



STAMBOULIAN  
PRIMERO, LA SALUD

## Virus de Influenza A H1N1 2009



12 min.



En abril de 2009 se notificaron a la Organización Mundial de la Salud casos humanos de infección por un nuevo virus H1N1. Las informaciones suscitaron de inmediato gran preocupación porque los genes del virus procedían de virus de gripe animal, lo que confirmaba definitivamente que este virus era muy diferente de los de la gripe estacional, que habitualmente infectan al ser humano. Este nuevo virus estaba provocando brotes en la comunidad, transmitiéndose entre personas. En México, los primeros brotes ocasionaron víctimas mortales y graves enfermedades respiratorias.



Bioq. Edgardo Sturba  
Biología Molecular  
Stamboulian Laboratorio



E-mail:  
esturba@cei.com.ar



A comienzos de abril de 2009, el Centers for Disease Control and Prevention

(CDC) reportó dos casos de enfermedad respiratoria febril en niños, causada por una cepa nueva de Influenza A denominada H1N1/2009 (H1N1/2009). Varios días después se reportaron 47 casos en México, 12 de ellos fatales, producidos por la misma cepa. En junio de 2009, se estimaban cerca de 30.000 casos distribuidos en 74 países, realidad que obligó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a elevar a la Fase 6 la alerta epidemiológica, declarando así el comienzo de la pandemia.

### Características

El virus Influenza pertenece a la familia Orthomyxoviridae, que posee 3 tipos: A, B y C. Mientras que el primero infecta a humanos, aves, cerdos y otros mamíferos, los últimos dos sólo infectan al hombre. La estructura viral tiene 8 segmentos de ARN (-) que codifican para 11 proteínas, de las cuales las hemaglutininas (H) y las neuraminidasas (N) son fundamentales en la transmisión y la respuesta inmune, y además son las que permiten la subtipificación viral. Estos virus pueden realizar dos tipos de variaciones antigénicas, lo que depende de ciertas condiciones, variaciones menores denominadas "drift" referidas a pequeños cambios antigénicos en la H y/o N que permiten el escape al sistema inmune y explican la necesidad de nuevas vacunas cada año; y por otro lado, variaciones mayores denominadas "shift", que implican la introducción de subtipos virales

nuevos nunca antes reconocidos por el sistema inmune. Estos cambios mayores se producen por intercambio genómico entre los 8 segmentos de ARN viral de diferentes subtipos que infectan simultáneamente a un mismo huésped, habitualmente reservorio animal. Estos "shift" explican, entre otras, las 3 pandemias producidas en el siglo XX, en 1918 por Influenza A H1N1 aviar, en 1957 por Influenza A H2N2 y en 1968 por Influenza AH3N2.

El nuevo subtipo viral "Influenza A H1N1/2009" es una re-asociación de 4 subtipos virales: H1N1 aviar, H1N1 porcina de Eurasia y de América del Norte y H3N2 humana estacional.

### Transmisión

Las vías de transmisión son similares a las del virus estacional, pero con mayor capacidad de transmisión entre humanos, esto indicado por el número de casos secundarios, estimándose un número de reproducción básico  $> 1.0$  (1.2-1.7) compatible con la confirmación de pandemia. Por otra parte, este nuevo subtipo viral ha tenido un marcado aumento en la transmisión en la población de niños y jóvenes, comparada con la de adultos mayores de 50 años. A diferencia de la gripe estacional, ha producido mayor cantidad de casos graves en adultos jóvenes sin factores de riesgo, como también, en embarazadas y obesos.

- **Inmunoensayos**  
ADVIA Centaur XP  
ADVIA Centaur  
ADVIA Centaur CP  
IMMULITE 2000  
IMMULITE 1000  
IMMULITE  
Serodia
- **Química Clínica**  
ADVIA 2400  
ADVIA 1800  
ADVIA 1650  
ADVIA 1200
- **Sistemas Integrados (Inmunoensayos y Química Clínica)**  
Dimension Rod. Max / HM  
Dimension Xpand / HM
- **Hemostasia**  
BCS XP  
BCS  
CA 560  
BFT II
- **Hematología**  
ADVIA 120  
ADVIA 2120
- **Automatización e Integración**  
ADVIA LabCell  
ADVIA WorkCell  
ADVIA VersaCell  
ADVIA Centralink
- **Cuidados Críticos**  
Rapidlab Serie 1200  
Rapidlab Serie 800  
Rapidlab 348  
Rapidlab 248  
Rapidchem 744 / 754
- **Análisis de Orina y Diabetes**  
Clinitek Atlas  
Clinitek Advantus / Clinitek 500  
Clinitek Status / Clinitek 50  
DCA Vantage / DCA 2000  
Multistix 10 SG
- **Biología Molecular**  
Versant 440  
System 340 bDNA  
Versant HIV-1 RNA 3.0 bDNA  
Trugene HIV-1  
Versant HCV 3.0 bDNA  
Versant HCV Genotype Assay LiPA  
Versant HBV 3.0 bDNA

## Una Nueva Era en Diagnósticos

Siemens Healthcare Diagnostics  
www.siemens.com/diagnostics · Tel. 011 4738 7424

**SIEMENS**

Las manifestaciones clínicas son similares a las de la gripe estacional y las de otros virus respiratorios, motivo por el que es fundamental el diagnóstico diferencial, que permite confirmar casos sospechosos y conocer el desarrollo de la epidemia.

### Métodos Diagnósticos

Las metodologías diagnósticas son similares a las utilizadas para los virus respiratorios y en particular para Influenza, pero debemos conocer sus limitaciones en cuanto a sus posibilidades concretas de detección, qué sensibilidad, especificidad y valores predictivos poseen.

Dentro de las técnicas para la detección de anticuerpos, solo son útiles para diferenciar este subtipo la inhibición de la hemaglutinación y la neutralización, ambas de realización exclusiva en Centros de Referencia y con fines de investigación para conocer cuál es la respuesta inmune de determinadas poblaciones y la evaluación de respuesta a las vacunas. No se utilizan en la práctica diaria para diagnóstico.

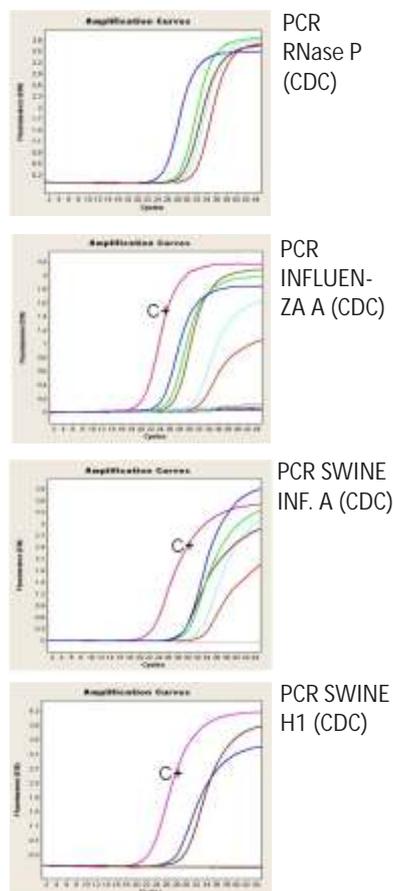
Habitualmente, el diagnóstico de influenza se realiza por métodos de detección de antígenos, como la inmunofluorescencia directa o indirecta, y métodos rápidos como enzimoimmunoensayos o inmunocromatografías. Estas metodologías presentan dos inconvenientes, el primero de los cuales es que no diferencian entre subtipos virales de Influenza y solo algunas, diferencian entre tipos (A o B); y el segundo es su muy baja y variable sensibilidad, que puede oscilar entre el 10 y el 70% según sea la situación epidemiológica de la población estudiada. Sin embargo, estas metodologías tienen un alto valor predictivo positivo cuando el estudio se realiza durante los períodos epidémicos o pandémicos.

Las únicas metodologías que permiten detectar Influenza A y diferenciar el subtipo viral son el Cultivo Viral y la RT-PCR convencional o en tiempo real. El cultivo se realiza exclusivamente en Centros de Referencia, es complejo, costoso y

tardío, pero es de vital importancia para el reconocimiento de nuevas cepas y su sensibilidad a antivirales. El "gold standard" para la detección de la nueva cepa Influenza A H1N1 / 2009 es la RT-PCR en tiempo real (Figura 1).



Figura 1: Curvas de amplificación en tiempo real con el sistema CDC



En los comienzos de la pandemia, el CDC elaboró un protocolo "RT-PCR Swine Flu panel" con primers y sondas específicas para la realización de una RT-PCR en tiempo real dirigido a diferentes zonas del genoma H1N1/2009. Este protocolo fue distribuido en los Centros de Referencia del mundo para su realización y luego, estuvo al alcance de otros laboratorios. Posteriormente, surgieron equipos comerciales de diferentes marcas con formatos similares, algunos para detectar dos y otros tres genes que permiten

diferenciar subtipo viral de Influenza A. En particular, se detectan los genes que codifican para la proteína de matriz (M2), nucleoproteína (NP) y hemaglutinina (H1). La primera de ellas, M2, es compartida por todas las cepas de Influenza A, mientras las otras son específicas de H1N1/2009. Según el criterio del CDC, si la muestra es positiva para los genes de matriz y al menos uno de los genes de nucleoproteína o hemaglutinina H1, se considera positiva para H1N1/2009. Además, este protocolo incluye una PCR para un control interno que evalúa calidad de la muestra y/o la presencia de inhibidores.

El equipo comercial más utilizado en la Argentina fue el "Swine Inf A/H1N1 Detection Set" de Roche, el cual posee una sonda para el gen de la matriz, M2, y una sonda para la hemaglutinina, H1, y si ambas dan resultado positivo indican la presencia de H1N1/2009.

Evaluar la sensibilidad y especificidad de estos equipos es difícil por tratarse de una nueva cepa viral, pero considerando algunos datos bibliográficos comparativos entre diferentes metodologías en tiempo real, la calidad de la muestra y el momento de la toma, son técnicas altamente sensibles y específicas.

Las muestras utilizadas son las del tracto respiratorio superior, aspirados nasofaríngeos, hisopados nasofaríngeo y del tracto respiratorio inferior, lavados bronco-alveolares, aspirados traqueales, colocados en medio de transportes virales y conservados a 4°C, hasta 4 días. El tiempo de excreción viral es aproximadamente de 7 días desde el comienzo de los síntomas, y puede extenderse hasta más de 10 días en niños y jóvenes y hasta semanas en huéspedes inmunocomprometidos, siempre que no exista tratamiento antiviral previo.

Una revisión de los resultados obtenidos con estas técnicas indica que en los casos graves, muestras del tracto respiratorio superior pueden dar resultados negativos, por lo cual se requiere una segunda muestra del tracto respiratorio

inferior para confirmar el resultado previo. Se han reportado porcentajes variables de falsos negativos en estas situaciones, siempre menores del 3%.

En nuestra experiencia, hemos utilizado el equipo comercial de Roche, más un control interno de calidad de muestra e inhibición y las sondas del CDC, en ambos casos con sondas Taqman en Light Cycler 2.0 (Roche).

Hemos procesado 1089 muestras: el 90% de las positivas correspondió al H1N1/2009 y el 10%, a Influenza A estacional. Las muestras positivas procesadas con el equipo de Roche fueron confirmadas con el protocolo del CDC. En un trabajo comparativo entre el equipo de Roche y las sondas del CDC, con aproximadamente 100 muestras, un 30% de ellas positiva, hemos encontrado una correlación del 100% entre las dos metodologías. Este trabajo fue presentado en el Congreso de Enfermedades Infecciosas del Hospital

Muñiz, en noviembre de 2009.

#### Uso de Antivirales

La correcta interpretación de los resultados obtenidos con las técnicas moleculares requiere la información clínica, epidemiológica y el conocimiento de la utilización de antivirales.

Una futura utilidad de los estudios moleculares es la evaluación de resistencia a inhibidores de la neuraminidasa, como el oseltamivir y zanamivir. Se han descrito en diferentes lugares del mundo casos aislados de resistencia al oseltamivir en la cepa H1N1/2009. En todos los casos, se encontró una mutación en el gen de la neuraminidasa en la posición 275 (H275Y) y en algunos, una segunda mutación I223V. Existen metodologías de RT-PCR en tiempo real que detectan estas mutaciones, lo que permite evaluar falla de tratamiento y realizar el cambio adecuado de antiviral.

En conclusión, la detección del subtipo viral de Influenza A circulante es fundamental para el correcto manejo del paciente, el tratamiento, y el seguimiento epidemiológico en cada región. En casos especiales de mala evolución y probable falla de tratamiento, se puede evaluar la resistencia al antiviral más utilizado, como el oseltamivir.

El acceso a la vacuna específica de subtipo viral para los grupos seleccionados, trabajadores de la salud, embarazadas, niños de entre 6 meses y 5 años, inmunocomprometidos y todo paciente adulto con alguna enfermedad respiratoria y/o cardíaca concomitante, es fundamental para evitar casos graves y la propagación de la infección.



## Mucho más que resultados.



Sede Central Bahía Blanca  
San Martín 68 | (B8000BIF)  
Teléfono: +54 0291 459-9999  
laboratorios@iaca.com.ar

Sede Buenos Aires C.A.B.A.  
Teléfono: +54 011 43710046  
Móvil: 011 15 513 22214  
buenosaires@iaca.com.ar

Sede Mar del Plata:  
Móvil: 0223 15 424 9300  
mardelplata@iaca.com.ar

[www.iaca.com.ar](http://www.iaca.com.ar)



**IACA**  
LABORATORIOS

Genética Molecular  
Filiación  
Estudios Forenses  
Citometría de Flujo  
Enf. Metabólicas  
Screening Neonatal  
Toxicología Laboral  
Enf. Infecciosas  
Histocompatibilidad