

# Influenza A/H1N1/2009 virus - experience of the clinical microbiology laboratory of the "L. Sacco" University Hospital in Milan

**Lisa Lucia Chenal, Alessandra Lombardi, Nadia Zanchetta, Giuseppe Giuliani, Valeria Micheli, Sara Giordana Rimoldi, Loredana Tocalli, Cristina Pagani, Maria Rita Gismondo**  
*Clinical Microbiology Laboratory of the "Luigi Sacco" University Hospital in Milan*

**Key words:** Influenza A/H1N1 2009 virus, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

**Virus influenza A/H1N1/2009 - esperienza del laboratorio di microbiologia clinica - AO Polo Universitario "L. Sacco" Milano**

## SUMMARY

In the spring of 2009, a new variant of influenza A/H1N1 virus that had never been isolated before, was identified. From April 27 to December 31, 2009 the respiratory samples of 974 patients, obtained from suspected cases of pandemic influenza A virus infection, were analyzed at the Clinical Microbiology Laboratory of the "L. Sacco" University Hospital in Milan.

The diagnosis of influenza A/H1N1 infection was performed initially through the use of different molecular biological methods: Seplex® RV12 ACE Detection (Seegene), NUCLISENS® EASYQ® INFLUENZA A/B (bioMérieux), Influenza A/B Q-PCR Alert (Nanogen) running in parallel with rRT-PCR (CDC) to confirm the positivity to the new influenza virus, then was used a single specific test, Fast set H1N1v (Arrow Diagnostics). Retrospective study of data showed that 293 (30.1%) patients were positive for the new strain of influenza A/H1N1 virus and 8 (0.8%) for influenza A other than H1N1 virus. The distribution of influenza A/H1N1 cases showed two peaks, one on July (62.9%) and the other one on October (36%), moreover we observed that 155 patients (53%) out of 293 positive for influenza A/H1N1 virus aged under 20 years old.

The first positivity peak was found in travelers and the second one, occurred 2-3 months prior to the classic seasonal epidemic influenza, was attributed to autochthonous cases, by which the virus had spread worldwide. The highest proportion of cases were among subjects aged from 0 to 20 years and, over this age the positivity rate decreased proportionally with increasing age, in agreement with data reported in other countries.

## INTRODUZIONE

Nella primavera del 2009 in Messico e Stati Uniti è stata identificata una nuova variante del virus dell'influenza A/H1N1, a composizione genica mai rilevata prima (2, 3). L'evoluzione di nuovi ceppi riassortanti è complicata e difficile da tracciare; studi effettuati per ricostruire la composizione genica di questa nuova variante ipotizzano che potrebbe derivare da un triplo riassortimento di geni di derivazione suina, umana e aviaria oppure da un singolo riassortimento di due virus influenzali suini, uno del Nord America, a sua volta derivato dal triplo riassortimento sopraccitato e uno dell'Eurasia (4, 5, 9). Il 21 Aprile 2009 il *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) ha descritto i primi casi di due bambini della California (2). Da Messico e Stati Uniti il virus si è presto diffuso in tutto il mondo e l'Organizzazione mondiale della sanità ha innalzato il livello di allerta pandemica dalla fase 5 alla fase 6, definendo così la prima pandemia del XXI secolo (10). In Italia, il

2 maggio 2009 è stato confermato il primo caso riguardante un uomo di 50 anni rientrato a Massa dopo un viaggio in Messico (7).

Nel periodo compreso tra il 27 aprile e il 31 dicembre 2009 sono pervenuti al Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'A.O. Polo Universitario "L. Sacco" di Milano i campioni respiratori appartenenti a 974 pazienti con sintomi influenzali che sono stati indagati con diverse metodiche molecolari rivolte all'identificazione della nuova variante del virus dell'influenza.

## MATERIALI E METODI

I campioni raccolti mediante tampone a fibre di nylon floccato ed eluiti in terreno UTM (*Universal Transport Medium*, Copan, Brescia, Italia) risultavano così suddivisi: 58 tamponi nasali e 40 tamponi faringei. Gli aspirati nasofaringei (1756) sono stati inviati al laboratorio utilizzando lo stesso terreno di trasporto UTM-RT. La rilevazione del virus influenza A/H1N1, dopo

**Corresponding author: Lisa Lucia Chenal**

Laboratorio di Microbiologia Clinica AO-Polo Universitario "L. Sacco" di Milano  
 Via G.B. Grassi, 74 - 20157 Milano  
 E-mail: [lisa.chenal@studenti.unimi.it](mailto:lisa.chenal@studenti.unimi.it)

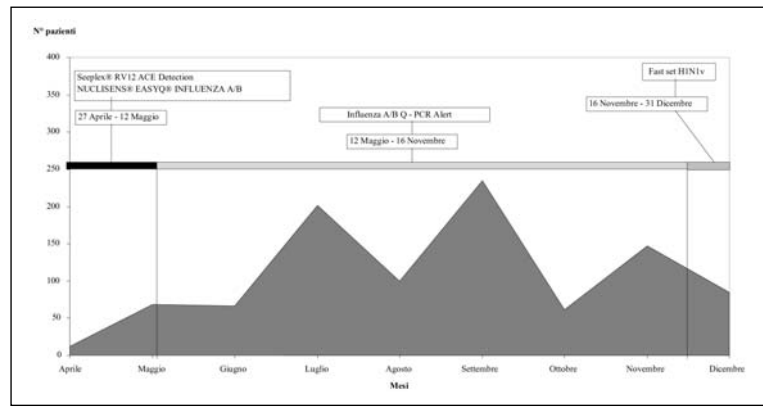
estrazione dell'RNA avvenuta con NucliSens® EasyMag® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), e retrotrascrizione a cDNA, è stata eseguita attraverso l'utilizzo di diverse metodiche di biologia molecolare (Figura I). La strategia per l'identificazione includeva due PCR: una volta ad identificare il gene che codifica per le proteine di matrice (gene M) per la rilevazione del virus influenza A (*primer* generici), e una rivolta alla rilevazione del gene dell'emoagglutinina (gene HA) per l'identificazione del virus influenza A/H1N1 (*primer* specifici CDC).

Nel periodo compreso tra il 27 Aprile e l'11 Maggio 2009 sono state impiegate parallelamente due metodiche differenti.

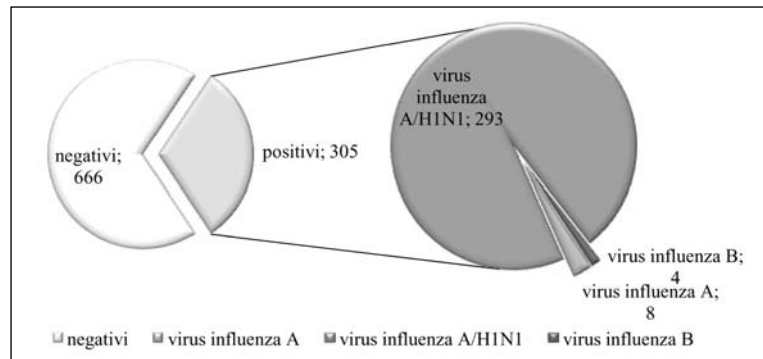
La prima metodica, Seeplex® RV12 ACE Detection (Seegene, Seoul, Corea), è una PCR *multiplex* che permette la ricerca di 12 virus respiratori contemporaneamente (virus influenza A e B, RSV A e B, metapneumovirus umano, virus parainfluenzale 1, 2 e 3, rhinovirus A/B, coronavirus 229E/NL63 e OC43/HKU1) utilizzando il sistema *dual priming oligonucleotide* (DPO), costituito da due *primer* con lunghezza differente in grado di migliorare la specificità dell'amplificazione. Il secondo saggio, NUCLISENS® EASYQ® INFLUENZA A/B (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), è invece una *real time NASBA*™.

Dal 12 Maggio al 15 Novembre 2009 le due metodiche sopracitate sono state sostituite dal *kit* A/B Q-PCR Alert (Nanogen, Milano, Italia), risultato più sensibile e rapido, che sfrutta la tecnologia TaqMan-MGB (*Minor Groove Binder*) per la ricerca differenziale del cDNA del virus dell'influenza A e B.

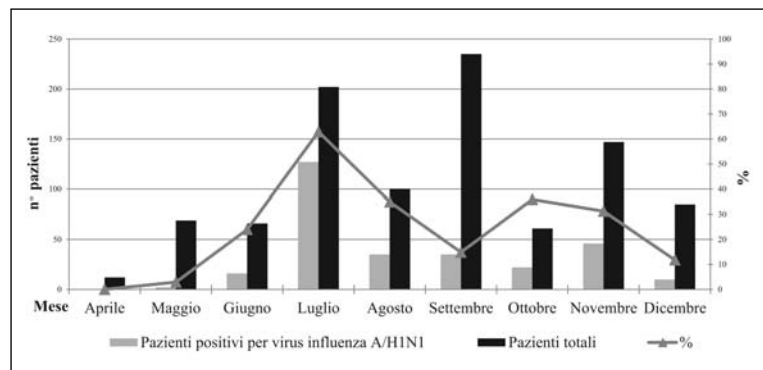
I campioni risultati positivi per virus influenza A sono stati successivamente inviati all'Istituto di Virologia dell'Università degli Studi di Milano e sottoposti a rRT-PCR (CDC) (8). Tale *real time* utilizza tre coppie di *primer* e sonde: una che identifica il virus influenza A (InfA),



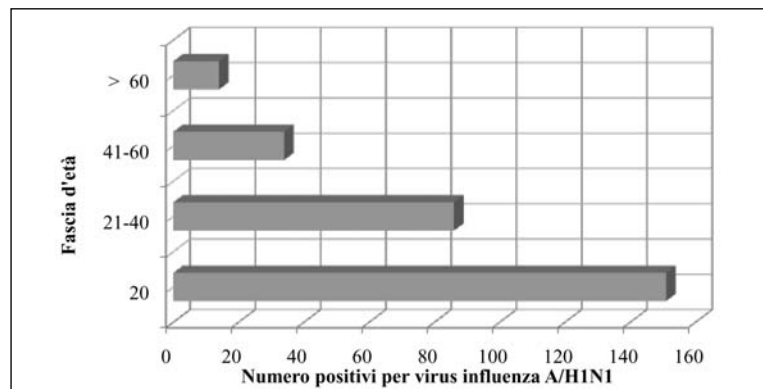
**Figura I.** Numero di pazienti totali saggati, da aprile a dicembre 2009, con le quattro diverse metodiche di biologia molecolare.



**Figura II.** Prevalenza di infezione da virus dell'influenza in 974 soggetti saggati.



**Figura III.** Distribuzione mensile del numero dei pazienti saggati e il numero di pazienti positivi per virus influenza A/H1N1 da aprile a dicembre 2009.



**Figura IV.** Distribuzione per fasce d'età dei pazienti positivi per virus influenza A/H1N1 (aprile-dicembre 2009).

la seconda per la rilevazione del virus influenza A suino (swInfA) e una specifica per il virus della nuova influenza (swH1).

Nell'ultimo periodo preso in considerazione, dal 16 Novembre al 31 Dicembre 2009, è stata introdotta in laboratorio la metodica Fast set H1N1v (ArrowDiagnostics, Genova, Italia) che consente di rilevare l'RNA della nuova variante del virus dell'influenza A/H1N1 mediante trascrizione inversa e amplificazione con rilevazione in tempo reale con sonde di ibridazione sequenza-specifiche.

## RISULTATI

Dall'analisi retrospettiva dei dati è emerso che 293 (30.1%) pazienti sono risultati positivi per la nuova variante di influenza A/H1N1, 8 (0.8%) per influenza A non H1N1 e 4 (0.4%) per influenza B (Figura II). La distribuzione mensile delle percentuali di positività per virus influenza A/H1N1 ha mostrato due picchi, uno nel mese di luglio (62.9%) e l'altro in ottobre (36%) (Figura III). Dei pazienti positivi per virus influenza A/H1N1, il 53% aveva un'età inferiore ai 20 anni e soltanto il 4.9% un'età superiore ai 60 anni (*range* d'età 0-82 anni) (Figura IV). È da rilevare che il picco di positività riscontrato nel mese di luglio è da attribuire a pazienti di ritorno da viaggi all'estero.

## CONCLUSIONI

Dall'analisi retrospettiva di otto mesi di indagini molecolari per la rilevazione del virus dell'influenza, sono emersi due picchi di positività, il primo riconducibile a casi di influenza A/H1N1 importati dai viaggiatori di ritorno da Messico, USA e Inghilterra e il secondo, verificatosi nel mese di ottobre, è riconducibile a casi autoctoni quando ormai il virus si era diffuso a livello mondiale. C'è da rilevare che tale picco si è riscontrato 2-3 mesi prima della classica epidemia influenzale stagionale.

La fascia di età maggiormente colpita risulta essere quella compresa tra 0 e 20 anni, con la percentuale di positività che diminuisce progressivamen-

te con l'avanzare dell'età. Questa distribuzione risulta essere in accordo con i dati riportati in Europa e negli altri continenti (4, 6). Una possibile spiegazione della minore suscettibilità della popolazione adulta al virus influenza A/H1N1 del 2009 è attribuibile a una pregressa esposizione al sottotipo H1N1 del virus influenza A circolato tra il 1918 e il 1957 che ha conferito una cross-protezione (1, 4).

## BIBLIOGRAFIA

1. Adalja AA, Henderson DA. Original antigenic sin and pandemic (H1N1) 2009 [letter]. *Emerg Infect Dis* [serial on the Internet]. 2010 June [date cited]. <http://www.cdc.gov/EID/content/16/6/1028.htm>
2. Centers for Disease Control, Prevention (CDC). Swine Influenza A (H1N1) infection in two children-southern California, March-April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58: 400-2.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: novel influenza A (H1N1) virus infection-Mexico, March-May, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58(21): 585-9.
4. Dawood FS, Jain S, Finelli L, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009; 360: 2605-15.
5. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009; 325: 197-201.
6. Health Protection Agency, Health Protection Scotland, National Public Health Service for Wales, HPA Northern Ireland Swine influenza investigation teams. Epidemiology of new influenza A (H1N1) virus infection, United Kingdom, April - June 2009. *Euro Surveill* 2009; 4(22): pii=19232.
7. <http://www.epicentro.iss.it/focus/h1n1/04-05-2009.asp>
8. <http://www.who.int/csr/resources/publications/swine-flu/realtimeptpcr/en/index.html>
9. Lu J, Liu D, Liu W, Shi T, Tong Y, Cao W. Genetic stability and linkage analysis of the 2009 influenza A(H1N1) virus based on sequence homology. *Arch Virol* 2009; 154: 1883-90.
10. WHO. Statement to the press by WHO (World Health Organization). Director-General, Dr. Margaret Chan. 2009. [http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1pandemicphase6\\_20090611/en/indexhtml](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1pandemicphase6_20090611/en/indexhtml)