

Uso de pruebas moleculares en la vigilancia de la infección respiratoria aguda en Antioquia, Colombia

María Angélica Maya, Celeny Ortiz, Ana Isabel Davila, Diego Bastidas, Seti Buitrago, Francisco Averhoff, Michael Berg, Laura Pérez, Karl Ciuderis-Aponte, Mabel Carabali, Paulina Rebolledo, Juan P. Hernández-Ortiz, Jorge E. Osorio



IMPORTANTE

- *La siguiente presentación incluye datos aún no publicados y que persisten en proceso de análisis.*
- *Sus opiniones y recomendaciones serán apreciadas.*
- Este trabajo fue apoyado por el Grupo de Trabajo para la Salud Global, el Programa de Pequeñas Subvenciones de TEPHINET, Abbott (P.O # 4629), y la Coalición Abbott Pandemic.



GOBERNACIÓN DE ANTIOQUIA

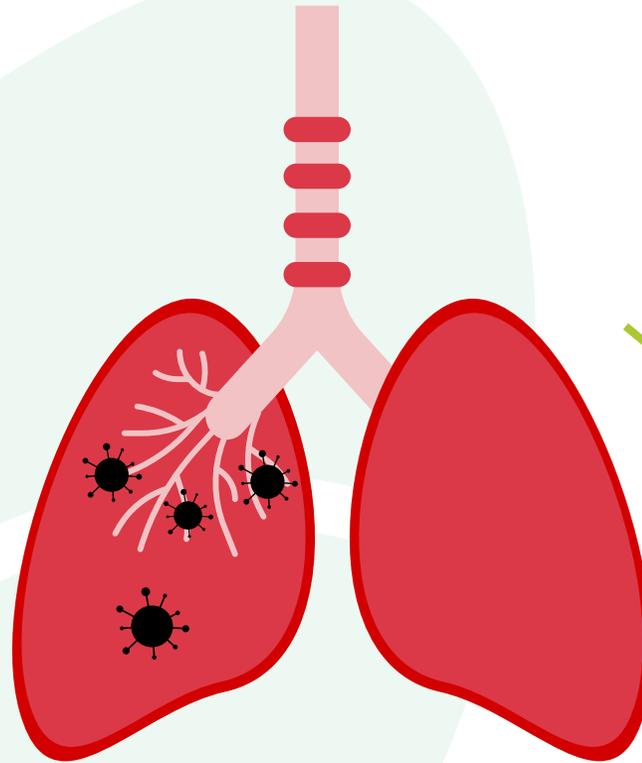


IRA

Grupo de enfermedades que afecta vías respiratorias / Mayor frecuencia a lo largo la vida del ser humano

Transmisión

Virus y/o bacterias contacto con gotas o aerosoles, contacto físico y/o por medio de fómites



Factores de riesgo

Características del patógeno causal, medio ambiente, edad, tabaquismo, estado inmunitario y nutricional

Manifestaciones

Asintomática, leve o grave /muerte (Amplias variedad de síntomas)

Datos IRA a nivel mundial



IRA diez primeras causas de morbilidad y mortalidad en el mundo

4.000.000

Muertes al año

4ta

Causa de defunción en población general

2da

Causa defunción en países ingresos bajos



Ocurre más del 60% de las muertes

Cada año, en todo el mundo aparecen brotes por infección respiratoria aguda de extensión e intensidad variables.



GOBERNACIÓN DE ANTIOQUIA



UNIDOS

Etiología de la IRA

Virus (80 – 90%)

**Nuevos agentes:
Desde 2009 H1N1
Desde 2019 SARS CoV-2**

Etiología NAC

**Vigilancia
centinela**

**Identificar que circula
en el medio**

NAC grave

**Inusitada ¿nuevos
patógenos?
Grave: Hospitalización**



OBJETIVO

Principal

Evaluar los beneficios del uso de pruebas moleculares y secuenciación en el protocolo de vigilancia de enfermedad similar a influenza (ESI) e infección respiratoria aguda grave (IRAG).

Motivaciones

Alto porcentaje de las muestras tomadas en vigilancia centinela terminan sin diagnóstico microbiológico (1).

Mejores herramientas de diagnóstico para identificar nuevos agentes circulantes y caracterizar el espectro (2).

(1) Robin Brittain-Long, et al. BMC Med. 2011 Apr 26;9:44. (Sweden)

(2) Sander van Boheemen et al. J Mol Diagn. 2020 Feb;22(2):196-207. (Netherlands)



Metodología

Tipo Estudio

Observacional
tipo Cross-
Sectional

Población

Pacientes que
consultaron por
urgencias a las
unidades centinelas
y cumplían criterios
de ESI o IRAG

Enrolamiento

Consentimiento
Informado

Muestras

Aspirado o
hisopado
nasofaríngeo

Datos

Ficha
epidemiológica



GOBERNACIÓN DE ANTIOQUIA



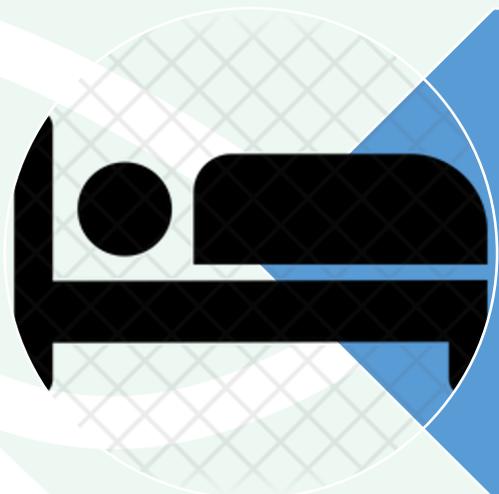
UNIDOS

Definición ESI e IRAG



Definición de caso ESI

Una persona con infección respiratoria aguda, con fiebre de 38 °C y tos de no más de siete días de evolución, requiere tratamiento ambulatorio.



Definición de caso de infección respiratoria aguda grave

Una persona con una infección respiratoria aguda, con antecedentes de fiebre y tos, no mayor de 10 días de evolución requiere manejo hospitalario.

Las pruebas moleculares en la vigilancia de la infección respiratoria aguda en Antioquia, Colombia

Metodología

- Fecha: Marzo a Junio de 2022.
- Unidades Centinela:
 - Hospital San Vicente de Paul (HSVF).
 - Hospital San Juan de Dios de Yarumal.
 - Hospital San Rafael de Yolombó.
- Las muestras y el cuestionario fueron anonimizados previo al análisis.
- Se capturaron variables demográficas, clínicas y epidemiológicas.
- El estudio fue aprobado por el comité de ética del HUSVF.



Las pruebas moleculares en la vigilancia de la infección respiratoria aguda en Antioquia, Colombia

Metodología

Pruebas diagnósticas del protocolo (manejo estándar actual):

Inicialmente todas las muestras se analizaron por inmunofluorescencia directa (D3 Ultra 8 Diagnostic Hybrids, Inc, USA) y PCR para SARS-CoV2.

** Pruebas tradicionales.



En muestras positivas para influenza se realizó PCR para subtipo de influenza (LDSA).

Adenovirus, influenza A, influenza B, parainfluenza 1, parainfluenza 2, parainfluenza 3, VSR, Metapneumovirus

LDSP: Laboratorio Departamental de Salud Pública de Antioquia.

VRS: Virus Sincitial Respiratorio.

** Cultivo de muestras respiratorias, serologías, hemocultivos.



GOBERNACIÓN DE ANTIOQUIA



UNIDOS

Las pruebas moleculares en la vigilancia de la infección respiratoria aguda en Antioquia, Colombia

Metodología

Pruebas diagnósticas adicionales
(pruebas objeto de estudio):



Influenza A, A-H1, A-H1pdm09, A-H3, B; RSV A, RSV B, Adenovirus, Enterovirus Metapneumovirus, Parainfluenza virus 1,2,3,4; Bocavirus 1/2/3/4, Coronavirus 229E, NL63, OC43, Bordetella pertussis, *Bordetella parapertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*



Las pruebas moleculares en la vigilancia de la infección respiratoria aguda en Antioquia, Colombia

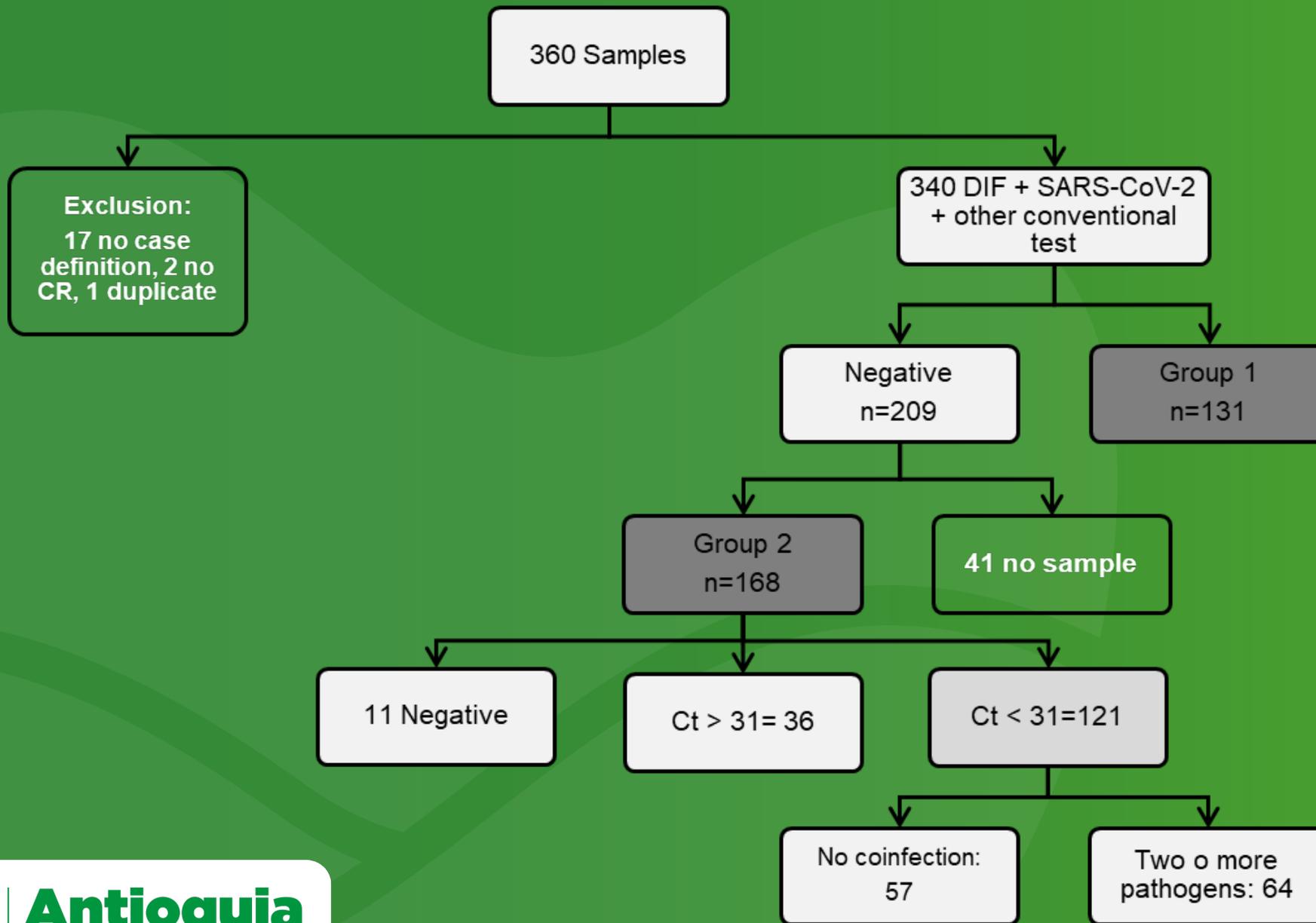
Metodología

Análisis estadístico

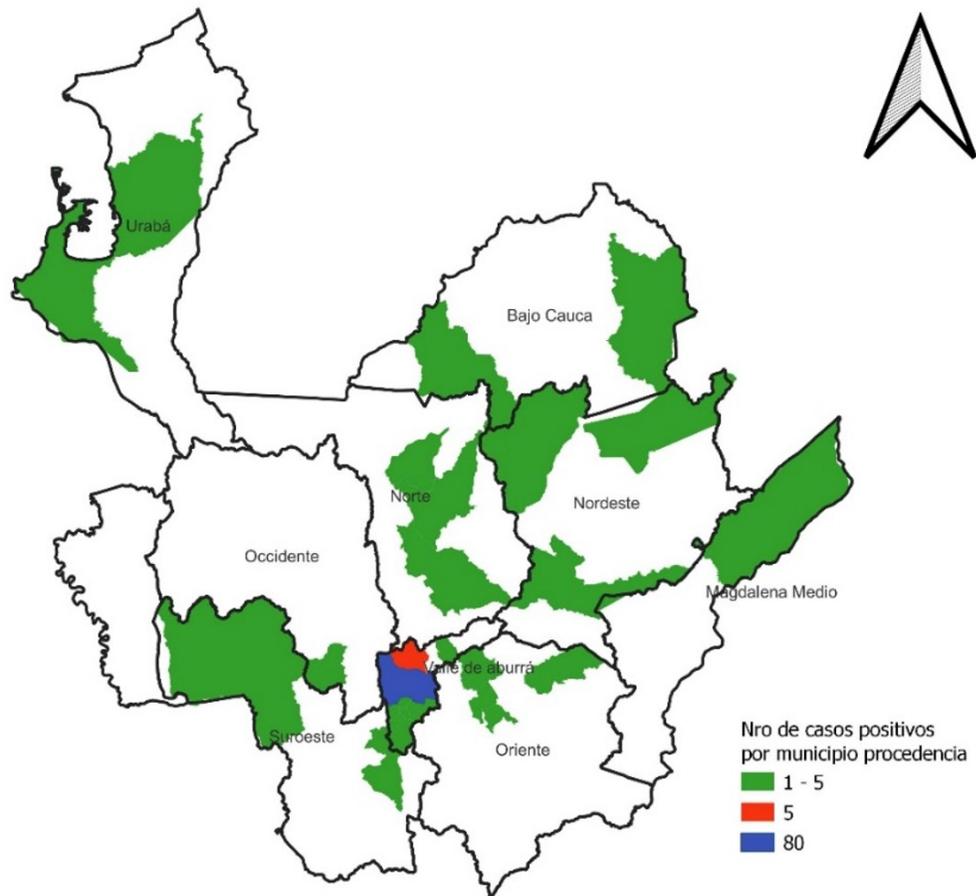
- Los datos se introdujeron mediante doble entrada en una hoja de cálculo de Microsoft Excel (Excel 2010 (14.0)).
- Grupo 1: diagnóstico microbiológico después de DIF de rutina, SARSCoV2 PCR, cultivo o pruebas serológicas.
- Grupo 2: sin diagnóstico microbiológico después de DIF de rutina, SARSCoV2 PCR, cultivo o pruebas serológicas.
- Se utilizó el software SPSS (IBM, Statistics 26) para el análisis estadístico.



Distribución de las muestras recolectadas en Grupo 1 y Grupo 2 según resultados de las pruebas realizadas



HC: historia clínica.
IFD: Inmunofluorescencia directa.
Ct: *Cycle Threshold*.



Referencia geográfica de casos de acuerdo al municipio de procedencia, Antioquia (Colombia)



GOBERNACIÓN DE ANTIOQUIA



UNIDOS

Las pruebas moleculares en la vigilancia de la infección respiratoria aguda en Antioquia, Colombia

Resultados

Distribución de la población estudiada según el sexo en los grupos 1 y 2

	Group 1		Group 2		Total		p- x ² value
	Total	%	Total	%	Total	%	
	131	43,8	168	56,2	299	100	
Sex							
Women	62	47,3	71	42,3	133	44,5	0,382
Men	69	52,7	97	57,7	166	55,5	



Distribución de la población estudiada según la edad en los grupos 1 y 2

	Group 1		Group 2		Total		p- x ² value
Age (years)							
Median (IQR)	1,5 (2,6)		2,7 (3,8)		2,4 (3,3)		
< 1	50	38,2	30	17,9	80	26,8	0,000
1	28	21,4	23	13,7	51	17,1	0,080
2 a 4	38	29,0	69	41,1	107	35,8	0,031
5 a 19	10	7,6	31	18,5	41	13,7	0,007
20 a 39	2	1,5	6	3,6	8	2,7	-
40 a 59	1	0,8	1	0,6	2	0,7	-
> 60	2	1,5	8	4,8	10	3,3	-



Distribución de la población estudiada según comorbilidades en los grupos 1 y 2

Medical History	Group 1		Group 2		Total		p- ^{x²} value
	n	%	n	%	n	%	
Asthma	13	9,9	21	12,5	34	11,4	0,486
Hypertension	2	1,5	8	4,8	10	3,3	0,123
COPD	0	0	8	4,8	8	2,7	-
Heart disease	4	3,1	5	3,0	9	3,0	0,969
Cancer	5	3,8	4	2,4	9	3,0	0,471
Kidney disease	0	0	4	2,4	4	1,3	-
Diabetes mellitus	2	1,5	3	1,8	5	1,7	-
Obesity	0	0	3	1,8	3	1,0	-
Smoking	2	1,5	2	1,2	4	1,3	-



Distribución de la población estudiada según síntomas en los grupos 1 y 2

	Group 1		Group 2		Total		p- ^{x²} value
Fever	131	100	167	99,4	298	99,7	0,376
Cough	130	99,2	166	98,8	296	99,0	0,713
Rhinorrhea	85	64,9	113	67,3	198	66,2	0,142
Shortness of breath	61	46,6	76	45,2	137	45,8	0,259
Headache	8	6,1	14	8,3	22	7,4	0,114
Diarrhea	14	10,7	14	8,3	28	9,4	0,108
Sore throat	4	3,1	9	5,4	13	4,3	-
Conjunctivitis	2	1,5	3	1,8	5	1,7	-

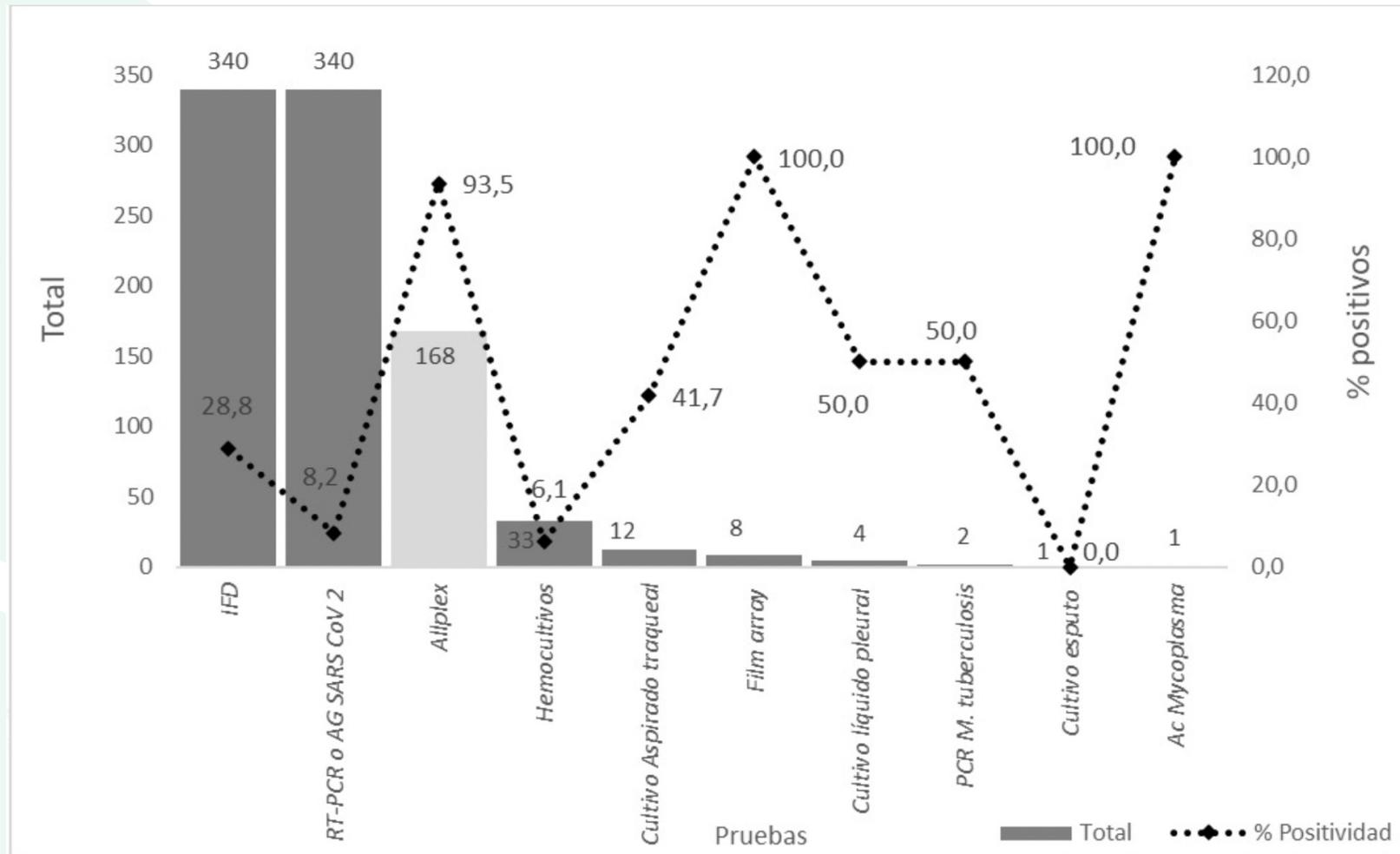


Distribución de la población estudiada según diagnóstico clínico y tratamiento antibiótico en los grupos 1 y 2

	Group 1		Group 2		Total		p- ^{x²} value
Pneumonia	33	25,2	59	35,1	92	30,8	0,065
Bronchiolitis	49	37,4	27	16,1	76	25,4	0,000
Asthmatic Crisis	25	19,1	43	25,6	68	22,7	0,183
Rhinopharyngitis	22	16,8	27	16,1	49	16,4	0,867
COPD exacerbation	0	0,0	5	3,0	5	1,7	-
Sinusitis	1	0,8	5	3,0	6	2,0	-
Tracheitis	1	0,8	2	1,2	3	1,0	-
Treatment							
Antibiotics use in hospital	47	35,9	73	43,5	120	40,1	0,265



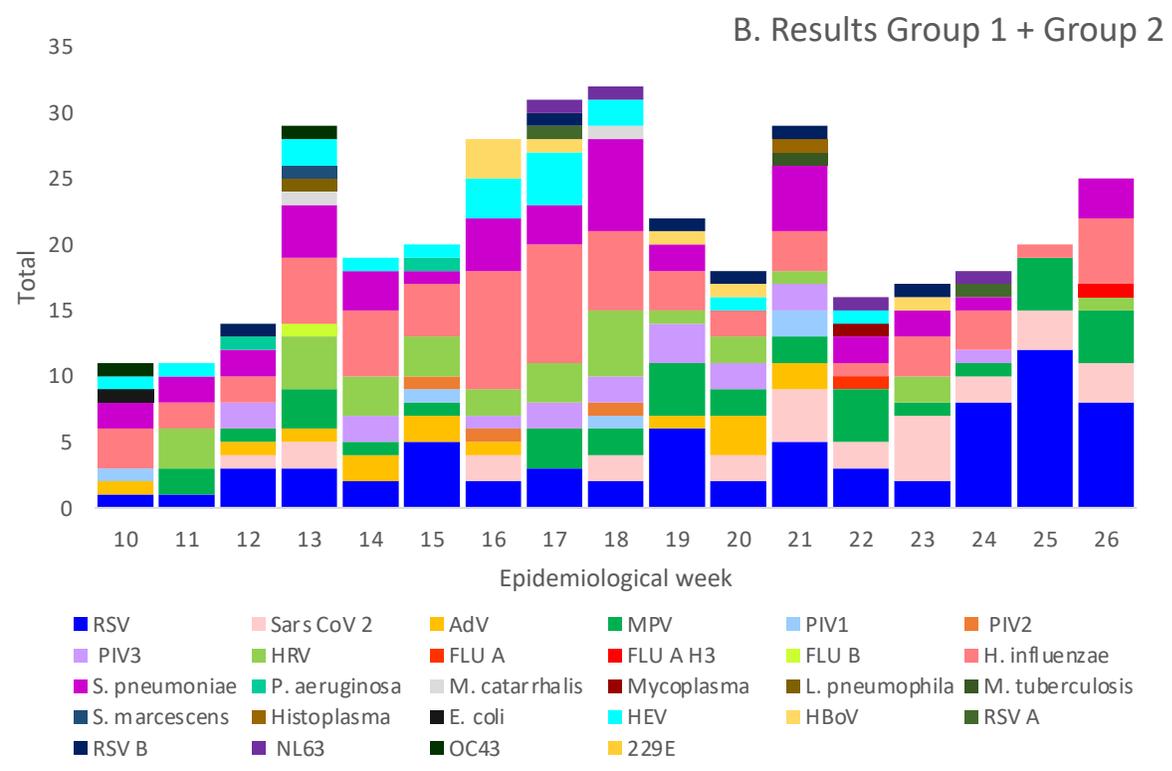
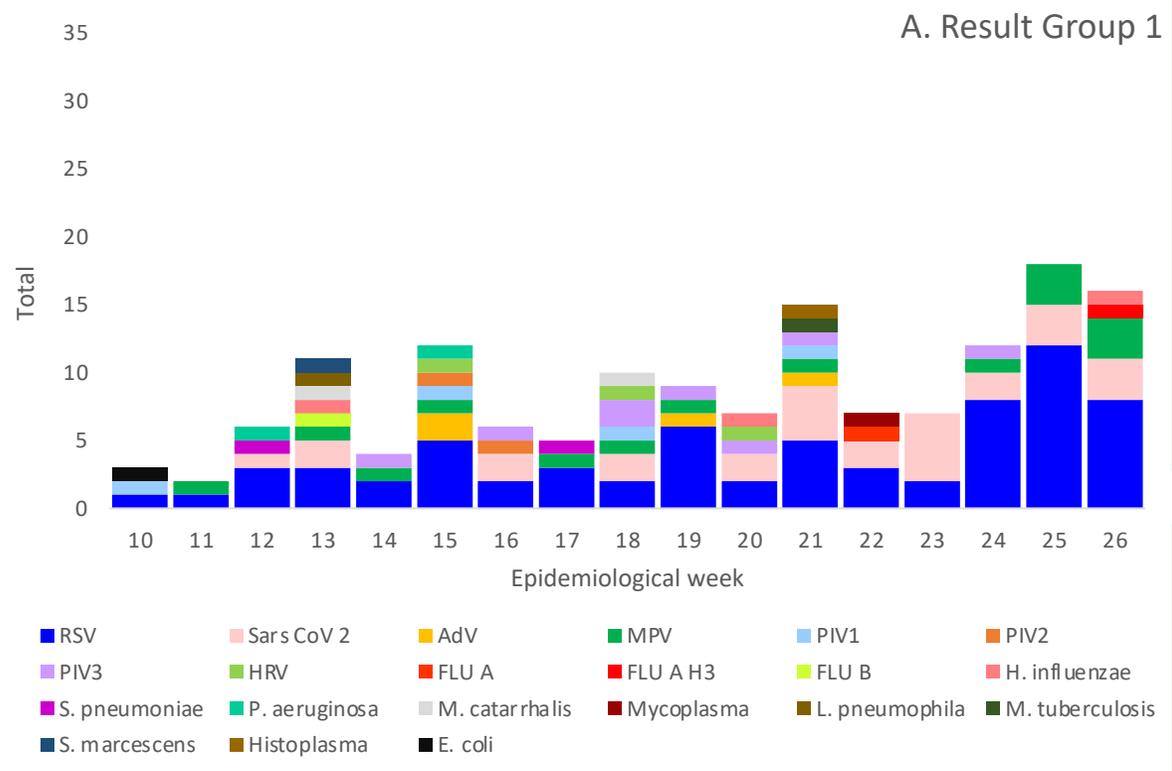
Porcentaje de positividad de cada prueba realizada a las muestras respiratorias



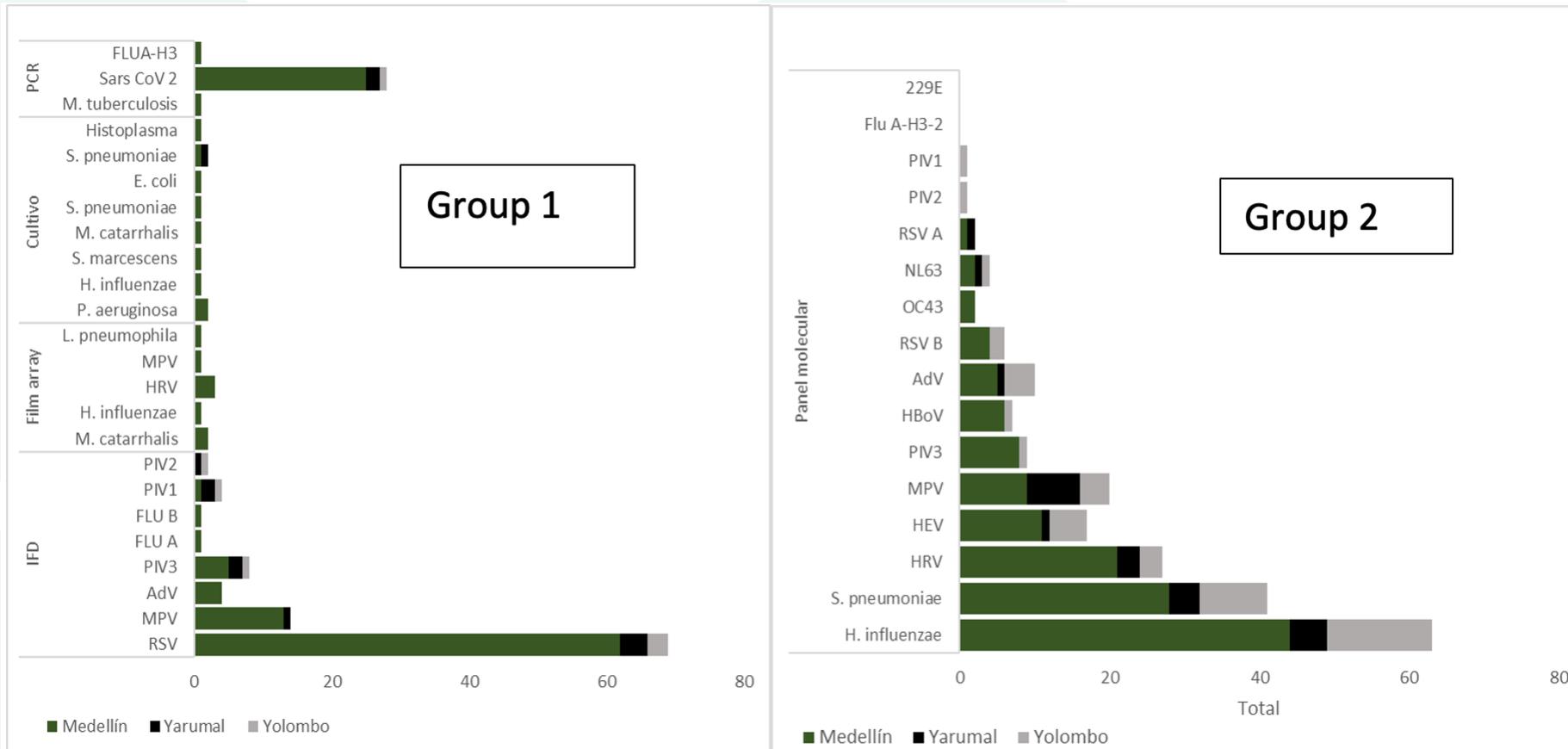
IFD: Inmunofluorescencia directa.



Comparación gráfica de los resultados encontrados utilizando el protocolo tradicional (A) vs el protocolo secuencial incluyendo panel molecular multiplex (B).



Comparación gráfica de los resultados encontrados en el grupo 1 y los resultados del grupo 2, estratificando por unidad centinela.



IFD: Inmunofluorescencia directa.



Secuenciación con panel de enriquecimiento dirigido a patógenos respiratorios de muestras negativas.

Muestra	Resultado de la secuenciación	Edad/sexo	Comorbilidades	Síntomas
Muestra 1	<i>Dolosigranulum pigrum</i> (B)	2 meses/ M	Bronquiolitis	Tos, fiebre, rinorrea
Muestra 2	<i>Influenza A virus (H1N1)</i> (V) <i>Enterovirus D68</i> (V)	10 meses / M	Asma	Fiebre, disnea, tos humeda, y esfuerzo respiratorio
Muestra 3	<i>Human rhinovirus C</i> (V) <i>Influenza A virus (H1N1)</i> (V)	14 años /F	Enfermedad cardiaca	Dolor toracico, fiebre, rinorrea
Muestra 4	<i>Rothia mucilaginosa</i> (B) <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (H)	37 años/ F	No	Fiebre, rinorrea
Muestra 5	<i>Influenza A virus (H1N1)</i> (V) <i>Rothia mucilaginosa</i> (B) <i>Staphylococcus aureus</i> (B)	86 años/M	EPOC, DM, IRC, HTA.	Tos, fiebre, rinorrea,
Muestra 6	<i>Curvularia geniculata</i> (H) <i>Cytomegalovirus (CMV)</i> (V) <i>Dolosigranulum pigrum</i> (B)	5 años/M	Asma	Tos, fiebre, rinorrea, diarrea, dificultad respiratoria

- Secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing).
- Tecnología Illumina: 1) extracción dual, 2) síntesis de ADNc y ADNdc1, 3) preparación de librerías, 4) enriquecimiento con sondas y 5) secuenciación en equipo MiSeq.
- El panel de patógenos respiratorios (RPIP) detecta simultáneamente ARN y ADN para más de 180 bacterias, más de 50 hongos y más de 40 virus.
- Se cumplieron adecuados criterios de calidad de la secuenciación en el 100% de las muestras.



Secuenciación con panel de enriquecimiento dirigido a patógenos respiratorios de muestras negativas.

Muestra	Resultado de la secuenciación	Edad/sexo	Comorbilidades	Síntomas
Muestra 7	<i>Corynebacterium propinquum</i> (B) <i>Eikenella corrodens</i> (B) <i>Moraxella catarrhalis</i> (B) <i>Streptococcus mitis</i> (B)	4 años/M	PCI, Epilepsia, CMV congénito, hidrocefalia	Tos, fiebre, rinorrea
Muestra 8	<i>Corynebacterium propinquum</i> (B) <i>Escherichia coli</i> (B) <i>Herpes simplex virus 1 (HSV-1)</i> (V) <i>Moraxella catarrhalis</i> (B)	85 años/F	HTA, DM, EPOC, ERC	Fiebre, tos, dificultad respiratoria
Muestra 9	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (B) <i>Haemophilus parainfluenzae</i> (B) <i>Influenza A virus (H1N1)</i> (V) <i>Parvimonas micra</i> (B) <i>Rasamsonia aegroticola</i> (H) <i>Rhizopus oryzae (Rhizopus arrhizus)</i> (H) <i>Staphylococcus aureus</i> (B)	7 años/F	Anemia de células falciformes	Dolor lumbar, dificultad respiratoria, fiebre, tos
Muestra 10	<i>Actinomyces graevenitzii</i> (B) <i>Corynebacterium propinquum</i> (B) <i>Cytomegalovirus (CMV)</i> (V) <i>Dolosigranulum pigrum</i> (B) <i>Influenza A virus (H1N1)</i> (V) <i>Moraxella catarrhalis</i> (B) <i>Prevotella melaninogenica</i> (B) <i>Rothia mucilaginosa</i> (B)	3 años/M	Cardiopatía congénita	Tos, dificultad respiratoria y fiebre

Las pruebas moleculares en la vigilancia de la infección respiratoria aguda en Antioquia, Colombia

Retos

- Nuevos análisis bajo un modelo que nos permita cuantificar el aporte de los paneles moleculares.
- Surje la necesidad de realizar un estudio de costos y del impacto de la vacunación en los resultados.
- Articular resultados de laboratorio en tiempo real con estrategia de atención de brotes en las comunidades.
- A partir de estas observaciones se detectó brote de Adenovirus en 2022 y se está realizando genotipificación y análisis filogenético.
- Es importante la integración del LDSA con actores como OneHealth
 - Trabajos conjuntos.
 - Aprovechamiento de diferentes tecnologías.
 - Crecimiento científico.



GOBERNACIÓN DE ANTIOQUIA



Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Grupo de Trabajo para la Salud Global, el Programa de Pequeñas Subvenciones de TEPHINET, Abbott (P.O # 4629), y la Coalición Abbott Pandemic.

Agradecemos a los miembros del laboratorio, personal médico y de enfermería del Hospital Fundación San Vicente en Medellín, Hospital San Juan de Dios en Yarumal y Hospital San Rafael en Yolombó, Antioquia (Colombia), al Laboratorio de Salud Pública de Antioquia y al Consorcio Colombia/Wisconsin One-Health de la Universidad Nacional de Colombia.

