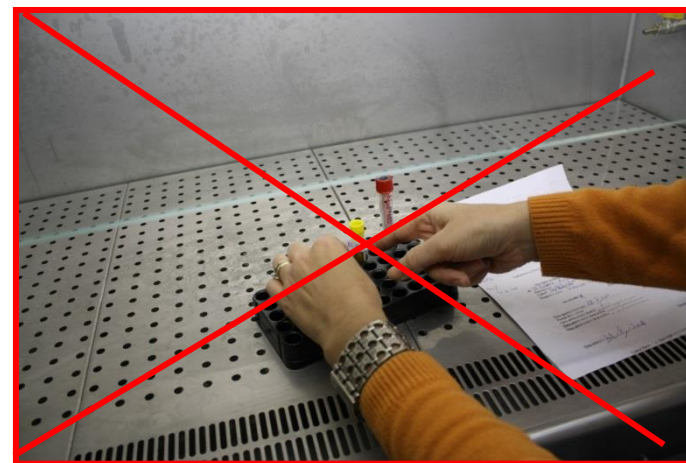
# Condiții specifice de funcționare pentru laboratoarele de biologie moleculară și analiză genetică

**Fluxul de lucru trebuie sa fie unidirectional atat pentru probe/reagenti/produsi de reactie cat si pentru personal**

- 1. Camera curata de preparare a reagentilor**
- 2. Camera de extractie a acizilor nucleici**
- 3. Camera de amplificare a acizilor nucleici**
- 4. Camera de analiza a produsilor PCR**

## Prevenirea contaminării în diagnosticul molecular

- În toate etapele de lucru se folosesc mănuși cu scopul de a preveni contaminarea produsului cu RN-ase de pe mâini. Acestea se schimbă după fiecare atingere a pielii (inclusiv fata) sau suprafețe, obiecte (usi, frigider etc.).
- Halat special pentru laborator **DEDICAT** fiecărei etape a procedurii PCR.
- Spațiile de lucru și instrumentele trebuie să fie decontaminate imediat după utilizare prin folosirea unei soluții de 0.1 N HCl (de regulă) urmată de iradiere UV, în special în camera în care s-a obținut ADN amplificat și camera de electroforeză.
- Componentele mixturii de reacție trebuie preparate într-o cameră specială, îndemnată de acizi nucleici.
- Pipete separate (dedicate) trebuie să fie folosite la fiecare etapă.
- Vârfurile trebuie să fie cu barieră, care trebuie să fie RNase DNase free, ca și tuburile.
- În toate etapele, stativul, pipetele și suprafețele de lucru trebuie șterse cu alcool 70%.
- Manipularea acizilor nucleici trebuie făcută în boxe de lucru închise, dedicate fiecărei etape, în camere separate.



## Concluzii

- *Un sezon mai scurt (saptamanile 4-12) în care virusurile gripale A(H1N1)pdm09, A(H3N2) și B au co-circulat*
- *Rezultatele obținute confirmă variabilitatea genetică a virusurilor gripale sezoniere și demonstrează necesitatea supravegherii moleculare continue în scopul identificării timpurii a noilor variante genetice cu semnificație epidemiologică.*
- *Caracterizarea antigenică și genetică reprezintă o sarcină fundamentală a centrelor de referință deoarece contribuie la stabilirea formulei vaccinului gripal și elaborării măsurilor preventive.*

## ***Mulțumiri***

- Personalului suport din laboratorul Infecției Respiratorii Virale: Luiza Ustea, Emilia Dobre, Nicoleta Paraschiv, Mirela Ene, Oana Vitencu, Mihaela Neacșu, Văduva Maria Magdalena.
- Tuturor persoanelor implicate în analizele epidemiologice, colectarea probelor, testări, analiza datelor.
- Mulțumiri speciale coordonatorilor programelor de supraveghere ARI/ILI (Dr. Rodica Popescu) și SARI (Dr. Odette Popovici), Institutul Național de Sănătate Publică, București și colegilor de la Centrele Regionale București, Cluj, Iași și Timișoara.

## ***Finanțare***

- Proiectul Nucleu PN19140206 Dezvoltarea strategiei de supraveghere a infecțiilor cauzate de virusurile respiratorii bazată pe tehnici de laborator eficiente pentru diagnostic, cu rol important în limitarea epidemiilor sau pandemiilor.
- Studile de măsurare a eficacității vaccinului gripal, coordonate de EPICONCEPT Franța, I-MOVE medici de familie și spitale: Spitalul de Boli Infecțioase Sfânta Parascheva, Iași și Spitalul de Boli Infecțioase și Tropicale Victor Babeș, București.
- Asociația Română pentru Promovarea Sănătății, SECID, Maintenance of Basic Surveillance System Implementation Activities and Response to Avian, Pandemic and Seasonal Influenza in Southeast European Countries" with Grant Number: 1NU51IP000896-01-01, funded by Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

***Mulțumesc pentru atenție!***