

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE GRANADA
SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA
H.U. VIRGEN DE LAS NIEVES



TESIS DOCTORAL

**“UTILIDAD DE TRES MÉTODOS DIAGNÓSTICOS
EN EL CONTEXTO DEL SISTEMA DE VIGILANCIA
DE GRIPE DE ANDALUCÍA”**

Ruth Yeste Martín

Granada, 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ruth Yeste Martín
D.L.: Gr 218-2011
ISBN: 978-84-693-6006-4

El **Dr. José María Navarro Marí**, Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, la **Dra. Mercedes Pérez Ruíz**, Facultativa especialista de área del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y el **Dr. Alfonso Ruíz-Bravo López**, Catedrático del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada

Certifican:

Que la Tesis Doctoral que presenta la Licenciada **Ruth Yeste Martín**, “**UTILIDAD DE TRES MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN EL CONTEXTO DEL SISTEMA DE VIGILANCIA DE GRIPE DE ANDALUCÍA**” ha sido realizada bajo nuestra dirección, habiendo sido revisada y estando conformes con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada.

Granada, Julio 2010

Fdo: José María Navarro Marí

Fdo: Mercedes Pérez Ruíz

Fdo: Alfonso Ruíz-Bravo López

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. LA GRIPE. CONCEPTOS GENERALES	3
I.2. CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES DEL VIRUS DE LA GRIPE	4
I.2.1. ESTRUCTURA.....	5
I.2.1.1. VARIACIONES MENORES DEL VIRUS DE LA GRIPE (“DRIFT”): GRIPE ESTACIONAL	8
I.2.1.2. VARIACIONES MAYORES DEL VIRUS DE LA GRIPE (“SHIFT”): GRIPE PANDÉMICA	9
I.2.2. FACTORES DE VIRULENCIA EN EL VIRUS DE LA GRIPE.....	14
I.3. PATOGENIA DE LA INFECCIÓN GRIPAL EN HUMANOS	16
I.4. LA GRIPE EN OTRAS ESPECIES.....	19
I.5. CLÍNICA Y COMPLICACIONES DE LA GRIPE.....	20
I.6. PROFILAXIS Y TRATAMIENTO DE LA GRIPE.....	24
I.6.1. VACUNACIÓN ANTIGRIPAL	24
I.6.2. TRATAMIENTO ANTIGRIPAL	26
I.7. VIGILANCIA INTERNACIONAL DE LA GRIPE	27
I.7.1. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA.....	28
I.7.2. VIGILANCIA VIROLÓGICA	30
I.7.3. REDES CENTINELAS.....	31
I.8. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.....	33
I.8.1. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.....	33
I.8.2. DIAGNÓSTICO DIRECTO	34
I.8.2.1. MUESTRA ADECUADA	34
I.8.2.2. DIAGNÓSTICO POR CULTIVO	34
I.8.2.3. DETECCIÓN DE ANTÍGENO	35
I.8.2.4. DETECCIÓN GENÓMICA	36
I.9. PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS UTILIZADOS EN LA VIGILANCIA INTERNACIONAL DE LA GRIPE.....	38
II. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	41
III. MATERIAL Y MÉTODOS	45
III.1. PERIODO DE ESTUDIO	45
III.2. ÁMBITO Y PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO	45

III.3. SUJETOS DE ESTUDIO Y MUESTRAS.....	46
III.3.1. SUJETOS DE ESTUDIO	46
III.3.2. MUESTRAS	46
III.3.2.1. OBTENCIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS.....	46
III.3.2.2. RECEPCIÓN Y PROCESAMIENTO INICIAL DE LAS MUESTRAS	48
III.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO.....	49
III.4.1. AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE VIRUS DE LA GRIPE EN CULTIVO CELULAR...50	
III.4.1.1. PREPARACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR.....	50
III.4.1.2. CULTIVO CELULAR EN TUBOS DE FONDO PLANO MEDIANTE TÉCNICA	
“SHELL-VIAL” (SV).....	51
III.4.1.3. DETECCIÓN DE VIRUS GRIPALES EN CULTIVO	52
III.4.1.3.A. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA SOBRE CULTIVO SV	52
III.4.1.3.B. RT-PCR.....	53
III.4.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	53
III.4.2.1. EXTRACCIÓN DEL ARN.....	54
III.4.2.2. REVERSOTRANSCRIPCIÓN (RT).....	56
III.4.2.3. PCR-NESTED.....	56
III.4.2.4. DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN.....	58
III.4.2.5. PRECAUCIONES PARA TRABAJAR LA TÉCNICA PCR	59
III.4.2.6. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS AISLADOS.....	60
III.5. ANÁLISIS DE DATOS.....	60
III.6. ANEXO I	62
IV. RESULTADOS	67
IV.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES	67
IV.1.1. PROCEDENCIA	67
IV.1.2. DATOS DEMOGRÁFICOS	69
IV.1.2.1. EDAD DE LOS PACIENTES.....	69
IV.1.2.2. SEXO DE LOS PACIENTES.....	69
IV.1.3. DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS.....	70
IV.1.3.1. DATOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS POR GRUPOS DE EDAD	71
IV.1.3.2. DATOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS POR SEXO	72
IV.2. CARACTERÍSTICAS VIROLÓGICAS DE LOS AISLADOS.....	73
IV.2.1. DATOS GENERALES.....	73
IV.2.2. DISTRIBUCIÓN POR TIPOS Y SUBTIPOS DE LOS VIRUS DE LA GRIPE	73

IV.2.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS AISLADOS	75
IV.3. EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS	76
IV.3.1. RESULTADOS GLOBALES	76
IV.3.2. EVALUACIÓN DE TÉCNICAS PARA CADA TIPO Y SUBTIPO DE GRIPE	77
IV.3.2.1. MÉTODO MD	77
IV.3.2.2. MÉTODO SV-IF	78
IV.3.2.3. MÉTODO SV-PCR	79
IV.3.3. CONCORDANCIA ENTRE LOS TRES MÉTODOS PARA DETECCIÓN DE GRIPE	80
IV.3.3.1 CONCORDANCIA ENTRE LOS MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE GRIPE AH3	81
IV.3.3.2. CONCORDANCIA ENTRE LOS MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE GRIPE AH182	81
IV.3.3.3. CONCORDANCIA ENTRE LOS MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE GRIPE B	83
IV.4. RELACIÓN ENTRE LOS DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS DEL SÍNDROME GRIPAL Y LOS RESULTADOS VIROLÓGICOS	84
IV.4.1. RELACIÓN ENTRE GRIPE Y EDAD, SEXO Y ESTADO VACUNAL	84
IV.4.2. RELACIÓN ENTRE GRIPE Y DATOS CLÍNICOS	85
IV.4.3 RELACIÓN ENTRE TIPO Y SUBTIPO DE GRIPE Y EDAD, SEXO Y ESTADO VACUNAL	86
IV.4.4. RELACIÓN ENTRE TIPO Y SUBTIPO DE GRIPE Y DATOS CLÍNICOS	88
V. DISCUSIÓN	93
V.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES	94
V.2. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y VIROLÓGICAS DE LOS AISLADOS	95
V.3. UTILIDAD DE TRES MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN EL SISTEMA DE VIGILANCIA DE GRIPE EN ANDALUCÍA	97
V.4. RELACIÓN ENTRE LOS DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS Y LOS RESULTADOS DE LABORATORIO	103
VI. CONCLUSIONES	109
VII. BIBLIOGRAFÍA	113

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
CGT	Clínica gripe típica
CNM	Centro Nacional de Microbiología
CT	Cultivo tradicional
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
E	Especificidad
ECP	Efecto citopático
EIA	Enzimoimmunoanálisis
EISS	European Influenza Surveillance Scheme
Flu A	Gripe A
Flu B	Gripe B
Flu C	Gripe C
HA	Hemaglutinina
IC	Inmunocromatografía
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IHA	Inhibición de la hemaglutinación
IO	Inmunoópticos
IRA	Insuficiencia respiratoria aguda
MD	Muestra directa
MEM	Medio esencial mínimo
MT	Medio de transporte
NA	Neuraminidasa
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (“Polimerase Chain Reaction”)
RFC	Reacción de fijación del complemento
RT-PCR	Reversotranscripción + PCR

S	Sensibilidad
SFB	Suero fetal bovino
SGI	Síntomas gastrointestinales
SV	Shell- vial
SV-IF	Inmunofluorescencia de Shell-vial
SV-PCR	RT-PCR de Shell-vial
TN	Test de neutralización
TBE	Tris-bórico-EDTA
TPCK	L-1Tosylamida-2phenylethyl chloromethyl cetona
VPP	Valor predictivo positivo
VPN	Valor predictivo negativo

INTRODUCCIÓN

I.1. LA GRIPE. CONCEPTOS GENERALES

La gripe es una enfermedad infecciosa causada por los virus de la familia *Orthomyxoviridae* que incluye los géneros Influenza A, B y C. Desde el punto de vista epidemiológico, los virus del tipo A son los principales causantes de las epidemias anuales de gripe, mientras que los del tipo B suelen dar lugar a brotes epidémicos más localizados. El virus de la gripe C, aunque está poco estudiado, parece tener un comportamiento endémico, produciendo casos esporádicos de enfermedad leve.

El virus de la gripe A infecta, además de al hombre, a múltiples mamíferos terrestres (cerdos, caballos) y marinos (focas y ballenas), aves domésticas (pollos, patos y pavos) y salvajes (patos, ánsares y gaviotas), siendo en estos últimos donde se encuentra su principal reservorio (**Rodríguez, 1998; Pérez y Casas, 2004**). El virus de la gripe B infecta sólo a humanos, aunque recientemente se ha aislado de otros mamíferos (focas) (**Osterhaus y cols, 2000**); el virus de la gripe C afecta a humanos y cerdos.

El término “Influenza” proviene del latín “Influentia”, y se utilizó en el siglo XV para designar epidemias atribuidas a la influencia de estrellas, planetas o poderes ocultos; los autores ingleses acuñaron el término “Influenza” en el siglo XVII. En Francia, por la misma época, prefirieron el nombre de “grippe”, del que deriva el nombre en español, en clara referencia al componente catarral de la enfermedad.

La era moderna del conocimiento del virus de la gripe fue “iniciada” por Smith y cols. que aislaron el virus de la gripe A en hurones. El virus de la gripe B fue aislado por Francis Jr. en 1939 y el virus de la gripe C por Taylor RM. en 1950 (**Ritchey y cols, 1976**).

Desde el punto de vista **clínico**, la gripe es una enfermedad generalmente autolimitada, que afecta a la población general y cuya morbi-mortalidad es especialmente importante en ciertos grupos de población denominados de “riesgo” (mayores de 65 años y personas con patologías de base), aunque su distribución es universal y puede afectar a personas de todas las edades.

Anualmente, en la época invernal (generalmente de Diciembre a Abril en nuestro medio) aparecen **epidemias** de gravedad variable, durante las cuales la tasa de ataque pueden ser del 10-20% en la población general, y aún mayor en determinados grupos de edad, especialmente en niños (**Neuzil y cols, 2000**); esto se traduce en un incremento en el número de personas atendidas en centros sanitarios por infecciones respiratorias agudas. Durante estas epidemias se observa un incremento de la mortalidad global que puede ser atribuible a complicaciones debidas a la gripe, aunque el número de muertes que provoca la enfermedad es difícil de estimar porque muchas de ellas se asocian a sus complicaciones y no quedan debidamente certificadas (**Thompson y cols, 2003**). Además, la infección por el virus de la gripe puede producir síndromes clínicos indistinguibles de los producidos por otros virus respiratorios, así como, otros virus respiratorios pueden dar manifestaciones clínicas parecidas a las producidas por el virus de la gripe (**Navarro y cols, 2005; Ohmit y Monto, 2006**).

Su naturaleza epidémica y la morbilidad y mortalidad que pueden derivarse de sus complicaciones, unidos al impacto económico que se produce en la comunidad durante las epidemias de gripe, justifican los continuos esfuerzos para prevenir y controlar esta enfermedad (**Treanor, 2005**).

I.2. CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES DEL VIRUS DE LA GRIPE

Los virus de la gripe pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Dentro de los virus de la gripe se distinguen tres géneros: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* e *Influenzavirus C*, basados en las diferencias antigénicas en dos de las proteínas estructurales principales de estos virus, la nucleoproteína (NP) y la proteína de matriz (M). El virus de la gripe A se clasifica en subtipos según las diferencias en sus glicoproteínas de membrana, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) .

I.2.1. ESTRUCTURA

Los virus de la gripe tienen un diámetro de 80 a 120 nm, son envueltos y con proyecciones superficiales. Las cepas recién aisladas son pleomórficas, pero adoptan formas esféricas tras varios pases en el laboratorio (**Treanor, 2005**).

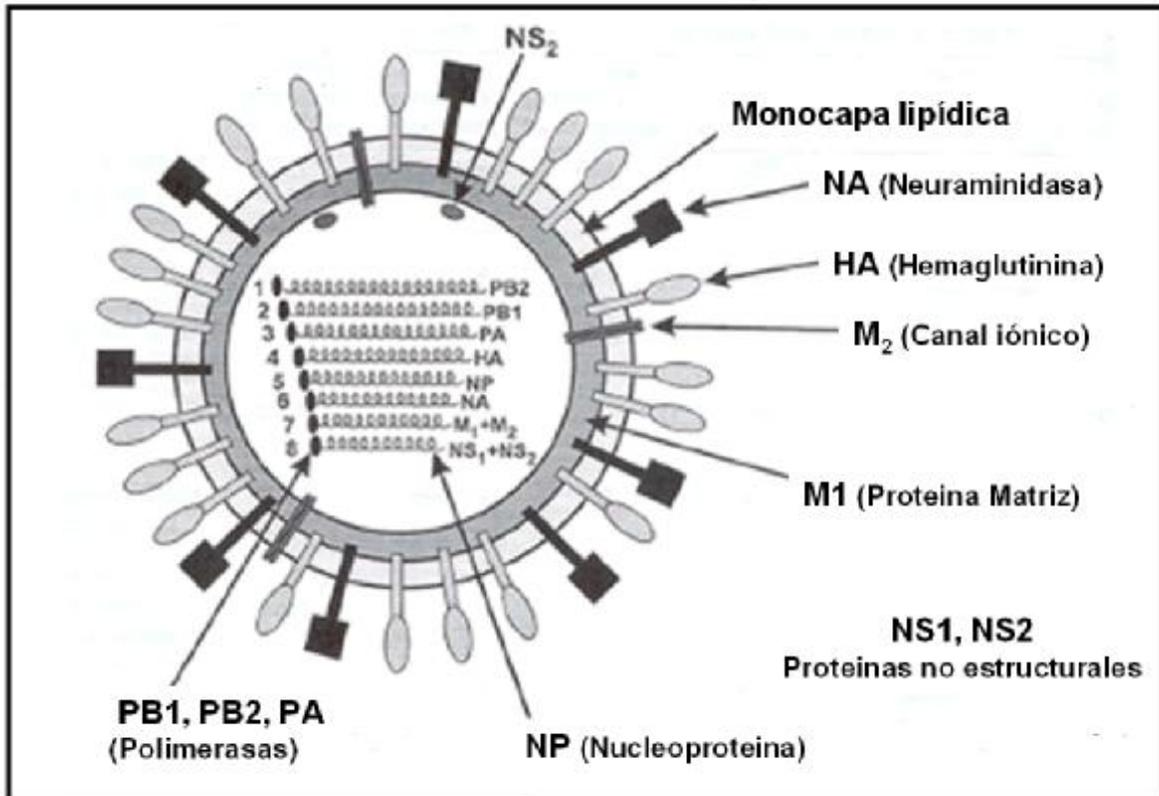
La envoltura que los rodea es una bicapa lipídica cuyo origen es la membrana celular de la célula huésped; en su superficie interna está la proteína de matriz M1, que tiene función estructural ya que está producida para dar estabilidad al virión. Es la proteína más abundante del virus.

Más internamente en la estructura, atravesando la envoltura y a modo de proyecciones se disponen dos glicoproteínas: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) en los virus A y B. El virus de la gripe C sólo tiene una proteína con actividad hemaglutinina y esterasa (HE) (**Wright P y Webster, 2001**). Otra proteína que se encuentra atravesando la envoltura es la proteína de matriz M2, que forma un canal iónico y sólo se encuentra en el virus A; el virus B tiene otra proteína (NB) que parece tener una función similar.

La nucleocápside está formada por un solo tipo de proteína, la nucleoproteína (NP) y por 8 segmentos de ARN de cadena única y sentido negativo en los virus de la gripe A y B. La nucleocápside del virus de la gripe C contiene 7 segmentos de ARN (**Treanor, 2005**). Además existen 3 proteínas con actividad polimerasa: PB1, PB2 y PA que se encuentran asociadas al ARN y a la NP formando un complejo de replicación. Las proteínas PB1 y PB2 están implicadas en la transcripción del ARNm y la PA en la replicación del ARN viral.

También se han descrito 2 proteínas no estructurales que son encontradas en las células infectadas y cuya función no se conoce aún suficientemente, son NS1 y NS2. Todas estas proteínas son codificadas por los ocho segmentos de ARN. Igualmente se ha descrito una nueva proteína (**Chen y cols, 2001**), denominada PB1-F2, que parece estar codificada por el gen PB1 y tiene algunas características particulares que la diferencian del resto de las proteínas, que son: su ausencia en algunas cepas gripales de origen animal (particularmente en cerdos), expresión variable en células infectadas individuales y localización mitocondrial. Esta proteína parece desempeñar un papel importante en la

severidad de la enfermedad por parte de algunas cepas gripales, como la implicada en la pandemia de 1918-1919 (**Krug, 2006**).



Las dos proteínas más importantes del virus desde el punto de vista de la infectividad, antigenicidad e inmunidad, son la hemaglutinina y la neuraminidasa:

HEMAGLUTININA (HA):

El segmento 4 de ARN codifica la proteína HA, llamada así por su capacidad para aglutinar hematíes. Es la responsable de la unión con el receptor de la célula huésped e interviene en la fusión y penetración del virus dentro de la célula. Es uno de los principales antígenos del virus y se encuentra en la superficie de las células infectadas, siendo desencadenante fundamental de la producción de anticuerpos neutralizantes. Es la proteína más frecuentemente involucrada en la variación antigénica (**Reina, 2002**). Es sintetizada como un único polipéptido, pero la HA funcional existe como un homotrímero. Cuando se une a los receptores celulares, debe ser hidrolizada en HA1 y HA2 para permitir la fusión y posterior entrada del virus. Esta hidrólisis es llevada a cabo por proteasas celulares. La HA se une a receptores de ácido siálico específicos de especie: en el hombre, ácido N-acetilneuramínico unido a galactosa mediante enlaces tipo

α 2,6, mientras que en aves y equinos son fundamentalmente de tipo α 2,3 (**Lamb y krug, 1996; Malakhov y cols, 2006**). La proteína tiene un extremo hidrófobo y un extremo hidrófilo y posee varios determinantes antigénicos, algunos son comunes para los subtipos y otros son específicos de especie. Los anticuerpos dirigidos frente a HA son neutralizantes y por lo tanto tienen un papel crucial en la protección frente a la infección. Variaciones en la molécula de HA permiten al virus evadir la inmunidad preexistente.

Actualmente en el virus de la gripe A hay descritas 16 clases de HA que se denominan de H1 a H16. En humanos se han descrito sólo unas pocas HAs, fundamentalmente H1, H2 y H3 y ocasionalmente H5, H7 y H9. La HA 16 es la de más reciente identificación y se ha constatado en gaviotas de cabeza negra en Suecia (**Fouchier y cols, 2005**).

NEURAMINIDASA (NA):

La glicoproteína NA es codificada por el segmento 6 del genoma y se encuentra atravesando la envoltura viral al igual que la HA en forma de homotetrámero. Es también un antígeno importante del virus de la gripe y contiene determinantes antigénicos comunes para cada subtipo y específicos de cepa. La NA es una enzima que hidroliza las uniones α -cetósido entre un ácido siálico terminal y una D-galactosa o D-galactosamina adyacentes. Las principales funciones de la proteína NA son la eliminación de los residuos de ácido siálico de la HA y superficie celular favoreciendo la liberación de las partículas virales y su propagación y expansión a otras células. También participa en el transporte del virus a través de la mucina presente en el tracto respiratorio permitiendo la llegada del virus a la superficie de las células epiteliales del tracto respiratorio superior (**Hausmann y cols, 1995; Kobasa y cols, 1997**).

Actualmente en el virus de la gripe A se conocen 9 clases de NA diferentes, que se denominan de N1 a N9, de las cuales N1, N2 y ocasionalmente N7, se han descrito en humanos. Al igual que la HA y otras proteínas virales, la NA parece desempeñar un papel importante en la “discriminación” del hospedador (**Wright y Webster, 2001**).

En aves salvajes, sobre todo patos, es donde se han encontrado prácticamente todas las combinaciones posibles de las 16 HA y las 9 NA (**Rodríguez, 1998; Pérez y Casas, 2004**).

Estas glicoproteínas de superficie son fundamentales en la producción de las epidemias anuales y las pandemias.

I.2.1.1. VARIACIONES MENORES DEL VIRUS DE LA GRIPE (“DRIFT”): GRIPE ESTACIONAL

Las **epidemias anuales** de gripe se producen como consecuencia de pequeñas variaciones en estas glicoproteínas de superficie (HA y NA): “**drift**” o “**deriva antigénica**”. Estos pequeños cambios son los responsables de la necesidad de revisar y cambiar, en caso necesario, la composición antigénica de las vacunas antigripales de cada nueva temporada invernal. La deriva antigénica ocurre por acumulación de una serie de mutaciones puntuales resultante de la sustitución de un aminoácido en los lugares antigénicos A a E de la región distal de la molécula de la hemaglutinina. Esta sustitución impide la función de los anticuerpos inducidos por infecciones previas. Entonces, debido a que los anticuerpos generados por la exposición a cepas previas no neutralizan las variantes antigénicas de forma efectiva, se produce una selección inmunológica y la suplantación de la cepa variante por la cepa previa y el virus puede infectar al huésped. Se trata de cambios relativamente pequeños que se producen con frecuencia (cada año o cada pocos años) en un subtipo del virus de la gripe. En el caso del virus de la gripe A de humanos y otros mamíferos, el sistema inmunológico juega un papel importante en la selección de mutantes, mientras que en el virus de la gripe A en especies de aves y virus de la gripe B y C, la selección de mutantes no tiene un papel tan importante en la emergencia de derivas antigénicas (**Wright P y Webster, 2001**).

El virus de la gripe es, de entre los principales virus respiratorios el que tiene más capacidad para sufrir cambios antigénicos. Esta variación antigénica es frecuente en el virus de la gripe A, pero ocurre con menos frecuencia en el virus de la gripe B y no se ha asociado al virus C (**Treanor, 2005**).

En los climas templados en cualquier hemisferio, las epidemias de gripe ocurren casi exclusivamente en los meses de invierno (generalmente de Octubre a Abril en el hemisferio norte y de Mayo a Septiembre en el hemisferio sur), mientras que en los Trópicos puede suceder a lo largo de todo el año. Las epidemias en el hemisferio sur pueden predecir el tipo de virus que acontecerá en el hemisferio norte el siguiente invierno (**Treanor, 2005**).

Las razones para el seguimiento de este patrón estacional de las epidemias de gripe no están claras. Parece estar relacionado con la reintroducción de los virus en cada estación, condiciones ambientales para la supervivencia del virus y cambios de conducta que favorezcan o incrementen la transmisión del virus (hacinamiento, escuelas)... (**Hayden y Palese, 1997**).

I.2.1.2. VARIACIONES MAYORES DEL VIRUS DE LA GRIPE (“SHIFT”): GRIPE PANDÉMICA

Las **pandemias** de gripe se deben a la aparición de una cepa antigénicamente nueva (“**shift**”), es decir con una HA y/o NA perteneciente a un subtipo previamente no detectado en humanos, para los cuales la especie humana no tiene inmunidad.

A lo largo de los siglos siglo XX-XXI se han producido pandemias gripales, todas ellas causadas por el virus de la gripe A, correspondiéndose con la aparición de los subtipos H1N1 (1918, gripe española), H2N2 (1957, gripe asiática) y H3N2 (1968, gripe de Hong Kong). La primera pandemia del siglo XXI ha tenido lugar en 2009 por una variante del subtipo H1N1 [A(H1N1)v] (**CDC, 2009**).

Las pandemias se consideran actualmente debidas a la emergencia de nuevos virus gripales. El principal mecanismo biológico responsable de este fenómeno ha sido el intercambio de genes entre cepas humanas y animales o entre cepas animales (especialmente porcinas y aviares) y su transmisión a la especie humana (cruce de la barrera interespecie) (**Shortridge, 1995, Kuiken y cols, 2006**).

La mayor pandemia que se recuerda históricamente fue la ocurrida en 1918-1919 ya que murieron más de 20 millones de personas (tasa de mortalidad

>2,5%). Las secuencias del gen de la HA del virus de la gripe del 1918 parecen claramente relacionadas con las cepas del virus gripal del cerdo. Todos los análisis filogenéticos sugieren un antepasado común aviar para ambos linajes humano y porcino (**Taubenberger y cols, 1997; Wright y Webster, 2001; Belshe, 2005; Taubenberger y cols, 2005**).

Aunque el virus de la gripe podría permanecer latente en el huésped humano y causar una pandemia años más tarde, la noción de que el virus pandémico surja de un reservorio animal es más admisible (**Shortridge, 1995; Yuen y cols, 1998; Pérez y Casas, 2004**). Desde 1998, se ha podido constatar la posibilidad de que el ser humano se infecte de forma directa a partir de las aves sin precisar de un período de adaptación en el cerdo; ejemplo de ello fue el brote por virus aviar H5N1 en población humana de Hong Kong en 1997 y sureste asiático desde 2003 y los casos debido a virus aviar H9N2 en China (1999) o H7N1 en Europa o Canadá (2003-2004).

En estos cambios antigénicos mayores, responsables del origen de las pandemias de gripe, se observan características comunes: su aparición brusca y que son antigénicamente distintos de los virus gripales que circularon en humanos hasta el momento.

Existen varias **hipótesis** para explicar estas variaciones mayores y el posible salto de la barrera interespecie por el virus de la gripe:

1- REORDENAMIENTO o REAGRUPAMIENTO GENÉTICO

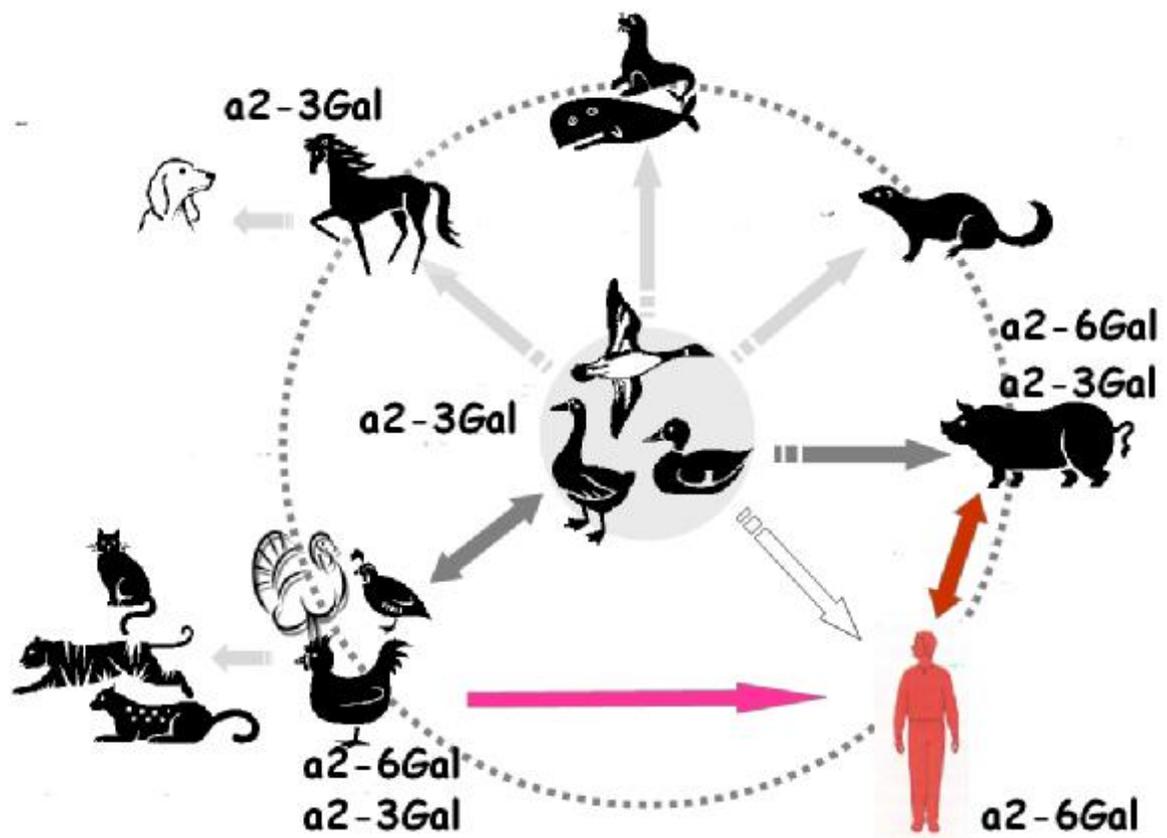
Este hecho viene favorecido porque el virus tiene un genoma segmentado y porque los virus gripales A mantienen un amplio reservorio de diversidad genética en animales (**Treanor, 2005**).

Existen estudios que avalan que en 1957 y 1968 las cepas surgieron por “reagrupamiento” genético; así, el análisis extenso de secuencias significativas de estas cepas demuestran la similitud en los segmentos de los genes de la HA, NA y PB1 del virus pandémico H2N2 y los virus aviáres, y entre los segmentos de los genes H3 y PB1 del virus pandémico H3N2 y los virus aviáres, que sugieren que en algunas circunstancias, un nuevo virus pandémico surge por intercambio de genes (“reordenamiento”) entre, virus aviáres, los cuales proporcionan una nueva

glicoproteica de superficie, y los virus humanos, que proporcionarían los genes que permitirán una replicación eficiente.

El reordenamiento es facilitado por la presencia de una tercera especie que es susceptible de infección con ambos, virus aviares y virus humanos, y el cerdo reúne todos estos requisitos ya que el epitelio del cerdo presenta receptores tanto para los virus aviares como para los humanos. Esto explicaría el hecho de que las pandemias a menudo surgen en áreas geográficas donde los humanos, cerdos y aves acuáticas viven en estrecha proximidad (**Suarez y cols, 1998; Yuen, 1998; Hayden y Palese, 1997; Treanor, 2005**).

En el caso del virus responsable de la actual pandemia, A(H1N1)v, el análisis filogenético de los diferentes fragmentos genómicos del virus muestra un cuádruple origen. En una fase final parece haberse producido una modificación del virus porcino AH1N1 “*tri-reasortante*” (linaje clásico porcino norteamericano, linaje aviar norteamericano y linaje humano H3N2) que había emergido en Norteamérica en los años noventa, y que ha sustituido los segmentos correspondientes a los genes de la proteína matriz (M) y de la neuraminidasa (NA) por los del virus porcino AH1N1 de linaje euroasiático (**Dawood y cols, 2009; Garten y cols, 2009**).



2- TRANSMISIÓN DIRECTA

Otro mecanismo por el cual podría surgir un nuevo virus pandémico en la población humana, sería la transmisión directa a humanos sin intermediario. La mayor parte de estas transmisiones interespecie “no prosperan” porque los virus tienen poca capacidad para ser transmitidos secundariamente a contactos humanos y así iniciar una pandemia.

La infección humana directa por una cepa de origen animal sin reagrupamiento génico se ha considerado clásicamente un hecho poco probable. No obstante, en Agosto de 1997, la OMS confirmó la identificación de un virus A (H5N1) aislado en Hong Kong de muestras respiratorias de un niño fallecido con un cuadro gripal y síndrome de Reye. Posteriormente se produjeron más casos hasta llegar a un total de 18 casos confirmados de infección humana por virus H5N1 (6 de los cuales fallecieron) a finales de enero de 1998 (**Subbarao y cols, 1998**). Desde el punto de vista virológico, la hemaglutinina H5 que presenta el

virus es de origen aviar, no aislada previamente en humanos. El análisis filogenético demuestra, que los 8 segmentos genómicos de este virus son de origen aviar, sin ninguna evidencia de reagrupamiento con virus humanos o de otros mamíferos. La caracterización genética de los virus aislados de humanos, pollos y otras especies aviares en los alrededores de Hong Kong demuestra un origen común de los virus H5N1.

Posteriormente, en 1999 fueron descritos 2 casos de infección humana por virus gripal H9N2 de origen aviar en Hong Kong (**Peiris y cols, 1999**) y 5 casos en China causados por el mismo subtipo. En Holanda en febrero de 2003 fue descrito un brote de virus gripal A H7N7 con virulencia en granjas avícolas, donde se confirmó la transmisión a 82 personas que habían tenido contacto con las aves infectadas. La mayoría de ellas presentaron cuadros de conjuntivitis, y unas pocas presentaron síntomas de gripe. Durante este brote se produjo la muerte de un veterinario que inspeccionó una de las granjas afectadas y cuya autopsia reveló el virus de la gripe A H7N7. Se encontraron evidencias de transmisión entre trabajadores de las granjas y sus familiares en tres casos, lo cual demostraría la posibilidad de transmisión entre personas de este virus de origen aviar.

Desde 2003, se vienen detectando casos de infección humana por virus H5N1 altamente patógeno de origen aviar, con una alta tasa de mortalidad. Los primeros casos se detectaron en Corea, para posteriormente diseminarse por el sureste asiático y después por Europa oriental y África. Desde el año 2003, hasta septiembre de 2006, ha habido un total de 241 casos con 141 muertes, lo que supone una letalidad superior al 50%.

Los estudios al respecto demuestran la escasa o nula transmisibilidad entre los contactos de los individuos infectados por los subtipos H5N1 y H9N2 (**Katz y cols, 1999; Uyeki y cols, 2002**). Pero no puede ignorarse que tras la trasgresión de la barrera de especie, los virus precisan de un tiempo de adaptación al nuevo huésped.

I.2.2. FACTORES DE VIRULENCIA EN EL VIRUS DE LA GRIPE

En la patogenicidad se pueden implicar una multitud de determinantes interrelacionados, incluyendo las propiedades de los componentes del virus, la interacción de los componentes de uno y otro con los elementos de la célula huésped, y los factores medioambientales e inmunológicos.

Las cepas gripales aviares se clasifican en **avirulentas** o poco virulentas que son causantes de infecciones exclusivamente respiratorias, y **virulentas** o causantes de infecciones diseminadas con una elevada mortalidad (**Swayne y Suárez, 2000**).

Una de las diferencias entre ellas es el espectro de enzimas capaces de hidrolizar la proteína **HA**. Así, las cepas poco virulentas sólo podrían ser hidrolizadas por proteasas presentes normalmente en la secreción del tracto respiratorio. Por el contrario, las cepas virulentas podrían ser activadas por una gran variedad de enzimas proteolíticas presentes en diversos órganos y tejidos, permitiendo la diseminación de la infección (**Horimoto y Kawaoka, 2001**). En este sentido se ha postulado que los casos graves de gripe en personas infectadas con gripe aviar, poseen una alta capacidad de hidrólisis de la HA (**Yuen y cols, 1998**).

Se ha demostrado que cambios aminoacídicos en la posición 225 (aspártico por glicina: D225G) de la HA de la gripe A de 1918 cambiaban la especificidad por el receptor celular α 2,3 en lugar de α 2,6. Se ha postulado que esta mutación en el virus A(H1N1)v podría incrementar su poder patógeno, ya que los receptores α 2,3 son mayoritarios en el tracto respiratorio inferior del hombre (**Tumpey y cols, 2007**). Aunque han sido detectadas cepas por varios países con esta mutación, realmente no está clara su importancia en la patogenicidad del virus ya que no sólo se ha identificado en casos tanto leves como graves de infección.

Hay evidencias para pensar que la **NA** juega también un papel importante en la patogenicidad. Varios estudios han descrito un mecanismo de virulencia asociado a la NA de algunas cepas aviares. Esta glicoproteína se uniría y secuestraría al plasminógeno, incrementando la concentración local de proteasas.

Por lo tanto, la capacidad de la NA para unirse al plasminógeno representa un factor de virulencia para las cepas gripales de origen aviar (**Goto y Kawaoka, 1998**).

Otros genes y en especial el que codifica la proteína **PB2** también pueden participar de una forma indirecta en la patogenicidad. El aminoácido de la posición 627 en la PB2 ha sido implicado en la mayor virulencia humana por el virus H5N1. Los H5N1 que son virulentos en ratones poseen la lisina en esta posición, mientras que los avirulentos en ratones y otros virus de la gripe A aviares, poseen ácido glutámico. Esta diferencia representa una adaptación del virus H5N1 para la replicación en células de mamíferos (**Krug, 2006**).

También se ha descrito una secuencia de aminoácidos en la proteína no estructural (NS1), que puede contribuir a la virulencia de los subtipos H5N1. La terminación carboxilo de la NS1 de la mayoría de los H5N1 contiene una secuencia de aminoácidos: ESEV (Glutamina-Serina-Glutamina-Valina). Éstos median la unión a un dominio proteico de la superficie celular llamado PDZ, mientras, la terminación carboxilo de la NS1 de menor virulencia en el virus de la gripe A en humanos, normalmente contiene una secuencia diferente: RSKV (Arginina-Serina-Lisina-Valina), la cual no se une al dominio PDZ. Consecuentemente, la capacidad de unirse a un dominio PDZ por la NS1 de los subtipos H5N1 se correlaciona con virulencia en humanos (**Hatta y cols, 2001; Krug, 2006**).

Se ha comprobado que tiene un papel importante en la patogenicidad la proteína viral **PB1-F2** de localización mitocondrial (**Chen y cols, 2001**), que parece inducir apoptosis en las células monocíticas. Por lo tanto, las personas infectadas con una cepa productora de esta proteína PB1-F2 tienen menos capacidad para responder a la infección por el virus de la gripe.

I.3. PATOGENIA DE LA INFECCIÓN GRIPAL EN HUMANOS

El inicio de la infección por virus de la gripe se produce por la entrada del virus en la mucosa del tracto respiratorio. La infección se adquiere vía aérea (estornudar, toser o hablar) a través de las secreciones respiratorias que contienen gran cantidad de virus en el momento de la enfermedad en personas infectadas. La diseminación del virus por pequeñas partículas de aerosol pueden depositarlo tanto en vías respiratorias altas (nasofaringe) e intermedias (tráquea), como en el tracto respiratorio inferior (bronquiolos y alvéolos), siendo esta última localización mucho menos frecuente. También puede adquirirse la infección por contacto directo con las secreciones contaminadas. La transmisión por contacto directo deposita el virus sólo en nasofaringe. Se ha demostrado que la cantidad de virus necesaria para infectar el tracto respiratorio inferior es muy pequeña, siendo necesarias dosis cien veces mayores para infectar la nasofaringe.

El virus de la gripe A es relativamente estable en partículas de aerosoles en una gama variada de humedad relativa y de temperatura, aunque las condiciones que mejor preservan su viabilidad son las bajas temperaturas y la baja humedad (**Treanor, 2005**).

El virus llega a la mucosa respiratoria por vía aérea, donde puede ser neutralizado por los anticuerpos locales provocados por infecciones anteriores; también contribuyen a la defensa los inhibidores inespecíficos existentes en el moco y el sistema mucociliar.

Producida la adsorción el virus inicia su ciclo de replicación que dura de 4 a 6 horas.

El virus se encuentra en las secreciones nasales un día antes o el mismo día del comienzo de los síntomas, incrementándose la concentración hasta alcanzar un pico a las 48 horas, que va declinando lentamente hasta 6-8 días. En niños infectados con el virus de la gripe, es posible recuperar el virus 1 ó 2 días después del comienzo de los síntomas y puede ser encontrado hasta 13 días después. Las personas inmunodeprimidas pueden excretar el virus durante semanas (**Klimov y cols, 1995; Hayden y Palese, 1997; Englund y cols, 1998**).

Existe una correlación entre la concentración de virus excretado y la magnitud de la clínica (**Wright y Webster, 2001**).

La patología que acompaña a la infección por virus de la gripe resulta de la destrucción celular causada por la replicación viral. El virus se excreta desde las células del epitelio columnar antes de que cese su actividad metabólica y sean desprendidas a la luz del tracto respiratorio. En cultivos de órganos, se ha observado que la infección también modifica sustancialmente la actividad de los cilios.

El virus de la gripe A induce cambios en el tracto respiratorio inferior. Se ha comprobado, por medio de broncoscopias a personas con gripe no complicada, que existe una inflamación de la laringe, tráquea y bronquios acompañada de edema. Estudios histológicos muestran que se desarrolla un edema localizado que puede producir estrechamiento significativo de bronquios terminales y bronquiolos. Los casos fatales de neumonía por el virus gripal, muestran grados variables de infiltrados de células intersticiales y edema alveolar. A partir del tercero al quinto día del comienzo de los síntomas, comienza la regeneración del epitelio, estando presentes simultáneamente, procesos destructivos y procesos reparativos (**Wright y Webster, 2001**).

En algunos trabajos han conseguido aislar el virus de otras localizaciones anatómicas como: músculo, hígado, orina, líquido pericárdico y líquido cefalorraquídeo que, junto con los estudios sobre la viremia sugieren que el virus puede diseminarse, aunque no se ha demostrado la replicación fuera del tracto respiratorio. Morishima y cols (2002) han descrito un brote de encefalitis y encefalopatía asociadas a una epidemia de gripe en Japón durante 1998-1999. En los casos en los que se realizó biopsia cerebral no detectaron antígeno específico del virus gripal en este tejido y sólo a un pequeño número de pacientes se les detectó ARN del virus por RT-PCR en LCR (**Morishima y cols, 2002**), por lo que la patogénesis del virus en la encefalopatía y encefalitis asociadas a la gripe es incierta. También Morishima y cols (2004) han realizado una revisión de los casos de encefalopatía asociada a virus gripal en las temporadas de gripe desde 1994 hasta 2002, observando que la encefalopatía asociada a gripe podría

ser un síndrome infravalorado, y que sería un motivo para promover la vacunación en niños y adultos jóvenes.

Con respecto a la respuesta inmunológica las observaciones epidemiológicas y experimentales en humanos han demostrado que la infección con virus de la gripe da lugar a una resistencia a la reinfección con virus homólogos. Además, se ha descrito la variable degradación de la protección frente a un subtipo y que la infección no induce protección cruzada para otros subtipos o entre los tipos A y B. La infección conlleva una respuesta inmunológica local y sistémica y también una respuesta celular T citotóxica, las cuales juegan un papel importante en la recuperación y la resistencia a la reinfección (**Treanor, 2005**).

La respuesta humoral en la infección por el virus de la gripe da lugar al desarrollo de anticuerpos frente a las glicoproteínas HA, NA, proteína M1 y nucleoproteína (algunas personas pueden desarrollar anticuerpos frente la proteína M2).

La producción de IgM, IgA e IgG frente a la HA aparece a las dos semanas de la inoculación del virus. La respuesta de anticuerpos es más rápida en las reinfecciones. El pico de la respuesta de anticuerpos es en la cuarta a séptima semana tras la infección y va disminuyendo lentamente; los títulos pueden ser detectados años después de la infección incluso tras reexposición. Los anticuerpos frente a la HA son inhibidores de la hemaglutinación (se pueden medir por el test de inhibición de la hemaglutinación) y neutralizantes de la infectividad del virus (se pueden medir por el test de la neutralización); los anticuerpos producidos frente a la NA no son neutralizantes, pero reducen la liberación eficiente del virus de las células infectadas.

Los anticuerpos frente a las proteínas M o NP pueden medirse por el test reacción de fijación del complemento. Estos anticuerpos tienen reacciones cruzadas entre los virus tipo A, pero no son neutralizantes ni parecen jugar un papel importante en la inmunidad protectora. Desaparecen más rápidamente (semanas a meses) que los anticuerpos neutralizante frente a HA, porque son predominantemente IgM. Pueden ser útiles para el diagnóstico de la infección reciente.

Además, se desarrollan también anticuerpos secretores en saliva, secreciones nasales, esputo y material de lavados broncoalveolares, y son mayoritariamente de tipo IgA e IgG, alcanzándose el pico de los títulos a los 14 días después de la infección.

En cuanto a la respuesta celular, las células infectadas por virus de la gripe pueden ser lisadas por anticuerpos en presencia de complemento, por citotoxicidad dependiente de anticuerpos o por acción de linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T citotóxicos se han relacionado con la reducción de los niveles de replicación del virus en adultos que tienen niveles bajos en suero de anticuerpos frente a HA y NA.

La respuesta de los linfocitos T citotóxicos memoria podría jugar un papel en la disminución de la gravedad de la infección, como sugieren los casos en individuos con defecto de la inmunidad celular donde la infección es más grave (**Treanor, 2005**).

Los virus de la gripe son inductores eficientes de interferón que puede detectarse durante la fase aguda de la enfermedad en las secreciones respiratorias y en el suero (**Wright y Webster, 2001**).

I.4. LA GRIPE EN OTRAS ESPECIES

Los virus de la gripe A infectan a otras especies. El virus B infecta sólo al hombre, aunque se ha comunicado el primer caso detectado de infección natural en una foca por este virus humano del que no se conoce reservorio animal (**Osterhaus y cols, 2000**). El virus de la gripe C infecta a los cerdos además de al hombre.

Los diferentes estudios epidemiológicos y ecológicos han demostrado que todos los subtipos gripales A se originan y mantienen en las aves acuáticas, en especial los patos (**Webster y cols, 1992; Lamb y Krug, 1996; Hayden y Palese, 1997; Wright y Webster, 2001; Pérez y Casas, 2004**).

La enfermedad de las AVES con el virus de la gripe A varía considerablemente con la cepa del virus. Las infecciones con la mayoría de las cepas son asintomáticas, pero unas pocas pueden producir infección sistémica

con implicación del sistema nervioso central que puede llevar a la muerte. En los patos, la mayoría de las cepas se replican en los pulmones y en el tracto intestinal, de ahí los virus son excretados por las heces. La alta concentración de virus en las heces de los patos y el aislamiento de virus gripal A del agua de algunos lagos, hace pensar que éste puede ser el mecanismo de adquisición del virus por otras especies de aves y mamíferos. Los virus de la gripe de origen aviar han sido implicados en brotes de gripe en otras especies (**Wright y Webster, 2001**).

La naturaleza avirulenta de la mayoría de las cepas de la gripe A en los patos, puede ser el resultado de una adaptación a este hospedador a través del tiempo, creando un reservorio para la perpetuación del virus. Por tanto, los patos ocupan una posición única y muy importante en la historia natural del virus de la gripe.

La enfermedad se ha descrito también en los cerdos. Fue observada por primera vez en los Estados Unidos durante la pandemia de gripe humana en 1918-1919. Los estudios serológicos indican que la cepa causante de la pandemia humana y la que produjo enfermedad en los cerdos, estaban relacionadas antigénicamente. (**Wright y Webster, 2001**).

La gripe en los cerdos es muy similar a la del hombre, por cuanto produce compromiso respiratorio y sistémico y a veces con sobreinfección bacteriana pulmonar.

I.5. CLÍNICA Y COMPLICACIONES DE LA GRIPE

El síndrome clínico que produce la gripe en la mayoría de los infectados, va a depender de la cepa infectante, el nivel de inmunidad preexistente y el estado de base del infectado (**Hayden y Palese, 1997**).

Las tasas de ataque de la gripe son mayores en niños y descienden con la edad. Esto se atribuye en gran medida a la inmunidad adquirida por los individuos de mayor edad como consecuencia de infecciones previas con virus relacionados. En este sentido, el virus de la gripe B parece afectar más a niños y jóvenes, ya que sufre menos variaciones antigénicas y la inmunidad frente a él se incrementa

con la edad y las exposiciones previas. La infección se disemina rápidamente entre los niños en el ambiente escolar y se consideran los introductores de la infección en sus familias (**Wright y Webster, 2001; Navarro y cols, 2005**).

El cuadro de gripe no complicada tiene un periodo de incubación de 1-2 días y se caracteriza por el comienzo brusco de síntomas sistémicos, como cefalea, fiebre, escalofríos, mialgias, malestar y anorexia acompañados por signos respiratorios, principalmente tos seca, secreción nasal y dolor de garganta (**Treanor, 2005**).

En los niños, son frecuentes las náuseas, vómitos y otitis (**Ryan, 1995; Neuzil y cols, 2002; Peltola y cols, 2003**).

Pero durante una epidemia de gripe, puede haber un amplio abanico de presentaciones clínicas, que puede ir desde una leve enfermedad respiratoria afebril similar a un resfriado común que no interfiere en las actividades normales, a una enfermedad severa con postración del paciente. Cuando éste requiere atención médica, la fiebre alta (mayor de 38°C) suele estar presente y es el hallazgo físico más importante. La temperatura se eleva dentro de las 24 horas del comienzo de los síntomas, y desciende gradualmente en dos o tres días, aunque en ocasiones puede permanecer hasta una semana.

Por lo general las mialgias y las cefaleas son los síntomas más molestos y su gravedad está relacionada con la magnitud de la fiebre, de manera que ceden al desaparecer ésta. También pueden presentarse artralgias, dolor ocular y lagrimeo con sensación de quemazón y fotofobia. A menudo aparecen ganglios linfáticos cervicales sensibles, sobre todo en los niños.

Los síntomas respiratorios están también presentes al comienzo de la enfermedad pero están camuflados por los síntomas sistémicos. El predominio de estos últimos es la característica mayor para distinguir la gripe de otras infecciones del tracto respiratorio superior. A medida que los signos y síntomas sistémicos disminuyen, las molestias respiratorias son más evidentes. La tos es el más molesto de los síntomas, junto a la secreción nasal y obstrucción. Estos signos, por lo general persisten hasta 3 ó 4 días después de desaparecer la fiebre, aunque la tos puede persistir durante más tiempo (**Treanor, 2005**).

En la gripe no complicada, la enfermedad aguda generalmente se resuelve en un período de 3 a 5 días, y la mayoría de los pacientes se recuperan en una

semana. En algunos, sin embargo, los síntomas de debilidad (astenia postgripal) pueden persistir durante varias semanas, sobre todo en los ancianos.

El cuadro clínico descrito se produce con cualquier tipo o subtipo de virus A o B. Por el contrario, la infección con el tipo C, cuando ocurre, causa un cuadro leve similar al resfriado común y cursa sin fiebre (**Treanor, 2005**).

Aunque las tasas de infección por virus de la gripe son mayores en niños y adultos jóvenes, las tasas de hospitalización por complicaciones o gravedad en estas edades son las más bajas, cuando no existen factores de riesgo.

Las tasas de hospitalización más altas se dan en las edades extremas: niños menores de 1 año, por la carencia de inmunidad y por la anatomía de sus vías respiratorias; y en los ancianos, donde el incremento en la gravedad y complicaciones de la gripe generalmente son debidas a descompensación de ciertas patologías de base como enfermedades cardiovasculares, pulmonares, diabetes, disfunción renal, inmunosupresión y asma (**Glezen y cols, 1987; Barker y cols, 1998; Hall y Katz, 2005**).

Las complicaciones más importantes son las pulmonares, entre las que destacan la neumonía viral primaria producida por el propio virus gripal y las neumonías bacterianas secundarias. (**Hayden y Palese, 1997; Wright y Webster, 2001; Treanor, 2005**).

Además pueden ocurrir complicaciones extrapulmonares entre las que se incluyen sinusitis y otitis media sobre todo en niños pequeños. Rara vez complicaciones musculares y cardíacas (miocarditis y pericarditis). En brotes recientes de gripe de tipos A o B han aparecido cuadros similares al síndrome del shock tóxico entre niños y adultos previamente sanos, al parecer porque la infección viral provoca un cambio en las características de colonización y replicación del estafilococo productor de toxina (**Treanor, 2005**).

También se han documentado complicaciones del SNC entre las que destaca el **síndrome de Reye** que es una complicación hepática y del sistema nervioso central asociado frecuentemente con la infección por el virus de la gripe B, así como virus gripal A(H1N1) y A(H3N2); aunque también se ha asociado a otros virus, fundamentalmente varicela-zoster (**Wright y Webster, 2001**). Este síndrome ocurre casi exclusivamente en niños entre los 2 y 16 años de edad y tiene una alta mortalidad (hasta el 40%). El síndrome de Reye puede ocurrir

varios días después de una infección respiratoria alta, digestiva o varicela típicas. Hay una asociación clara entre el uso de aspirina y este síndrome, lo que ha llevado a la recomendación del uso de otro antipirético en niños con fiebre debida a una gripe o varicela (**Treanor, 2005**). Además han sido descritas otras complicaciones en el sistema nervioso central como encefalitis, encefalopatías, mielitis transversa; aunque una asociación etiológica de estos desordenes con la infección por el virus de la gripe ha sido infrecuentemente probado, y la infección acontece sólo en una pequeña proporción de casos de cada una de estas entidades.

Se ha observado en infecciones humanas por virus aviar AH5N1 altamente patógeno, se ha descrito en muchos pacientes un cuadro similar a la linfohistiocitosis hemofagocítica, caracterizado por hipercitoquinemia masiva, citopenia, y encefalitis aguda, que contribuye en gran medida a la gravedad del cuadro en estos pacientes y que ha llevado a algunos autores a sugerir la utilización de corticoides y drogas citotóxicas tipo “etoposide” para un mejor control de esta enfermedad (**Henter y cols, 2006**).

En cuanto al comportamiento y desarrollo de la última pandemia de gripe producida por el virus A(H1N1)v habría que destacar que la mayoría de los casos graves de infección se presentaron en personas jóvenes y adultos menores de 60 años, lo cual difiere de lo que suele observarse durante las epidemias de gripe estacional donde los casos graves son más frecuentes entre niños menores de 2 años y personas de 65 años o más. En un alto porcentaje los casos graves existían factores de riesgo conocidos para las complicaciones graves de la gripe, como enfermedad pulmonar crónica o enfermedad cardiovascular. En este grupo de factores de riesgo asociados se incluyen mujeres embarazadas que ha destacado como factor de riesgo importante en esta última pandemia (**Committe WHO, 2010**).

I.6. PROFILAXIS Y TRATAMIENTO DE LA GRIPE

I.6.1 Vacunación antigripal

La vacunación es la principal medida para prevenir la gripe y sus complicaciones y para reducir el impacto de las epidemias. Varios tipos de vacunas de la gripe han estado disponibles y han sido usadas durante más de 60 años. Son efectivas y seguras para prevenir las complicaciones medias y graves de la gripe (**Treanor, 2005**).

Existen dos tipos de vacunas antigripales, las vacunas inactivadas y las vacunas con cepas vivas atenuadas:

-Vacunas antigripales trivalentes inactivadas: existen tres tipos de vacuna antigripal inactivada: vacunas de virus completos, vacunas de virus fragmentados y vacunas de subunidades. En la mayoría de los países, las vacunas de virus completos se han reemplazado por las vacunas de virus fragmentados y las de subunidades víricas, que son menos reactógenas.

Las vacunas antigripales trivalentes inactivadas se administran en una dosis única en mayores de 9 años y adultos sanos. No deben administrarse a niños menores de 6 meses; los niños entre 6 y 36 meses de edad deben recibir la mitad de la dosis del adulto. Los niños menores de 9 años sin vacunación previa deben recibir dos inyecciones, administradas a un intervalo mínimo de un mes.

-Vacunas antigripales atenuadas: en 2003, se autorizó en los Estados Unidos una vacuna antigripal de virus vivos análoga, producida mediante técnicas de reordenamiento genético. Esta vacuna contiene genes de la hemaglutinina y de la neuraminidasa de tres cepas recomendadas por la OMS y, además, genes de una cepa de referencia adaptada al frío. Las vacunas antigripales atenuadas parecen ser equivalentes a las vacunas trivalentes inactivadas con respecto a su eficacia protectora. Sin embargo, esta vacuna se autoriza sólo en personas sanas entre 5 y 49 años de edad, debido a informes sobre un aumento de la reactividad de las vías respiratorias en los niños vacunados menores de 5 años y a la falta de

confirmación suficiente de su eficacia protectora en las personas mayores (**OMS, 2005**).

La vacuna antigripal está indicada para la profilaxis de la gripe, particularmente en grupos de alto riesgo. Entre los ancianos, la vacuna se considera que reduce la morbilidad relacionada con la gripe en un 60% y la mortalidad en un 70-80%. En los adultos sanos la vacuna es muy efectiva (70-90%) en términos de reducir la morbilidad, y la vacunación en este grupo ha demostrado tener importantes beneficios económicos, así como otros relacionados con la salud. La eficacia de la vacuna en la prevención de la gripe y en la reducción de su gravedad depende de numerosos factores, tales como la edad de la persona vacunada, el estado de su sistema inmunitario, el grado de similitud entre los virus contenidos en la vacuna y aquellos en circulación y el tiempo entre la vacunación y la exposición a la infección. La vacuna es más eficaz si la exposición a la infección sucede dentro del mes posterior a la vacunación y es raramente eficaz después de transcurrido un año. Si se suman todos los factores que interactúan, la vacuna de la gripe tiene una eficacia de protección del 70% en la población inmunizada. (**Treanor, 2005**).

Actualmente, para la próxima temporada 2010-2011, las recomendaciones de los CDC de vacunación antigripal (trivalente, que incluye la cepa A/California/(07/2009 (H1N1)v), A/Perth/16/2009 (H3N2) y B/Brisbane/60/2008) es de vacunación universal frente a la gripe en todos los individuos con más de 6 meses de edad, dado que a los grupos de riesgo de complicaciones de gripe estacional en temporadas anteriores a la actual pandemia, se han sumado otros en los que la gripe A(H1N1)v ha producido graves complicaciones, por ejemplo, obesos y/o personas entre 19 y 49 años de edad (**CDC, 2009**).

La vacuna comienza a hacer efecto (inmunogenicidad) a las dos semanas de su aplicación, por lo que conviene no demorarse en la vacunación, y hacerlo entre octubre y noviembre, en nuestro medio.

Los virus contenidos en la vacuna son determinados anualmente por la Organización Mundial de la salud sobre la base de la información disponible acerca de la prevalencia de aislamientos de cepas concretas que circulan en todo

el mundo (Centros Colaboradores Internacionales de la OMS). Cada año deben seleccionarse las cepas que se incluirán en la vacuna basándose en los pequeños cambios antigénicos que pueden mostrar las cepas circulantes respecto a las de años anteriores, de manera que la inmunidad previa puede no ser efectiva. En el hemisferio norte, las cepas son seleccionadas a finales del mes de febrero; los laboratorios farmacéuticos trabajan en la elaboración de vacunas durante la primavera y el verano, y son distribuidas en Septiembre y Octubre (inicio de las campañas de inmunización).

I.6.2. Tratamiento antiviral

Uno de los objetivos fundamentales de las guías de tratamiento antiviral de la gripe es proporcionar recomendaciones actualizadas sobre el uso de agentes antivirales para el tratamiento y la quimioprofilaxis de la gripe, incluyendo la gripe estacional y la nueva infección por el virus A(H1N1)v 2009, y ayudar a los médicos en la priorización de la utilización de estos fármacos.

En este sentido todas se refieren específicamente a las dos clases de fármacos de que disponemos actualmente y que actúan contra la infección por el virus de la gripe:

- Los bloqueadores de los canales iónicos (amantadina y rimantadina) inhiben la función de la proteína M2 y, por tanto, el proceso de replicación vírica. Son efectivos contra el virus gripal del tipo A, pero no contra el tipo B, que no posee la proteína M2.

- Los inhibidores de la neuraminidasa (zanamivir, oseltamivir, peramivir) son efectivos contra los virus gripales del tipo A y B. Ambos fármacos son capaces de actuar sobre los receptores enzimáticos de la neuraminidasa, lo que provoca la agregación viral a la superficie celular y la reducción del número de virus liberados por la célula infectada.

Las guías más recientes confirman la existencia de pruebas de la eficacia de los inhibidores de la neuraminidasas (oseltamivir y zanamivir) en el tratamiento de la gripe estacional. Parece que proporcionan beneficios sobre todo a pacientes con diagnóstico de gripe confirmada en laboratorio, pacientes mayores y pacientes pertenecientes a los llamados grupos de riesgo. La evidencia de los beneficios del tratamiento antiviral en los estudios sobre complicaciones de la

gripe estacional es más consistente cuando se inicia el tratamiento dentro de las 48 horas de la aparición de los síntomas. Iniciar el tratamiento tan pronto como sea posible también se piensa que pueda reducir el riesgo de consecuencias graves como enfermedad severa o muerte.

En cuanto a las recomendaciones de uso de los antivirales en la práctica clínica, se basan atendiendo al contexto epidemiológico, las características de la población infectada y la severidad de la enfermedad. Así, se recomienda el uso de oseltamivir y zanamivir para el tratamiento de la gripe en adultos y niños, en las siguientes circunstancias:

- Pacientes con infección por el virus de la gripe que presenta clínica severa o progresiva, o que pertenece a un grupo de riesgo (niños <5años, personas >65años, residentes en instituciones, embarazadas, pacientes con condiciones de comorbilidad crónica: cardiovascular, respiratoria o hepáticas, diabetes y pacientes con inmunosupresión relacionada con enfermedad oncológica, infección VIH y otra enfermedad).

- Cualquier persona con sospecha o confirmación de gripe que requiere hospitalización (**Villena y cols, 2009**).

I.7. VIGILANCIA INTERNACIONAL DE LA GRIPE

Los virus de la gripe humana constituyen un importante problema de salud, tanto para los países en vías de desarrollo como industrializados.

La vigilancia de la gripe es un objetivo de salud pública a escala mundial.

La infección por el virus de la gripe se caracteriza por una importante morbi-mortalidad durante la época epidémica. El porcentaje de muertes atribuible a esta infección es difícil de estimar porque muchos de los casos no son confirmados virológicamente y muchas de las muertes ocurren como consecuencia de las complicaciones asociadas a la infección, donde el virus de la gripe no ha sido detectado. Aún así, en la época epidémica de gripe, se observa un incremento en el número de hospitalizaciones y muertes debidas a la gripe, entre las que se incluye el fallo cardíaco congestivo, exacerbaciones de enfermedades pulmonares crónicas, neumonías y sobreinfecciones bacterianas

(Nichol y cols, 1999; Griffin y cols, 2002; Uphoff y Stilianakis, 2004; Kynel y cols, 2005).

Por otro lado existen variaciones en la mortalidad asociada al virus de la gripe dependiendo del tipo o subtipo predominante que circule. Durante una temporada epidémica media, alrededor del 10% de la población mundial contraerá la gripe, originándose un fuerte impacto económico debido a la pérdida de productividad laboral y a los costes derivados de la atención a los pacientes.

Todo lo expuesto justifica los continuos esfuerzos para prevenir y controlar esta enfermedad (Treanor, 2005). Por ello, a nivel mundial se han generado diferentes sistemas de vigilancia de la gripe, tanto epidemiológica como virológica que persiguen detectar y caracterizar precozmente los virus de la gripe circulantes y evaluar su capacidad de difusión en la población.

1.7.1. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

Los objetivos fundamentales de la vigilancia epidemiológica de la gripe son:

- Identificar cuándo y dónde el virus de la gripe está circulando en un país.
- Valorar la morbilidad, la mortalidad de la gripe y conocer su distribución y tendencias como base para la planificación de los servicios asistenciales.
- Evaluar la efectividad de las medidas preventivas tomadas.
- Detección de microepidemias en medio comunitario y nosocomial que haga posible realizar una intervención precoz.

Estos objetivos se amplían en situaciones de prepandemia a:

- Detección y notificación precoz de casos de gripe por una cepa con potencial pandémico en humanos.
- Vigilancia activa de contactos para detección precoz de casos secundarios.

Para estimar la extensión de la actividad gripal, se utiliza una amplia variedad de indicadores.

El principal marcador se basa en el número de pacientes con cuadros gripales vistos en consulta. Es suministrado por los médicos que atienden a los pacientes en base a los diagnósticos de gripe realizados utilizando criterios clínicos y virológicos. El diagnóstico clínico de la gripe puede tener poca especificidad, sobre todo si están circulando otros patógenos respiratorios, sin embargo, cuando se sabe que el virus de la gripe está circulando en la comunidad, la incidencia de enfermedad debida a otros virus respiratorios desciende y el valor predictivo positivo de los signos y síntomas clínicos, se incrementan. En cambio durante el periodo no epidémico, el valor predictivo positivo de los mismos disminuye (**Navarro y cols, 2005**). En conjunto, los médicos pueden diagnosticar correctamente esta infección entre el 60-85% de los casos sólo basándose en la clínica (**Zambon y cols, 2001; Treanor, 2005; Navarro y cols, 2005**).

La definición de caso de gripe varía ampliamente para los diferentes sistemas de vigilancia epidemiológica y a menudo son imprecisos (**Carrat y cols, 1999**); aunque la mayor parte de los clínicos siguen los criterios definidos por la "World Organization of National Colleges and Academic Associations of General Practitioners/Family Physicians 1983" (WONCA) que consiste en que al menos cumpla una de las siguientes puntos:

- 1.- Cultivo positivo de virus de la gripe o evidencia serológica de infección por virus de la gripe.
- 2.- Epidemia de gripe, más 4 de los criterios incluidos en el punto 3.
- 3.- 6 de los criterios que siguen:
 - Comienzo súbito (hasta 12 horas)
 - Tos
 - Fiebre
 - Escalofríos
 - Postración y debilidad
 - Mialgia o dolor generalizado

- Rinitis
- Faringitis
- Contacto con un caso

No obstante, diferentes trabajos ponen de manifiesto que la adecuación de la clínica tras infección por virus de la gripe a dichos criterios es parcial y hay diferentes factores que pueden limitar el diagnóstico clínico: cepa circulante, edad del paciente, uso de antipiréticos, estado vacunal... (**Sugaya y cols, 1992; Carrat y cols, 1999; Boivin y cols, 2000; Zambon y cols, 2001; Navarro y cols, 2005; Arostegui y cols, 2005; Treanor, 2005**).

Otros indicadores que suelen utilizarse para evaluar el impacto de las epidemias de gripe son los datos de mortalidad, obtenidos de forma retrospectiva a partir del número de defunciones ocurridas en general y asociadas a cuadros respiratorios o neumonías en particular, e indicadores de morbilidad como visitas domiciliarias de medicina general (totales, por infecciones respiratorias agudas y específicas), el absentismo escolar o laboral, la venta de fármacos antigripales, o la hospitalización por infecciones respiratorias agudas (**Martínez y cols, 2002**).

1.7.2. VIGILANCIA VIROLÓGICA

Es fundamental conocer las características virológicas de las cepas circulantes en cada temporada gripal con el fin de:

- Establecer su homología con las cepas vacunales empleadas.
- La similitud entre las cepas circulantes en distintas áreas geográficas en una misma temporada.
- Detectar de forma precoz la presencia de subtipos nuevos que puedan ser causa de pandemia.
- Detectar la aparición de resistencias a los antivirales.

En 1947, la **OMS** estableció una red de vigilancia internacional de la gripe, que en la actualidad se asienta en el trabajo conjunto de cuatro Centros Internacionales Colaboradores (Tokio, Melbourne, Londres y Atlanta) y, 110 Centros Nacionales de Gripe, distribuidos en más de 87 zonas y países (en España, son Centros Nacionales de Gripe de la OMS: el Centro Nacional de

Microbiología de Majadahonda, el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico/Universidad de Barcelona y la Facultad de Medicina/Hospital Clínico de Valladolid).

En general, hay tres tipos de laboratorios encargados de la vigilancia gripal: laboratorios regionales asociados a redes centinelas, laboratorios nacionales y laboratorios internacionales.

Los laboratorios regionales realizan el aislamiento de los virus gripales de las muestras remitidas por los médicos centinelas de su territorio y, dependiendo de la dotación tecnológica de que dispongan, podrán caracterizarlos en tipos y subtipos H1 y H3. En España en situación prepandémica, se recomienda que cada Comunidad Autónoma, dependiendo de sus dimensiones, además disponga al menos de un laboratorio, perfectamente coordinado con el laboratorio de virus del Centro Nacional, con capacidad para aislar y detectar por técnicas moleculares los virus gripales con potencial pandémico. En Andalucía el laboratorio de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves de Granada es el que actúa como laboratorio regional para la gripe desde 1994.

Los laboratorios de los Centros Nacionales, confirman o determinan el tipo o subtipo de los virus aislados por los laboratorios regionales, o desarrollan un análisis genético o antigénico más profundo. Los Centros Nacionales de Gripe remiten los virus, parcialmente caracterizados, a los Centros Internacionales Colaboradores de la OMS, para que éstos realicen el análisis genético y antigénico comparativo de las cepas recibidas de los distintos países.

1.7.3. REDES CENTINELAS

Para una mejor vigilancia de la gripe y una mayor rapidez en la transmisión de la información surgieron las Redes Centinelas que permiten analizar de forma integrada los datos virológicos y clínico-epidemiológicos recogidos de manera continua a intervalos de tiempo no superiores a una semana (**Pérez y Aguilar, 2005**).

Las redes de vigilancia están constituidas fundamentalmente por médicos de atención primaria (médicos centinelas) que suministran la información epidemiológica de los casos a la vez que realizan la toma y envío de muestras para el diagnóstico de gripe, y laboratorios centrales que se encargan del procesamiento de esas muestras. La distribución de los médicos centinela en cada territorio responde a criterios urbano-rurales, de dispersión geográfica, pirámide de edad, y debe cubrir, como mínimo, el 1% de la población. (**Pérez y Aguilar, 2005; Mateo y cols, 2006**).

La unión de datos epidemiológicos y de laboratorio, como consecuencia de la vigilancia integral de una población, no pudo hacerse sino hasta mediados de los años noventa, con el inicio de funcionamiento de las redes centinela. La vigilancia de poblaciones de menor tamaño permitió iniciar una declaración individualizada de los casos de gripe, recogiendo datos clínicos, epidemiológicos y microbiológicos de interés. (**Mateo y cols, 2006**).

En 1992 se crea una red reconocida por la OMS y financiada por la Unión Europea (proyecto CARE Telematics) que tenía como objetivo la vigilancia de la gripe; esta red supuso uno de los primeros intentos de vigilar una infección respiratoria aguda mediante redes de médicos centinela con el apoyo de laboratorios. En 1995, finalizado ese proyecto, la red que se había creado mantuvo su funcionamiento y se convirtió en lo que hoy conocemos como Sistema de Vigilancia de la gripe en **Europa** (European Influenza Surveillance Scheme, EISS) que agrupa a un total de 26 países.

En **España**, en 1992 se creó la Red Nacional de Vigilancia de la Gripe coordinada por los Servicios de Epidemiología y Virología del Instituto de Salud Carlos III, integrada actualmente en el EISS, a la que progresivamente se han ido sumando redes de diferentes Comunidades Autónomas, para en la actualidad estar constituida por 16 redes autonómicas, que cubren el 90% del territorio nacional, en la que participan 413 médicos de atención primaria, 125 pediatras y 15 laboratorios de apoyo.

La Red de Vigilancia de Andalucía, se conformó en 1994 y hoy participan en ella 128 médicos de Centros de Salud, de los que 25, aparte de recoger datos epidemiológicos, envían muestras para su procesamiento en el laboratorio.

Habitualmente las Redes Centinelas se mantienen activas durante 8 meses, en nuestro medio desde la semana 40 de un año hasta la semana 20 del año siguiente (**Pérez, 2005**).

I.8. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico etiológico de la gripe es fundamental sobre todo en pacientes con enfermedades de base y que pueden beneficiarse del tratamiento específico con antivirales. Además, es la base de los sistemas de vigilancia virológica de la gripe, ya que el **aislamiento en cultivo es el procedimiento que permite disponer de la cepa circulante** en cada temporada para caracterizarla desde el punto de vista antigénico y genético, y así compararla con las cepas vacunales, lo que se utiliza para proponer la composición que va a tener la vacuna recomendada para la siguiente temporada.

El diagnóstico de la gripe se puede realizar de forma indirecta mediante la detección de la respuesta serológica o directa por aislamiento del virus y/o detección de alguno de sus componentes estructurales (detección de antígeno y/o detección genómica).

I.8.1. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Se basa en la demostración de seroconversión o seroincremento de anticuerpos específicos en el contexto de una infección por el virus de la gripe. Para ello se utilizan muestras de suero recogidas con una diferencia de 10 días entre la fase aguda y la convalescente de la enfermedad. Las técnicas serológicas tienen el inconveniente de producir los resultados de manera tardía, aunque son de mucha utilidad para estudios epidemiológicos principalmente en la realización de estudios poblacionales de cobertura vacunal o cuando el diagnóstico no ha podido ser establecido por otros métodos.

Las técnicas más usadas son: reacción de fijación de complemento (RFC), inhibición de la hemaglutinación (IHA), test de neutralización (TN) y enzimoimmunoensayo (EIA).

I.8.2. DIAGNÓSTICO DIRECTO

I.8.2.1. MUESTRA ADECUADA

El rendimiento de los resultados va a depender del tipo y la calidad de la muestra. Esta debe ser tomada preferiblemente dentro de los tres primeros días del comienzo de los síntomas del cuadro respiratorio. Las que normalmente se toman en los Centros de Atención Primaria son los frotis nasal y/o faríngeo en medio de transporte adecuado para preservar la viabilidad de los virus; mientras que los aspirados y lavados nasofaríngeos suelen tomarse en las urgencias hospitalarias y enfermos hospitalizados. Otras muestras respiratorias que también pueden ser adecuadas son los lavados broncoalveolares y los aspirados traqueales (**Covalciuc y cols, 1999**). Tras su recogida, deben ser remitidas al laboratorio manteniéndolas a 4°C y procesar lo antes posible. Se mantendrán a una temperatura de -80°C si el laboratorio no va a poder procesarlas en los 3-4 días posteriores a su recolección; así mismo, deben ser almacenadas a esta temperatura todas las muestras una vez trabajadas ya que así preservamos la viabilidad e infectividad de los virus durante periodos prolongados.

I.8.2.2. DIAGNÓSTICO POR CULTIVO

El aislamiento en cultivo celular tradicional es un diagnóstico lento y tardío (7-10 días) en la historia natural de la infección gripal, pero de extraordinaria importancia en la vigilancia virológica de los virus de la gripe ya que permite realizar estudios epidemiológicos, antigénicos y filogenéticos con objeto de controlar y actualizar continuamente los datos de la circulación de estos virus, sobre los que se basan las recomendaciones anuales de composición de la vacuna de la gripe.

Para mejorar el rendimiento desde el punto de vista clínico del cultivo, se han desarrollado técnicas de cultivo rápido (Shell-vial) (SV) que combinan la sensibilidad del cultivo tradicional con técnicas de detección de antígeno. El cultivo mediante SV es una de las técnicas más frecuentemente utilizadas en los laboratorios de virología, ya que los resultados pueden estar disponibles en 24-48 horas (**Seno y cols, 1990; Mendoza y cols, 1991; Patel y cols, 1995; Fader,**

2005). La técnica SV tiene una buena correlación con el cultivo tradicional en tubo para la detección de los principales virus respiratorios implicados en infección respiratoria aguda (**Navarro y cols, 1999**), con la ventaja de acortar el tiempo de detección. En esta técnica, el proceso de centrifugación favorece la adsorción de los virus, lo que hace que se incremente la sensibilidad para su aislamiento.

Las líneas celulares más adecuadas para el aislamiento y propagación de los virus de la gripe son: línea primaria de riñón de mono Rhesus (RMK) y células de riñón canino Madin-Darby (MDCK). Las células RMK son difíciles de manejar y presentan mayor variabilidad que las líneas continuas por lo que son menos usadas. Otras líneas celulares donde pueden crecer los virus de la gripe son las células Vero (riñón de mono verde africano) y MRC-5 (fibroblastos de pulmón embrionario humano), pero frente a ellas, la línea MDCK es la que presenta mayor sensibilidad (**Reina y cols, 1997**). Las células MDCK soportan mejor los múltiples ciclos de replicación de los virus gripales A, B y C cuando se añade tripsina al medio.

Menos utilizado para el diagnóstico es el aislamiento de los virus en **huevos embrionados de gallina** que es una técnica que se utiliza cuando se precisa disponer de gran cantidad de virus, como es el caso de la producción de vacunas y para técnicas de hemaglutinación. Los virus de la gripe A y B pueden crecer en la cavidad alantoide y amniótica de huevos embrionados. El tipo C crece solamente en la cavidad amniótica. Los huevos embrionados de 10 a 11 días son los adecuados para recuperar los virus A y B, mientras que el virus C necesita huevos embrionados de 7 a 8 días (**Treanor, 2005**).

El tipado, subtipado y caracterización de los virus crecidos puede hacerse por hemaglutinación, por inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa con anticuerpos específicos, o por técnicas moleculares.

I.8.2.3. DETECCIÓN DE ANTÍGENO

La detección de antígenos específicos de los virus gripales directamente de la muestra clínica se puede realizar por Inmunofluorescencia (IF),

Enzimoinmunoensayo (EIA), inmunocromatografía (IC) métodos Inmunoópticos (IO).

Las técnicas de IF se han mostrado muy eficaces en la detección del virus sobre aspirados nasofaríngeos, sin embargo su eficacia y rendimiento es muy variable en función del tipo y la calidad de la muestra (**Reina y cols, 1996; Reina y cols, 1998; Herrmann y cols, 2001**). En los resultados influye la experiencia del observador y la fluorescencia inespecífica debido a la presencia de moco que puede ser reducida mediante el tratamiento de la muestra con dithiothreitol o N-acetylcysteina.

Las técnicas de EIA, con los diseños actuales (EIA de membrana), son fáciles de realizar y de interpretar, y el resultado se obtiene en unos pocos minutos. Muestran una sensibilidad variable dependiendo del tipo de muestra y del tipo de EIA, presentado los peores valores de sensibilidad en frotis faríngeos (**Covalciuc y cols, 1999; Noyola y cols, 2000; Boivin y cols, 2001**). El EIA puede ser positivo en aquellas muestras clínicas que debido a un transporte o almacenamiento inapropiado han podido perder la capacidad infectiva de los virus presentes, dando cultivos negativos.

Las técnicas de IC e IO se están desarrollando mucho en los últimos años; son técnicas de fácil ejecución (se realizan en un solo paso) e interpretación; no obstante, en general, no están suficientemente evaluadas como para justificar su uso de forma generalizado (**Fader, 2005; Herrmann y cols, 2001**).

I.8.2.4. DETECCIÓN GENÓMICA

Las técnicas moleculares se utilizan tanto para la detección del virus de la gripe en muestras clínicas, como para la caracterización posterior de los aislados.

Las técnicas más empleadas en el diagnóstico de gripe son la Retrotranscripción PCR (RT-PCR), multiplex RT-PCR , RT-nested-PCR, Real time RT-PCR.

Las técnicas RT-PCR se han mostrado como las técnicas de mayor sensibilidad. La superioridad de la RT-PCR frente al cultivo ha sido demostrada por muchos estudios (**Atmar y cols, 1996; Ellis y cols, 1997; Boivin y cols, 2001; Liolios y cols, 2001, Coiras y cols, 2003**).

Los cebadores para la región conservada del gen matriz son usados para el tipaje de virus de la gripe A o B, y otros cebadores dirigidos para la detección de los genes de hemaglutinina y neuraminidasa son usados para subtipaje de virus gripal A.

La multiplex RT-PCR tiene una ventaja significativa de permitir, utilizando secuencias de nucleótidos apropiados, la amplificación simultánea de diferentes tipos y subtipos de un mismo virus o de distintos virus, en una única mezcla de reacción. (**Wright y cols, 1995; Osioy, 1998; Stockton y cols, 1998; Liolios y cols, 2001; Li y cols, 2001; Elden y cols, 2001; Templeton y cols, 2004**).

La RT-nested-PCR o PCR anidada es una técnica muy sensible de PCR en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación. Los cebadores utilizados en la segunda amplificación corresponden a secuencias internas del fragmento amplificado en primer lugar (**Herrmann y cols, 2001; Coiras y cols, 2003**).

La real-time RT-PCR para la detección de virus de la gripe en muestras clínicas ha sido recientemente introducida en la rutina diagnóstica. Estos ensayos usan una sonda fluorescente para la amplificación y detección simultánea de los productos de la PCR (**Elden y cols, 2001; Hindiyeh y cols, 2005; Wu y cols, 2008**).

Otro enfoque para el diagnóstico de virus de la gripe es el uso de microarrays que contienen sondas de ácidos nucleicos para tipaje y subtipaje de virus de la gripe (**Li y cols, 2001**). Esta técnica está basada en la hibridación con un elevado número de sondas, que permite estudiar patrones de expresión de múltiples genes, o cómo los genes interactúan los unos con los otros; también permite estudiar la presencia o ausencia de determinadas secuencias genéticas, normales o mutadas.

I.9. PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS UTILIZADOS EN LA VIGILANCIA INTERNACIONAL DE LA GRIPE

Es fundamental para las redes de vigilancia de la gripe el aislamiento y caracterización temprana de virus circulante y la detección de posibles cepas pandémicas de muestras clínicas. Las técnicas utilizadas para ello en los distintos laboratorios son heterogéneas y diferentes en los distintos países. Con la contrapartida de que diferencias en resultados virológicos puede estar asociado con el uso de diferentes técnicas de laboratorio.

Uno de los objetivos más importantes de la red comunitaria EISS es la armonización de los métodos virológicos y la aplicación de controles de calidad para evaluar los centros nacionales de referencia.

Los métodos utilizados para la detección del virus de la gripe son variados según el país. La mayoría de los laboratorios de la red utilizan el aislamiento viral en cultivo celular como método primario para la detección de virus de la gripe, fundamentalmente con el mismo tipo de células (MDCK), pero para tipado y subtipado de virus de gripe se utilizan métodos diferentes (ELISA, IHA, PCR). También se utilizan otras técnicas adicionales, como PCR o ELISA, para incrementar la sensibilidad de los cultivos. Aunque la sensibilidad de la PCR en Europa varía (40-100%) dependiendo del laboratorio; hay una mejora clara en los índices de sensibilidad con la utilización de estas técnicas (**Valette y Aymar, 2002; Meerhoff y cols, 2004**).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La más reciente alternativa para establecer un diagnóstico rápido de las infecciones por virus de la gripe la constituye la RT-PCR. Su elevada sensibilidad y las perspectivas futuras de una realización más simple y automatizada, la convierten en una excelente herramienta de diagnóstico y en la técnica base para la caracterización genética de estos virus (**Henrickson, 2004**); en cambio tienen un inconveniente y es que no consiguen el aislamiento del virus gripal, indispensable para el análisis antigénico, necesario en el diseño de la vacuna.

Todo esto nos hace pensar en un **enfoque distinto** en el sentido de combinar en un sólo procedimiento, las dos técnicas, cultivo y RT-PCR, para así satisfacer las principales necesidades que se exigen al diagnóstico virológico de la gripe, esto es, aislar y caracterizar de forma rápida.

Existen algunos autores que han utilizado la combinación de técnicas de PCR sobre cultivo celular para virus respiratorios (**Chan y cols, 2003**) y otros virus (enterovirus y adenovirus entéricos); (**Choo y Kim, 2006**). Los primeros utilizan este procedimiento para detectar metapneumovirus humano (hMPV) en pacientes con síndrome respiratorio agudo severo (SARS). Sus resultados demuestran que al aplicar la RT-PCR al sobrenadante de cultivo de células Hep-2 (donde el HMPV no produce efecto citopático) la sensibilidad fue mayor que en las LLC-MK2 (donde el HMPV produce efecto citopático), la línea celular más comúnmente usada en estudios previos para HMPV. Los segundos, utilizan un procedimiento similar para detección de adenovirus y enterovirus en ostras coreanas, y así establecer el grado de contaminación de las mismas. Sus resultados demuestran que dicha técnica fue la más sensible para la detección de virus entéricos en ostras.

Esta combinación de técnicas no se ha aplicado para el diagnóstico del virus de la gripe, por lo que el **OBJETIVO PRINCIPAL** de este trabajo es evaluar su utilidad dentro del sistema de Vigilancia de la Gripe en Andalucía, comparándolo con otros procedimientos habitualmente utilizados, durante las temporadas 2004-2005 y 2005-2006.

Los **OBJETIVOS CONCRETOS** de este trabajo fueron:

1. Describir las características clínico-epidemiológicas de los pacientes incluidos en el sistema de Vigilancia Viroológica de la Gripe en Andalucía durante esas temporadas.
2. Analizar las características virológicas de los aislados de gripe.
3. Evaluar la utilidad y concordancia de tres métodos diagnósticos de gripe: RT-PCR de muestra, cultivo en "shell-vial" y detección del aislado mediante inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales específicos, y cultivo en "shell-vial" y detección del aislado mediante RT-PCR del sobrenadante.
4. Estudiar la relación entre los datos clínico-epidemiológicos del síndrome gripal y los resultados virológicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. PERIODO DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el periodo comprendido entre octubre y mayo de las temporadas de vigilancia de gripe 2004-2005 y 2005-2006.

III.2. ÁMBITO Y PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en el Servicio de **Microbiología** del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, dentro del contexto de la **Red de Vigilancia de gripe en Andalucía**.

La organización de esta red corre a cargo del Servicio de Planificación Operativa (Servicio Andaluz de Salud, SAS), y del Servicio de Vigilancia Epidemiológica y Evaluación de la Consejería de Salud, Junta de Andalucía.

La vigilancia virológica de la red se realiza en el laboratorio de Microbiología con las muestras enviadas por los médicos centinela. Estos médicos participan tanto en la vigilancia epidemiológica como en la recogida de muestras para estudio virológico.

En la temporada 2004-2005 participaron 20 médicos (17 médicos generales y 3 pediatras), y en la temporada 2005-2006, el número de médicos centinela participantes en la vigilancia virológica aumentó a 23 (19 médicos generales y 4 pediatras). Pertenecían a los siguientes **centros de salud o consultorios** repartidos entre las 8 provincias de la comunidad andaluza:

- Ø Consultorio de Pechina (Bajo Andarax, Almería)
- Ø Centro de salud Virgen del Mar (Almería)
- Ø Consultorio San Martín del Tesorillo (Jerez de la Frontera, Cádiz)
- Ø Centro de salud Sanlúcar Barrio Bajo (Cádiz)
- Ø Centro de salud Sanlúcar Barrio Alto (Cádiz)
- Ø Centro de salud Rodríguez Arias (San Fernando, Cádiz)
- Ø Centro de salud Jerez-San Telmo (Cádiz)
- Ø Centro de salud Levante Norte (Córdoba)
- Ø Centro de salud La Chana (Granada)
- Ø Centro de salud Zaidín (Granada)
- Ø Centro de salud Motril (Granada)

- Ø Centro de salud Valverde del Camino (Huelva)
- Ø Centro de salud Cartaya (Huelva)
- Ø Centro de salud Peal de Becerro (Jaén)
- Ø Centro de salud Alcaudete (Jaén)
- Ø Centro de salud Cártama (Málaga)
- Ø Centro de salud Trinidad-Jesús Cautivo (Málaga)
- Ø Centro de salud El Arahal (Sevilla)
- Ø Centro de salud Poniente Norte (Córdoba)
- Ø Centro de salud Atalaya (Conil, Cádiz)
- Ø Centro de salud María Fuensanta (Sevilla)
- Ø Centro de salud Adra (Almería)
- Ø Consultorio El Viso (Córdoba)
- Ø Centro de salud Torrejón (Huelva)
- Ø Centro de salud Priego (Córdoba)
- Ø Centro de salud Montemar-Fuengirola (Málaga)

III.3. SUJETOS DE ESTUDIO Y MUESTRAS

III.3.1. SUJETOS DE ESTUDIO

Los sujetos incluidos en este estudio fueron personas de cualquier edad, atendidas por el médico centinela, que presentaran un cuadro de infección respiratoria aguda (IRA) acompañada de **fiebre > 38°**, y que se encontraran dentro de los tres primeros días desde el comienzo de los síntomas.

III.3.2. MUESTRAS

III.3.2.1. Obtención y envío de muestras

Las muestras se obtuvieron los lunes de cada semana. Cada médico recogió un máximo de 5 muestras por semana desde el comienzo de la temporada hasta el inicio del periodo epidémico, y 3 muestras durante dicho periodo epidémico.

Las muestras estudiadas fueron exudados orofaríngeo y nasal, que se obtenían frotando energicamente con un escobillón estéril en dichas zonas con el fin de obtener una alta concentración de células epiteliales. Para su envío, los dos escobillones se colocaron en un único tubo que contenía una bolita de cristal estéril y 2mL de medio de transporte especial para la preservación de la viabilidad de virus (**MT, ANEXO I**), que era suministrado previamente por el laboratorio de Microbiología a los médicos centinela. Una vez en el tubo con MT, las muestras se enviaron al laboratorio a 4°C en bolsas isotérmicas, a través de un Servicio urgente de Mensajería, dentro de las 18 h siguientes a la toma (**figura III.1: Tubo A y transporte B**).

Figura III.1. Tubo y transporte

A. Tubo



B. Transporte



Cada muestra se acompañó de una etiqueta con los siguientes datos del paciente:

- ⇒ Datos de filiación: nombre, edad, sexo
- ⇒ Estado vacunal
- ⇒ Tiempo de evolución de los síntomas
- ⇒ Prescripción de antibióticos
- ⇒ Si se consideraba síndrome gripal* (“influenza-like illness”) según los criterios de inclusión de la WONCA (Organización Mundial de Médicos de Familia).

⇒ Presencia o ausencia de rinorrea, tos y odinofagia.

***Criterios de inclusión de síndrome gripal (“influenza-like illness”) de la WONCA:**

a) Cuadro dentro de epidemia de gripe más 4 de los criterios incluidos en b) o,

b) Seis de los 9 hallazgos siguientes:

Comienzo abrupto (≤ 12 h)

Tos

Escalofríos

Fiebre

Postración y debilidad

Cefalea

Mialgia y dolores generalizados

Enrojecimiento de la mucosa faríngea y nasal sin ningún otro signo físico

Contacto con enfermo de gripe

Classification Committee of WONCA. Inclusion criteria for the use of the rubrics of the International Classification of Health Problems in Primary Care. In: ICHPPC-2-defined. New York: Oxford University Press; 1983:487

III.3.2.2. Recepción y procesamiento inicial de muestras

Tras la recepción de las muestras en el laboratorio, se le asignó un número de identificación a cada una. Se recogieron los datos demográficos y clínicos y se introdujeron en una base de datos Access (MS Office XP).

Cada tubo conteniendo la bolita de cristal y los escobillones nasal y faríngeo se agitó en vortex durante aproximadamente 10 seg. Tras retirar los escobillones con una pinza estéril, se añadieron 200 μ L mezcla antibiótica (10% del total de la muestra) (**ANEXO I**), y se incubó a 4°C durante 30 minutos.

Tras este procesamiento inicial, la muestra se utilizó para estudio virológico a razón de (**figura III.2**):

- 4 alícuotas de 200 μ L cada una para **cultivo viral**
- 2 alícuotas de 140 μ L cada una para **detección molecular**
- Resto: congelación a -80°C

III.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

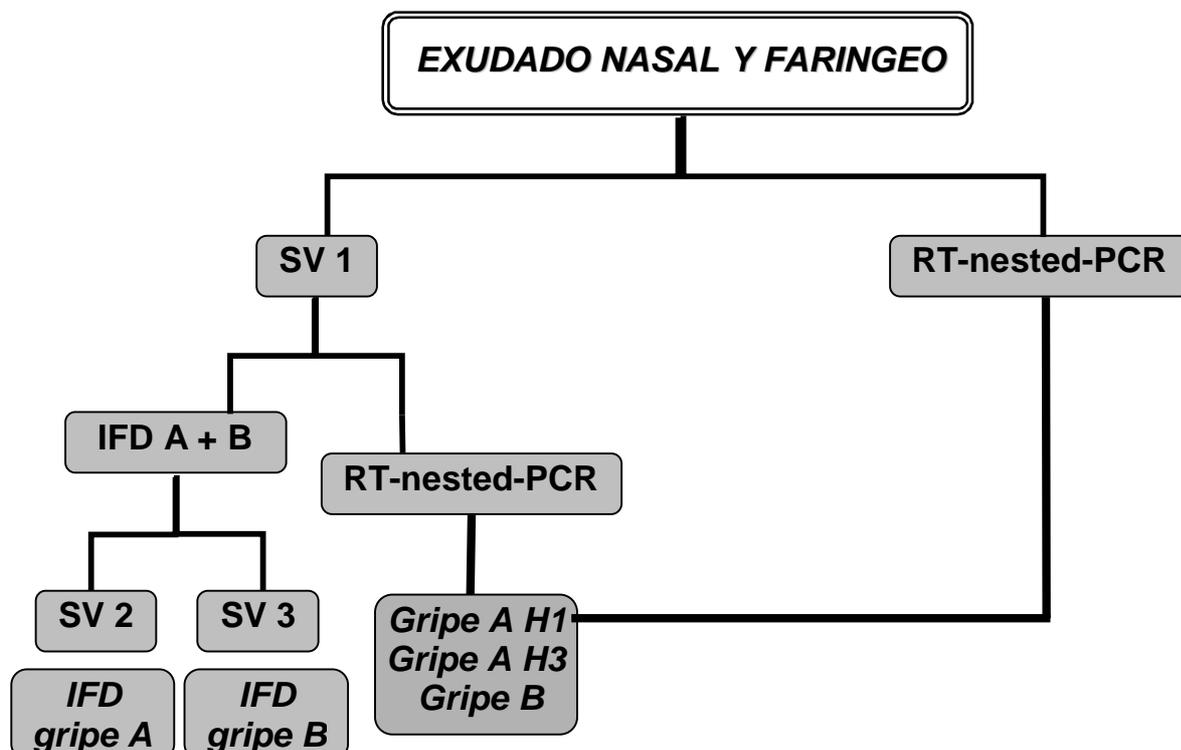
Los métodos diagnósticos evaluados y comparados en este estudio y la nomenclatura que se va a utilizar en este trabajo se exponen en la tabla III.1.

Tabla III.1. Métodos de diagnóstico virológico comparados, para detección de gripe a partir de muestras clínicas

<i>NOMBRE</i>	<i>MÉTODO DE DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO</i>
MD	RT-PCR de muestra directa
SV-IF	Cultivo en shell vial + IFD sobre monocapa
SV-PCR	Cultivo en shell-vial + RT-PCR sobrenadante cultivo

En la figura III.2, se muestra el algoritmo seguido para el procesamiento de muestras y diagnóstico de gripe mediante los métodos descritos anteriormente.

Figura III.2. Procesamiento de las muestras. SV, cultivo mediante técnica de shell-vial; CT, cultivo tradicional en tubo; IFD A+B, inmunofluorescencia directa frente a gripe A y B en la misma muestra



III.4.1. AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE VIRUS DE LA GRIPE EN CULTIVO CELULAR

III.4.1.1. PREPARACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR

Para el aislamiento de virus de la gripe se utilizó la línea celular MDCK, procedentes de riñón canino de la raza cocker spanier (“Madin Darby canine kidney”) (Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid). Esta línea celular se mantiene en el laboratorio por pases sucesivos con Medio Esencial Mínimo (MEM) de Eagle suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (**MEM 10%, ANEXO I**). Semanalmente se preparaban tubos de fondo plano para cultivo rápido mediante técnica de shell-vial (SV). Siempre se usaron tubos conteniendo como sustrato líneas celulares de pase reciente (menor de 7 días).

Las células crecen en el SV formando monocapa sobre un cubreobjetos circular de 12 mm de diámetro incluido dentro del tubo de fondo plano (**figura III.3**).

Figura III.3. Tubo shell-vial



El procedimiento de preparación de las líneas celulares se resume a continuación:

1º A un frasco con células MDCK crecidas en monocapa, se le retiraba el medio de mantenimiento y se desprendían las células con solución de disgregación de células (**ANEXO I**).

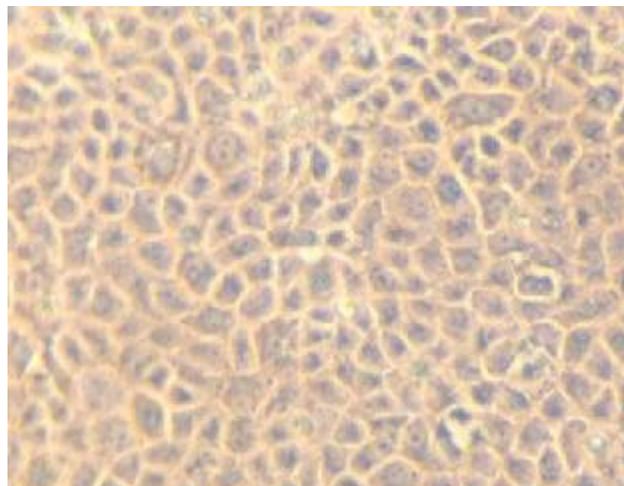
2º Tras añadir unos 10mL de MEM 10% de SFB al frasco, se disgregaban las células aspirando y expulsando la suspensión varias veces a través de una pipeta de plástico estéril.

3º Se le añadía el resto de medio de crecimiento necesario, y tras mezclar bien toda la suspensión, se hacía recuento de células en cámara de Neubauer y se añadía MEM 10% para ajustar la suspensión a 150.000 células/mL. Se repartía en tubos fondo plano para cultivo a razón de 1mL de suspensión de células por tubo.

4º Los tubos para SV se incubaban verticalmente, para permitir el crecimiento de las células en monocapa, ambos a 37°C.

5º A las 24 h, se observaba en microscopio invertido si se había formado monocapa en los tubos (**figura III.4**), y se les cambiaba el medio de crecimiento por medio de mantenimiento, MEM suplementado con un 1% de SFB, a razón de 1mL a los tubos para SV (**MEM 1%, ANEXO I**).

Figura III.4. Aspecto de monocapa de células MDCK con objetivo 40X



III.4.1.2. CULTIVO CELULAR EN TUBOS DE FONDO PLANO MEDIANTE TÉCNICA “Shell-vial” (SV)

Se inocularon tres viales de fondo plano por cada muestra (200µL por vial). También se inoculó un vial con un control positivo de gripe AH1N1 y otro de gripe B con cada tanda semanal de muestras.

El procedimiento de la técnica SV es el siguiente:

- Tras retirar el medio del vial, se inoculan 200 μ L de muestra o control. Los viales fueron centrifugados a 800 x g durante 45 min a temperatura ambiente.
- Se deja adsorber la muestra sobre la monocapa durante 1h a 37°C.
- Posteriormente, sin decantar la muestra, se añaden 2mL de medio de inoculación y son incubados a 37°C y en agitación continua (120 rpm).

III.4.1.3. DETECCIÓN DE VIRUS GRIPALES EN CULTIVO

III.4.1.3.A. Inmunofluorescencia directa (IFD) sobre cultivo SV

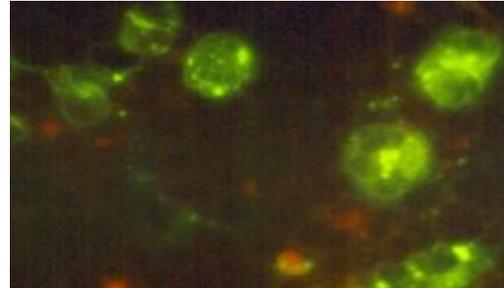
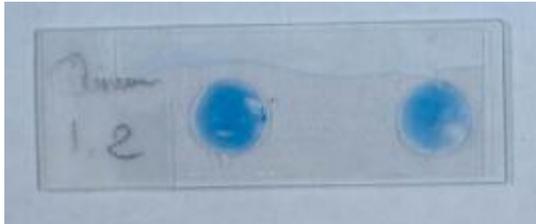
Tras 18-48 horas de incubación, se retiró el medio de inoculación de un vial de cada muestra (sobrenadante) con pipeta estéril colocándolo en un tubo estéril rotulado con el número de muestra. Una alícuota de este sobrenadante se procesó para RT-PCR y el resto se congeló a -80°C para posteriores estudios.

Cribado de virus gripales

- El vial sin medio se lava dos veces con tampón PBS pH 7,2 aspirando con pipeta Pasteur todo el PBS tras cada lavado.
- Se fija 10 min a -20°C con 2mL de acetona fría, tras lo cual se lava ligeramente con PBS pH 7,2.
- Los cubreobjetos con la monocapa celular se extraen de cada vial y, una vez secos, se pegan sobre portaobjetos con DPX (pegamento) (Aldrich Chemical Co. Dorset, Inglaterra).
- Se añaden 25 μ L del reactivo de fluorescencia, que consisten en una mezcla de anticuerpos monoclonales específicos frente a los virus de la gripe A y B (**A+B MIX, ANEXO I**).
- Los portaobjetos se incuban en cámara oscura y húmeda a 37°C durante 15 min.
- Tras la incubación se lavan con PBS pH 7,2 durante 5 min en agitación suave y posteriormente se dejan secar (**figura III.5**).
- Se añade medio de montaje (glicerina tamponada), se le coloca un cubreobjetos encima y se observan en microscopio de fluorescencia (Leica

DMLB) con objetivo de 40X para detectar células con patrón típico de fluorescencia (verdes).

Figura III.5. Preparación IFD. Fluorescencia virus de la gripe



Tipado de virus gripales

En caso de que la fluorescencia fuera positiva, se realizaba IFD como se describe anteriormente a cada uno de los dos viales restantes, en este caso añadiendo anticuerpo monoclonal frente a virus de la gripe A a uno de los cristales con la monocapa infectada y frente a gripe B al otro, con el reactivo IMAGEN Influenza virus A y B (Dako Diagnostics Ltd., Cambrigeshire, UK)

III.4.1.3.B. RT-PCR

Se realizó amplificación del genoma de virus gripales A y B mediante RT-PCR previa extracción de los ácidos nucleicos a partir de 140µL de sobrenadante del SV. La técnica molecular se describe en el siguiente apartado.

III.4.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Tanto a partir de muestras como a partir de sobrenadante de SV, la técnica molecular empleada para el diagnóstico de virus gripales fue una RT-nested-PCR múltiple: amplifica y detecta simultáneamente y en el mismo tubo virus gripe A subtipo H1 (AH1), gripe A subtipo H3 (AH3) y gripe B.

La RT nested-PCR múltiple se basa en la técnica descrita por Stockton y cols. (**Stockton y cols, 1998**), con algunas modificaciones. Amplifica un fragmento de la región HA1 del gen de la hemaglutinina de los virus de la gripe A y B. Previamente el ARN de partida se convierte en ADNc mediante un paso de reversotranscripción (RT) utilizando cebadores “random” para conseguir la síntesis de la cadena de ADN complementaria completa del virus. Posteriormente, en una primera PCR se incluyen 3 sets de cebadores para cada uno de los tipos y subtipos a detectar (AH1, AH3 y B). La 2ª PCR o PCR-nested incluye otros 3 sets de cebadores internos, cada uno de los cuales amplifica una región más pequeña del producto de la primera amplificación. Con esta 2ª PCR se consigue aumentar la sensibilidad y especificidad de la técnica.

Realización de la técnica

Esta técnica conlleva los siguientes pasos: extracción del ARN, reversotranscripción (conversión en ADNc), amplificación del ADNc mediante PCR-nested y lectura de los resultados.

III.4.2.1. EXTRACCIÓN DEL ARN

Para la extracción de ARN se utilizó el kit comercial: QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). Este método de extracción está basado en la capacidad de las membranas de sílica gel de unir selectivamente ARN, junto con la velocidad de centrifugación. La lisis de la muestra se realiza bajo condiciones desnaturizantes para inactivar las ribonucleasas. Para aumentar el rendimiento de extracción de ARN, el buffer de lisis incluye además “carrier ARN”.

La técnica de extracción del ARN se realiza de la siguiente manera (**figura III.6**):

- A 140µL de muestra o sobrenadante de cultivo se le añaden 560µL de tampón de lisis AVL previamente reconstituido con “carrier ARN”, se agita 15 seg en vortex y se incuba 10 min a temperatura ambiente. Tras este periodo se da un pulso en la microcentrífuga.
- Se añaden 560µL de etanol absoluto a cada tubo. Se agita nuevamente en vortex (10 seg) y se da un pulso en la microcentrífuga.

- Se transfiere la solución anterior a las columnas Qiagen en dos pasos: primero se transfieren 630 μ L y se centrifuga a 8.000 rpm durante 45 seg, y tras descartar el líquido eluido, se transfiere el resto de la solución. Se vuelve a centrifugar a 8000 rpm, 45 seg.

- Cambiando de tubo colector, se añaden 500 μ L de buffer de lavado Wash Buffer 1 (AW1) y se centrifuga a 8.000 rpm durante 1 min.

- Se cambia de nuevo el tubo colector y se añaden 500 μ L buffer de lavado Wash Buffer 2 (AW2), centrifugando en esta ocasión a 14.000 rpm durante 3 min. Cambiando de tubo colector, se vuelve a centrifugar durante 1 min más para eliminar todo el etanol que hubiera podido quedar en la columna.

Figura III.6. Extracción ARN



-Se introduce la columna en un tubo microcentrífuga de 1,5mL previamente rotulado con el número de muestra o control y se añaden 60 μ L de tampón de elución AVE. Se incuba la columna 1 min a temperatura ambiente y se centrifuga 1 min a 8.000 rpm.

- El líquido eluido de las columnas, contiene el ARN del virus.

El ARN extraído se conservó a 4°C si se iba a utilizar en las siguientes horas, o a -80°C si se iba a utilizar en días posteriores.

Para cada tanda de RT-PCR se incluyeron un control negativo (agua estéril) y control positivo (virus gripal tipos H1, H3 o B) desde la extracción.

III.4.2.2.- REVERSOTRANSCRIPCIÓN (RT)

La síntesis de ADNc a partir del ARN extraído, se llevó a cabo con 22µL del extracto de las muestras o controles al que se añadieron 18µL de la mezcla de reacción que contenía:

Agua libre de ribonucleasas	2µL
Reverse Transcription 10x Buffer	4µL
MgCl ₂ 25 mM	6,5µL
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 10 mM cada uno)	4µL
pdN6 (cebador random, 100 ng/µL)	0,5µL
Rnasin (inhibidor de las ribonucleasas)	0,5µL
AMV Reverse Transcriptase (24 U/µL)	0,5µL

Los reactivos de RT están incluidos en el kit Reverse transcriptase System A-3500 (Promega)

El proceso de RT se llevó a cabo en un termociclador PE 9600 aplicando el siguiente programa: 37°C / 1 h seguido de 95°C / 5 min.

III.4.2.3. PCR-NESTED

PRIMERA PCR

A 10 µL del producto de la RT, se le añadieron 40 µL de una mezcla de reacción que contenía:

Agua	31,7µL
Buffer PCR 10x	5µL
MgCl ₂ 25 mM	4µL
Cebador AH1 A (10 µM)	1µL
Cebador AH1 FII(10 µM)	1µL
Cebador AH3 A(10 µM)	1µL
Cebador AH3 DII(10 µM)	1µL

Cebador BHA A(10 μ M)	1 μ L
Cebador BHA DII(10 μ M)	1 μ L
Taq DNA polimerasa (5 U/ μ L)	0,3 μ L

Esta primera PCR se programó en el termociclador (9600) con el siguiente programa: 3min/95°C + 35ciclos-1min/94°C + 1min/50°C, 1min/72°C + 10min/72°C + 4°C/ ∞ .

Los cebadores empleados para esta primera PCR fueron:

AH1 A	5' CAGATGCAGACACAATATGT 3'
AH1 FII	5' AAACCGGCAATGGCTCCAAA 3'
AH3 A	5' CAGATTGAAGTGACTAATGC 3'
AH3 DII	5' GTTTCTCTGGTACATTCCGC 3'
BHA A	5' GTGACTGGTGTGATACCACT 3'
BHA DII	5' TGTTTTTCACCCATATTGGGC 3'

SEGUNDA PCR

A 2 μ L del producto de la primera PCR, se añadieron 48 μ L de una mezcla de reacción que contenía:

Agua	31,7 μ L
Buffer PCR 10X	5 μ L
MgCl ₂ 25mM	4 μ L
Cebador AH1 B (25 μ M)	1 μ L
Cebador AH1 EII (25 μ M)	1 μ L
Cebador AH3 B (25 μ M)	1 μ L
Cebador AH3 CII (25 μ M)	1 μ L
Cebador BHA B (25 μ M)	1 μ L
Cebador BHA CII (25 μ M)	1 μ L
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 10 mM cada uno)	1 μ L
Taq polimerasa (5 U/ μ L)	0,3 μ L

Esta segunda PCR se programó en el termociclador con el siguiente programa: 94°C/5min + 35ciclos 1min/93°C + 1min/55°C + 1min/72°C y extensión final 10min/72°C.

Los cebadores empleados para esta segunda PCR fueron:

- AH1-B: ATAGGCTACCATGCGAACAA
- AH1-EII: CTTAGTCCTGTAACCATCCT
- AH3-B: AGCAAAGCTTTCAGCAACTG
- AH3-CII: GCTTCCATTTGGAGTGATGC
- BHA-B: CATTTTGCAAATCTCAAAGC
- BHA-CII: TGGAGGCAATCTGCTTCACC

III.4.2.4. DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

La detección de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% preparado en tampón TBE 1X (**TBE, ANEXO I**), con 0,5µg/mL de bromuro de etidio.

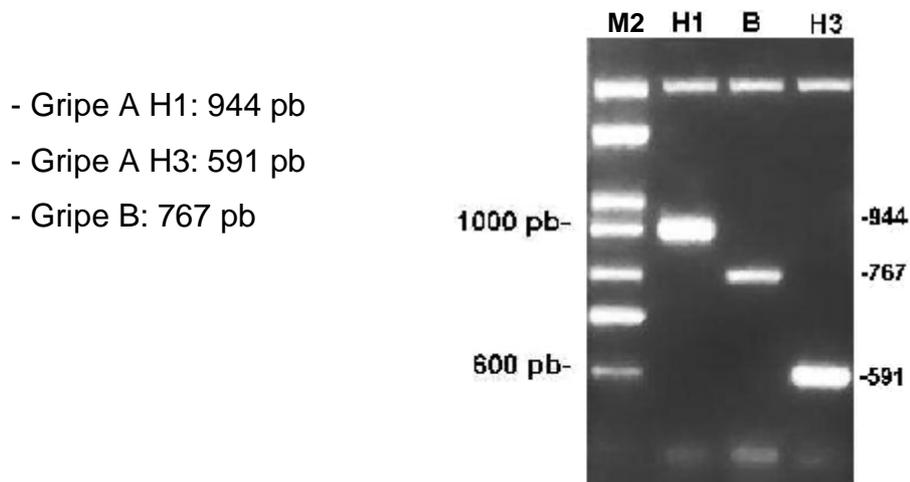
Al tubo de reacción de la nested PCR se le añaden 5µL de azul de bromofenol. De esta mezcla se cargan 10µL por pocillo.

En cada electroforesis se incluyeron dos marcadores de pesos moleculares: Marcador 1 (M1), que estaba constituido por una mezcla de amplificados de gripe A H1, gripe A H3 y gripe B; y Marcador 2 (M2), marcador comercial (DNA Molecular Weight Marker VI, Roche Applied Science), cuyo rango de tamaños de bandas oscila entre 150 y 2100 pb.

La electroforesis se llevó a cabo con una fuente de alimentación BioRad, a 110 V durante 30-45 min. La visualización de las bandas se hace bajo luz ultravioleta en transiluminador.

El tamaño esperado de las bandas para cada tipo y subtipo de virus de la gripe es el siguiente (**Figura III.7**).

Figura III.7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de amplificación de la RT-PCR para virus de la gripe



III.4.2.5. PRECAUCIONES PARA TRABAJAR LA TÉCNICA PCR

A la hora de trabajar con ARN, hay que tener en cuenta que las ribonucleasas pueden inhibir la reacción; por tanto, es recomendable utilizar siempre guantes a fin de no contaminar con RNAsas de las manos la muestra, trabajar con material autoclavado y soluciones preparadas con agua libre de ribonucleasas.

Se siguieron las recomendaciones de Kwok e Higuchi (1989) para minimizar la producción de resultados falsos positivos:

- Todo el material a utilizar era previamente autoclavado.
- Los distintos pasos se realizaron en áreas diferentes: área de preparación de reactivos, área de extracción de muestras y preparación de RT y 1ª PCR, área de preparación de 2ª PCR o PCR-nested, y área de detección.
- Cada área tenía su material específico: guantes, pipetas, material fungible, batas, protocolos, etc.
- Se alicuotaron los reactivos para evitar el uso excesivo de un solo tubo de reactivo.
- Cambio frecuente de guantes.
- Se utilizaron siempre puntas de pipeta con filtro.

- Los reactivos se prepararon previamente en una mezcla y se repartió en tubos de PCR en el área de preparación de reactivos, y posteriormente se añadió el ARN o ADN de muestras y controles en su área correspondiente.

- Se incluyeron controles negativos en todas las reacciones.

III.4.2.6. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS AISLADOS

La caracterización genética de los virus gripales circulantes en Andalucía durante las temporadas de estudio se realizó con una muestra representativa de los aislados obtenidos. Estos aislados se enviaron en condiciones de bioseguridad para su caracterización al Laboratorio de Referencia de Gripe en España, en el Centro Nacional de Microbiología (CNM, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid).

El estudio genético se basó fundamentalmente en la secuenciación de un fragmento del gen de la hemaglutinina viral obtenido mediante RT-PCR (protocolos propios del CNM) y posterior análisis filogenético de las secuencias y comparación con las secuencias correspondientes disponibles en GenBank.

Tras ello, el CNM nos proporcionó el informe de resultados en cuanto a similitud con cepas circulantes en Europa y en el mundo en el periodo de estudio, así como los árboles filogenéticos obtenidos tras el análisis de las secuencias.

III.5. ANÁLISIS DE DATOS

A partir del programa estadístico SPSS 15.0 para Windows se ha realizado el siguiente análisis:

Análisis descriptivo de las muestras del estudio

Se ha calculado rango, mediana y percentiles 25 y 75 para la única variable numérica estudiada, la edad, y frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas. El análisis descriptivo de los datos demográficos se ha hecho segmentando la muestra por la variable temporada (2004-2005, 2005-2006).

Análisis bivalente para estudiar las posibles relaciones entre variables

La variable numérica “edad” se categorizó en 4 grupos. El estadístico al uso ha sido la Chi-cuadrado. Cuando las variables a relacionar daban tablas de más de 2x2 se han calculado los residuos tipificados corregidos para estudiar entre qué grupos se daban las diferencias estadísticamente significativas (esto cuando el test de la Chi-cuadrado asumía que globalmente existían diferencias estadísticamente significativas). Los residuos tipificados nos indican que entre dos grupos existen diferencias cuando el valor que nos muestra está fuera del intervalo [-3, 3].

También se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, y los valores de Odds ratio con sus correspondientes intervalos de confianza del 95% de cada parámetro clínico.

Para el cálculo de la sensibilidad de las 3 técnicas, se asumió como total de muestras positivas aquéllas obtenidas por cualquiera de los métodos, dado que tanto un resultado positivo de cultivo como de RT-PCR son diagnósticos de gripe.

A partir de tablas 2x2 se han calculado sensibilidades y especificidades de distintas técnicas. Se han realizado combinaciones de 2 para quedarnos con la que mejores valores de sensibilidad y especificidad diese.

De la misma manera se ha estudiado la posible concordancia entre técnicas a partir del índice Kappa. Este es un índice que va de 0 a 1 y, en nuestro caso, se ha interpretado el coeficiente a partir de la siguiente tabla (**tabla III.2**):

Tabla III.2. Valoración del índice Kappa

Valor de k	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena

Un resultado de $p < 0,05$ en el análisis de los datos fue considerado estadísticamente significativo.

ANEXO I

Medio de transporte para virus

- Albúmina bovina: 5g
- Gentamicina 40 mg/mL: 0,5mL
- Vancomicina 50mg/mL: 0,5mL
- Anfotericina B 250 µg/mL: 5mL
- MEM (minimum essential medium Eagle. SIGMA) 0%: 500mL

Mezcla antibiótica para descontaminación de las muestras

- Gentamicina 40 mg/mL: 10mL
- Vancomicina 50 mg/mL: 10mL
- Anfotericina B 250 µg/mL: 10mL
- Agua bidestilada: 70mL

Se filtró todo con filtro Millipore de 0,22µm en contenedor estéril.

Medio de inoculación

- TPCK-Tripsina 0,1 mg/mL: 1 mL
- Glutamina 30 mg/mL: 1 mL
- Gentamicina 40mg/mL: 100µL
- Vancomicina 50 mg/mL: 0,5mL
- Anfotericina B 250 µg/mL: 1 mL
- MEM c.s.p.: 100mL

MEM 0%

Para 500mL de medio:

- MEM: 4,8g
- HEPES 1M: 10mL
- CO₃HNa: 5mL
- Glutamina 30 mg/mL: 1 mL
- Vancomicina 50mg/mL: 0,5mL
- Gentamicina 40mg/mL: 0,5mL
- Anfotericina B 0,25mg/mL: 5mL

- Agua c.s.p. 500mL

MEM 1%

-MEM 0%: 500mL

-Suero fetal bovino: 5mL

MEM 10%

-MEM 0%: 500mL

-Suero fetal bovino: 50mL

SOLUCIÓN DE DISGREGACION DE CÉLULAS

SOLUCIÓN EDTA

EDTA.....0,40 g

PBS pH=7.5 c.s.p.....1000mL

SOLUCIÓN TRIPSINA

Tripsina.....2,5g

PBS pH=7.5 c.s.p.....1000mL

Mezclar ambas soluciones y repartir en frascos de cristal a razón de 100ml por frasco. Congelar a -20°C hasta su uso.

Para usar descongelar, calentar a 37°C y FILTRAR por filtro de 0,22µm.

TAMPÓN DE CARGA DE ELECTROFORESIS 10X

Bromofenol blue..... 0,4%..... 40mg

Xylencianol..... 0,4%..... 40mg

Glicerol..... 5mL

H₂O..... 5mL

TBE 10X

TRIS base: 54g

Ácido bórico: 27,5g

EDTA: 9,3 g 10mL

Agua destilada c.s.p.: 500mL

A + B MIX

Mezcla de reactivos con anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluoresceína frente a gripe A y B.

Reactivo: IMAGEN Influenza virus A y B (Dako Diagnostics Ltd., Cambridgeshire, UK).

Para obtener la mezcla de screening de gripe, se mezcló a partes iguales ambas soluciones con anticuerpos monoclonales de gripe A y B y se concentró mediante sistema de vacío (Girovap) durante 2 h.

RESULTADOS

IV.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

IV.1.1. PROCEDENCIA

Durante las temporadas 2004-2005 y 2005-2006 se procesaron para estudio de gripe muestras de exudados nasales y faríngeos de 566 pacientes, 300 en la temporada 2004-2005 y 266 en la temporada 2005-2006. Se recibieron muestras de 24 Centros de Salud en la temporada 2004-2005 y de 18 Centros de Salud en la temporada 2005-2006 (**tabla IV.1**).

La distribución temporal de las muestras recibidas se refleja en la **figura IV.1**. Se observa que mientras que en la temporada 2004-2005 hubo un incremento notable en el número de muestras enviadas durante las semanas 2 a 7 de 2005, en la temporada 2005-2006 el envío fue más regular, sin existir un aumento claro en ningún periodo.

Figura IV.1. Distribución temporal de muestras recibidas

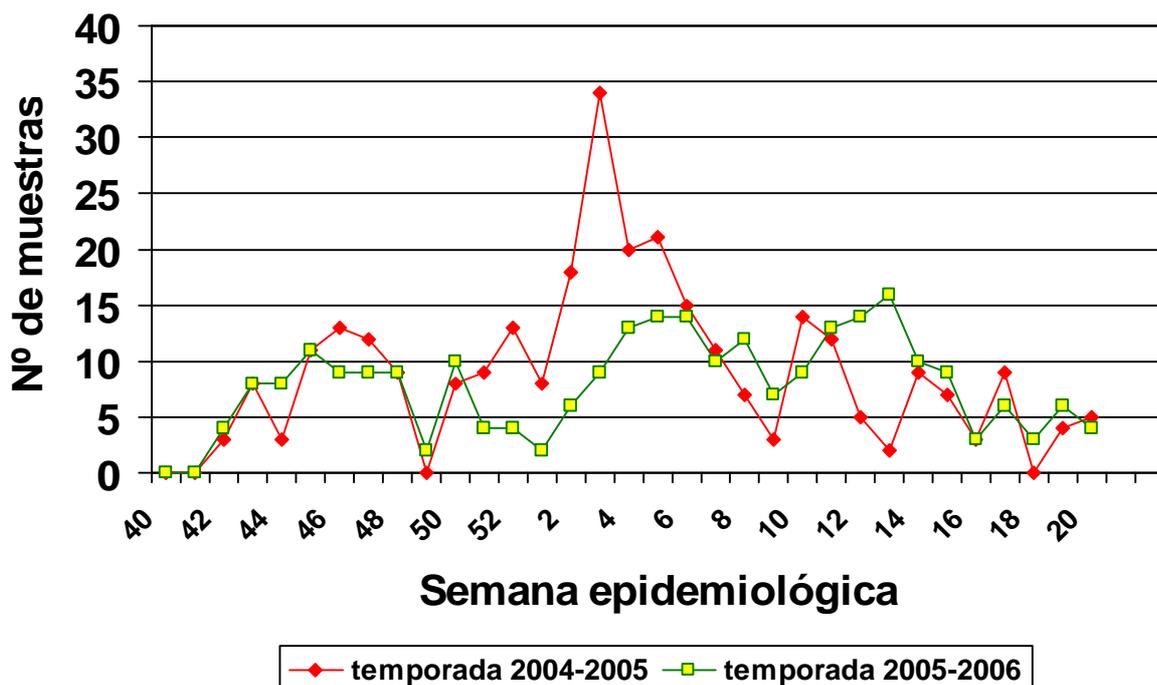


Tabla IV.1. Procedencia geográfica de los 566 pacientes

CENTRO	PROVINCIA	[N (%)]		
		Total	2004-2005	2005-2006
Pechina	Almería	28 (4,9)	20 (6,6)	8 (3,0)
Virgen del Mar	Almería	207 (36,6)	98 (32,6)	109 (41,0)
S. Martín del Tesorillo	Cádiz	12 (2,1)	12 (4,0)	-
Sanlúcar Barrio Alto	Cádiz	9 (1,6)	9 (3,0)	-
Jérez-San Telmo	Cádiz	14 (2,5)	10 (3,3)	4 (1,5)
San Fernando	Cádiz	6 (1,0)	2 (0,6)	4 (1,5)
Conil	Cádiz	2 (0,3)	1 (0,3)	1 (0,4)
Chana	Granada	19 (3,3)	10 (3,3)	9 (3,4)
Zaidín	Granada	108 (19,1)	59 (19,6)	49 (18,4)
Valverde	Huelva	10 (1,7)	10 (3,3)	-
Cartaya	Huelva	3 (0,5)	1 (0,3)	2 (0,7)
Peal de Becerro	Jaén	16 (2,8)	10(3,3)	6 (2,2)
Alcaudete	Jaén	10 (1,7)	7(2,3)	3 (1,1)
Cártama	Málaga	15 (2,6)	10(3,3)	5 (1,9)
Trinidad Jesús-Cautivo	Málaga	8 (1,4)	4(1,3)	4 (1,5)
Arahal	Sevilla	3 (0,5)	3(1,0)	-
Fuensanta	Sevilla	33 (5,8)	13(4,3)	20 (7,5)
Priego de Córdoba	Córdoba	1 (0,2)	1(0,3)	-
Montemar	Cádiz	4 (0,7)	2(0,6)	2 (0,7)
Barrio Bajo	Cádiz	28 (4,9)	-	28 (10,5)
El Torrejón	Huelva	2 (0,3)	-	2 (0,7)
El Viso	Sevilla	6 (1,0)	-	6 (2,2)
Adra	Almería	4 (0,7)	-	4 (1,5)
Levante Norte	Córdoba	18 (3,2)	18(6,0)	-
TOTAL		566 (100)	300	266

IV.1.2. DATOS DEMOGRÁFICOS

IV.1.2.1. EDAD DE LOS PACIENTES

Las **edades** de los pacientes estaban comprendidas entre los 2 meses y los 96 años [mediana: 7 años (percentil 25= 3, percentil 75= 22)].

Para estudios posteriores, la población fue clasificada en cuatro grupos de edad, que fueron los siguientes: <15 años, 15-49 años, entre 50-65 años y >65 años.

Tanto en la temporada 2004-2005 como en la 2005-2006, se observa que el mayor porcentaje de muestras se obtuvo en el grupo de edad de <15 años ($p < 0,001$) (tabla IV.2).

Tabla IV.2. Distribución de los pacientes por grupos de edad

TEMPORADA	EDAD (años) [N (%)]*				TOTAL
	<15	15-49	50-65	>65	
2004-2005	184 (61,3)	80 (26,6)	16 (5,3)	20 (6,6)	300
2005-2006	204 (76,7)	47 (17,6)	10 (3,76)	5 (1,88)	266
TOTAL	388 (68,5)	127 (22,4)	26 (4,6)	25 (4,4)	566

* % de pacientes estudiados por temporada

IV.1.2.2. SEXO DE LOS PACIENTES

Con respecto al **sexo** de los pacientes, no hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las dos temporadas ($p = 0,317$) (tabla IV.3).

Tabla IV.3. Distribución de los pacientes por grupos de edad

SEXO [N(%)]		
Mujer	Hombre	TOTAL
134 (44,6)	166 (55,3)	300
130 (48,9)	136 (51,1)	266
264 (46,6)	302 (53,3)	566

Asimismo, se analizó la distribución de los pacientes por sexo entre los 4 grupos de edad descritos previamente (**tabla IV.4**), y no se encontraron diferencias significativas ($p= 0,152$).

Tabla IV.4. Distribución de los pacientes por sexo y grupos de edad

Sexo	Grupos de edad (años) [N(%)]				Total
	<15	15-49	50-65	>65	
Mujeres	169 (43,6)	70 (55,1)	13 (50)	12 (48)	264
Hombres	219 (56,4)	57 (44,9)	13 (50)	13 (52)	302

% por grupos de edad

IV.1.3. DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLOGICOS

Los principales datos clínicos y epidemiológicos recogidos de los 566 pacientes estudiados se muestran en la **tabla IV.5**.

Los síntomas más frecuentes fueron fiebre (90,1%), tos (85,7%) y rinorrea (78,3%). Sólo el 11,3% de los pacientes estaban vacunados frente a virus de la gripe y sólo el 37,6% presentaban clínica de gripe típica.

Tabla IV.5. Datos clínico-epidemiológicos de los pacientes

Datos	N	(%)
Fiebre >38,5°C	510	90,1
Tos	485	85,7
Rinorrea	443	78,3
Odinofagia	387	68,4
S.G.I.	113	20
Antibióticos	77	13,6
Vacunación	64	11,3
CGT	213	37,6

SGL: síntomas gastrointestinales; CGT: clínica gripe típica

IV.1.3.1. DATOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS POR GRUPOS DE EDAD

La distribución de los datos clínicos y epidemiológicos recogidos de cada paciente con respecto a los grupos de edad establecidos se resume en la **tabla IV.6**.

De forma significativa, la vacunación se dio preferentemente en el grupo de edad de mayores de 65 años (64%, $p < 0,001$), y fue significativamente bajo en la edad pediátrica (8,5%).

Con respecto a los síntomas, se demostraron diferencias por grupos de edad para la *odinofagia* ($p < 0,001$), *síntomas gastrointestinales* ($p < 0,05$) y *CGT* ($p < 0,001$).

El análisis de los residuos tipificados en el caso del estudio de *odinofagia*, nos permite demostrar que la significación estadística se cumple para los grupos de edad < 15 y 15-49. El porcentaje de pacientes con *odinofagia* es significativamente menor en la edad pediátrica, y significativamente elevado en el grupo de edad de 15-49 años.

Los *síntomas gastrointestinales* se dieron con mayor frecuencia en los menores de 50 años, destacando el escaso número de pacientes con este síntoma en el grupo de edad de 50 a 65 años, aunque el análisis de los residuos tipificados no mostró significación en ninguno de los grupos.

Al igual que ocurre con la *odinofagia*, la frecuencia de *CGT* por grupos de edad demostró que ésta fue significativamente menor en la edad pediátrica (27%), y significativamente elevada en el grupo de edad de 15-49 años (70%).

Si bien la sintomatología en general fue más manifiesta cuanto menor era la edad de los pacientes, a excepción de la *odinofagia*, la prescripción de antibióticos por el contrario aumentó de forma directa con la edad; de un 13,4% en < 15 años a un 20% en mayores de 65 años, aunque estas diferencias no fueron significativas.

Tabla IV.6. Datos clínicos y epidemiológicos respecto a los grupos de edad

Datos clínico- epidemiológicos	Grupos de edad (años) [N (%)]				TOTAL n=566	p
	<15 n=388	15-49 n=127	50-65 n=26	>65 n=25		
VACUNACIÓN	33 (8,5)	9 (7,1)	6 (23)	16 (64)	64 (11,3)	< 0,001
FIEBRE	354 (91,2)	115 (90,6)	21 (80,7)	20(80)	510 (90,1)	0,112
RINORREA	314 (80,9)	95 (74,8)	17 (65,4)	17 (68)	443 (78,2)	0,086
TOS	342 (88,1)	102 (80,3)	21 (80,8)	20 (80)	485 (85,7)	0,108
ODINOFAGIA	241 (62,1)	107 (84,3)	23 (88,5)	16 (64)	387 (68,4)	< 0,001
SGI*	78 (20,1)	32 (25,2)	1 (3,8)	2 (8)	113(19,9)	0,034
ANTIBIÓTICOS	52 (13,4)	16 (12,6)	4 (15,4)	5 (20)	77 (13,6)	0,786
CGT**	104 (26,8)	85 (66,9)	11 (42,3)	13 (52)	213 (37,6)	< 0,001

*SGI: síntomas gastrointestinales; **CGT: clínica típica de gripe

IV.1.3.2. DATOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS POR SEXO

La frecuencia de aparición de síntomas y otros datos clínico-epidemiológicos analizados por sexo no mostró diferencias significativas (tabla IV.7).

Tabla IV.7. Datos clínicos y epidemiológicos respecto al sexo

Datos clínico-epidemiológicos	MUJERES*	HOMBRES *	p
VACUNACIÓN	32 (12,1)	32 (10,6)	0,596
FIEBRE	242 (91,7)	268 (88,7)	0,262
RINORREA	208 (78,8)	235 (77,8)	0,838
TOS	229 (86,7)	256 (84,8)	0,548
ODINOFAGIA	185 (70,1)	202 (66,9)	0,469
SGI	61 (23,1)	52 (17,2)	0,092
ANTIBIÓTICOS	34 (12,9)	43 (14,2)	0,713
CGT	106 (40,2)	107 (35,4)	0,259

* N (%); SGI: síntomas gastrointestinales; CGT: clínica de gripe típica

IV.2. CARACTERÍSTICAS VIROLÓGICAS DE LOS AISLADOS

IV.2.1. DATOS GENERALES

En el conjunto de las dos temporadas, el virus de la gripe se detectó en 152 muestras de las 566 estudiadas (26,8%), 106 en la temporada 2004-2005 (69,7% de las positivas) y 46 en la temporada 2005-2006 (30,3% de las positivas) (**tabla IV.8**).

Tabla IV.8. Virus de la gripe detectados en las temporadas 2004-2005 y 2005-2006

Temporada	N	%	Total muestras
TEMPORADA 2004-2005	106	35,3*	300
TEMPORADA 2005-2006	46	17,3*	266
TOTALES	152	26,8	566

*% respecto al total de muestras de cada temporada

Todas las muestras de los pacientes incluidos en el estudio fueron tomadas dentro de los tres días siguientes al inicio de los síntomas. La media de los días de evolución del cuadro en el momento de la toma de la muestra fue de 1,75 días (desviación típica: 0,757).

IV.2.2. DISTRIBUCIÓN POR TIPOS Y SUBTIPOS DE LOS VIRUS DE LA GRIPE

De las 152 muestras positivas, 85 fueron gripe AH3 (55,9% con respecto al total de positivas), 24 gripe AH1 (15,7%) y 43 gripe B (28,2%) (**tabla IV.9**).

Tabla IV.9. Tipos y subtipos de gripe detectados

VIRUS	Subtipo	N (%)*
Gripe A	H1	24 (4,2)
	H3	85 (15)
	Total	109 (19,2)
Gripe B		43 (7,6)
TOTAL		152 (26,8)

*% respecto al total de muestras recibidas

En las **figuras IV.2 y IV.3** se muestra la distribución temporal por **TIPOS** de virus de la gripe. En las dos temporadas se detectaron tanto virus de la gripe A como B; pero si bien en la temporada 2004-2005 se observan dos ondas de incidencia separadas en el tiempo para cada uno de los tipos, en la temporada 2005-2006 existió un solapamiento en la circulación de los dos tipos. En la temporada 2004-2005 las primeras muestras con gripe se recogieron en la semana 48 de 2004 con un pico de incidencia de muestras positivas entre las semanas 1 y 5 de 2005, coincidiendo con el aumento de casos con gripe A; mientras que en la temporada 2005-2006, no se detectó virus de la gripe hasta la semana 5 de 2006, ni se observó un pico de incidencia claro.

Figura IV.2. Virus de la gripe detectados en temporada 2004-2005

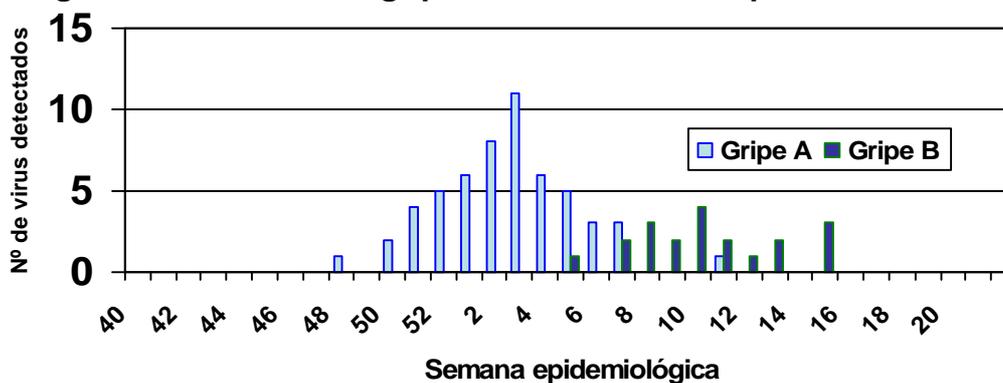
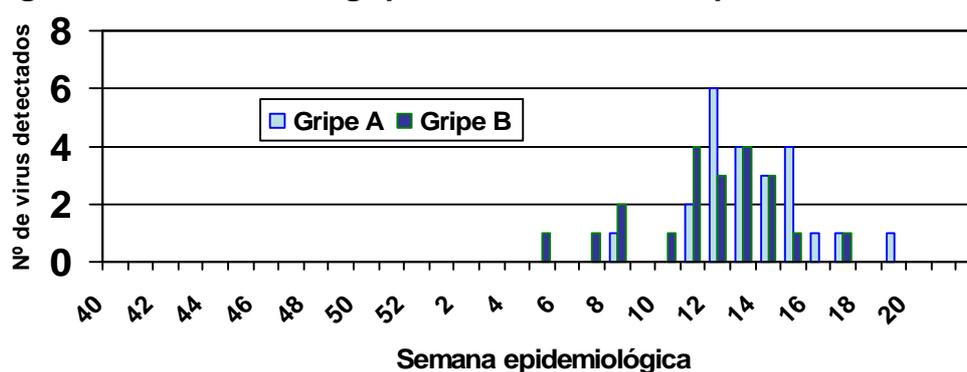


Figura IV.3. Virus de la gripe detectados en temporada 2005-2006



De los 106 virus de la gripe detectados en la temporada 2004-2005, la mayoría (80,2%) fueron gripe A; mientras que en la temporada 2005-2006 no hubo predominio de ningún tipo; de los 46 virus de la gripe detectados 24 (52,2%) fueron gripe A y 22 (47,8%) gripe B.

Cuando analizamos por **SUBTIPOS** los virus de la gripe A detectados según la temporada, se observa que en las dos temporadas circularon virus de la gripe A diferentes, en 2004-2005, todos fueron AH3, mientras que en 2005-2006 todos fueron AH1.

IV.2.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS AISLADOS

El *análisis filogenético* de los aislados representativos de las dos temporadas mostró que en 2004-2005 las cepas de gripe A de España agrupaban en un único cluster diferenciado de la cepa **A/Fujian/411/2002** (incluida en la vacuna para ese año), y las cepas de gripe B fueron similares a **B/Shanghai/361/2002** (linaje Yamagata). En la temporada 2005-2006, las cepas de gripe A fueron similares a **A/New Caledonia/20/99 (H1N1)**, y las cepas de gripe B fueron del linaje Victoria, similares a **B/Malaysia/2506/04** (figuras IV.4 y IV.5).

Figura IV.4. Análisis filogenético de aislados de gripe A

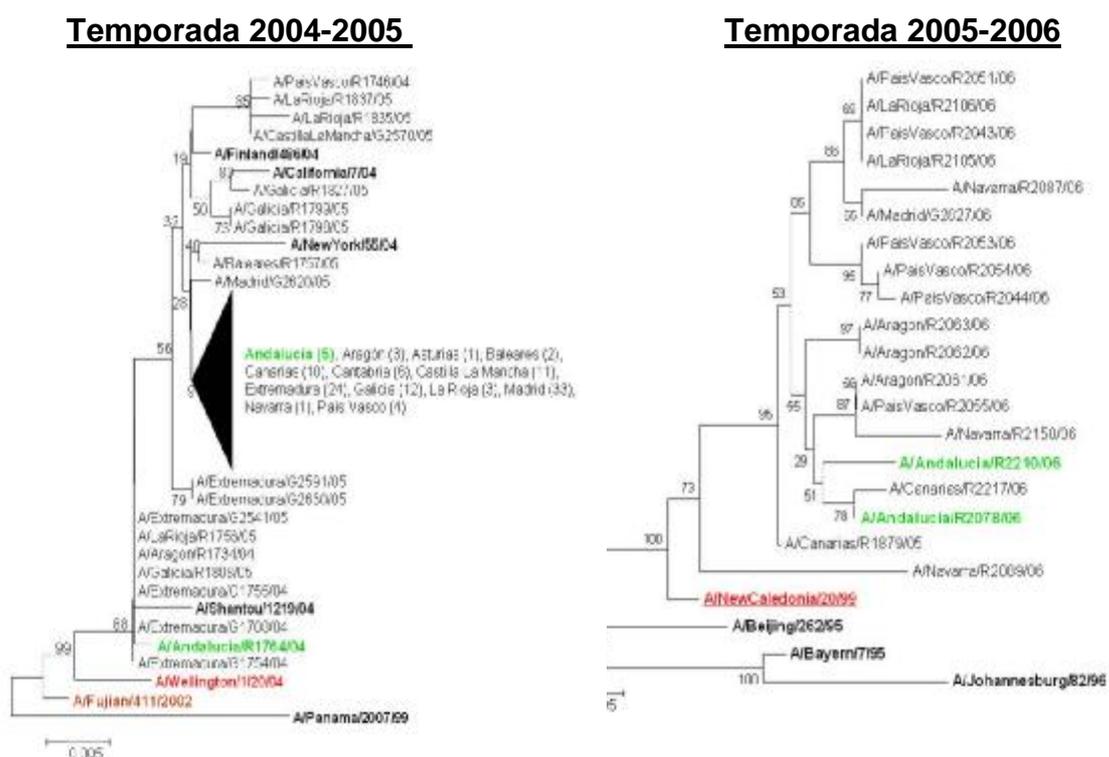
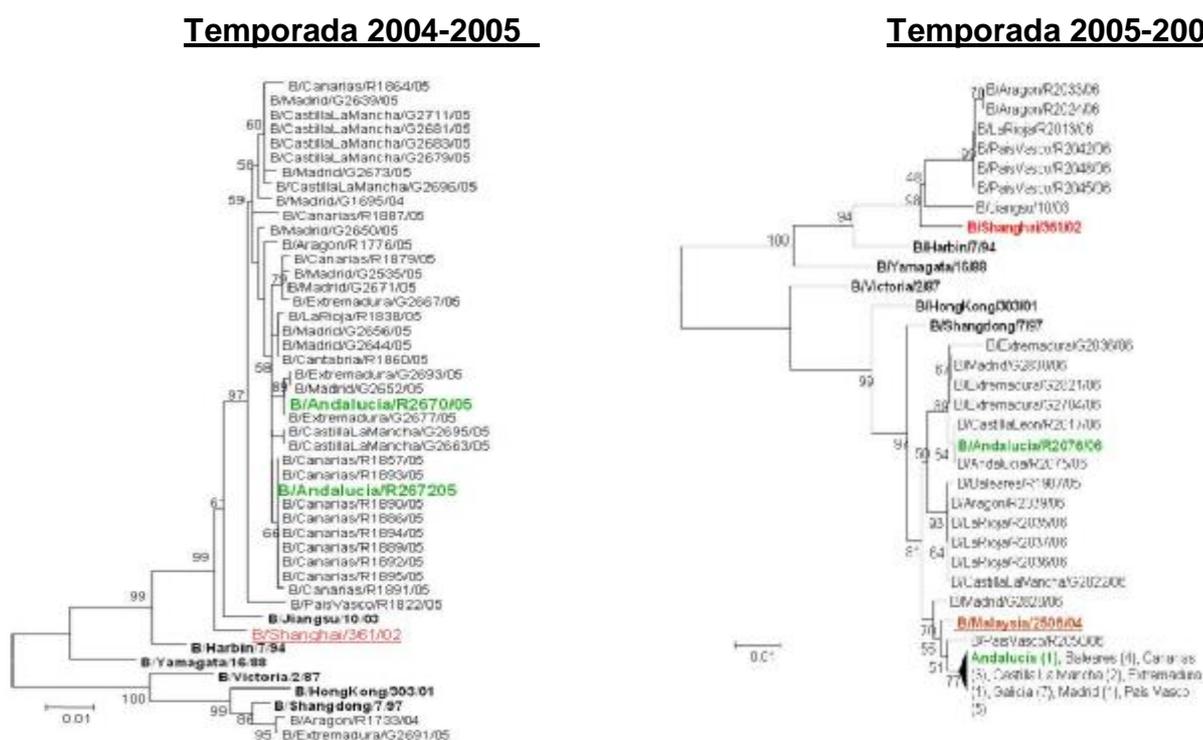


Figura IV.5. Análisis filogenético de aislados de gripe B



IV.3. EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

IV.3.1. RESULTADOS GLOBALES

En total, por el conjunto de las tres técnicas evaluadas se detectó virus de la gripe en 152 muestras (26,8%). La distribución de positivos por método y por temporada se muestra en la **tabla IV.10**. La técnica que se mostró más sensible fue SV-PCR (95,3%).

Tabla IV.10. Resultados positivos de virus de la gripe por cada método

TEMPORADA	N (%)			Total positivos
	MD	SV-IF	SV-PCR	
2004-2005	87 (82)	74 (69,8)	101 (95,2)	106
2005-2006	44 (95,6)	45 (97,8)	44 (95,6)	46
TOTAL	131 (86,1)	119 (78,2)	145 (95,3)	152

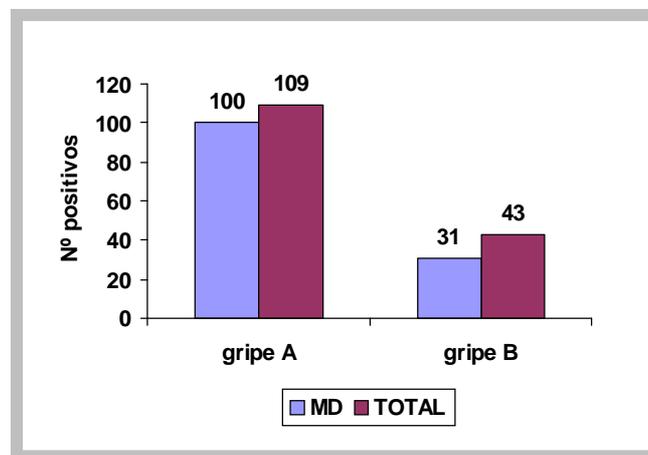
MD: PCR en muestra directa; SV-IF: Inmunofluorescencia directa sobre cultivo en Shell-vial; SV-PCR: PCR en sobrenadante de cultivo en Shell-vial

IV.3.2. EVALUACIÓN DE TÉCNICAS PARA CADA TIPO Y SUBTIPO DE GRIPE

IV.3.2.1. Método MD

Con el método MD se detectó virus de la gripe en 131 de las 152 positivas de las que 100 fueron gripe A (91,7% de las positivas a gripe A) y 31 gripe B (72% de las positivas a gripe B) (ver tabla IV.9) (**figura IV.6**).

Figura IV.6. Detección de los tipos de gripe mediante la técnica MD



Los resultados obtenidos con este método en la detección de los distintos **SUBTIPOS** de gripe A se muestran en la **tabla IV.11**. Sólo en un caso de gripe AH1, el método MD dio resultado negativo, mientras que la detección de gripe AH3 falló en 8 casos con este método.

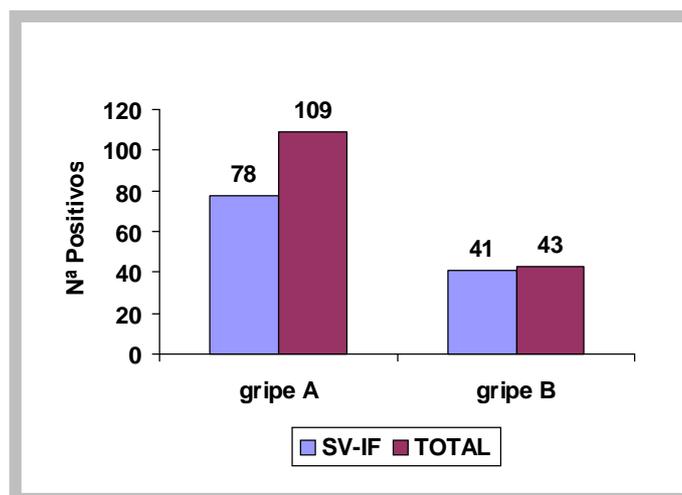
Tabla IV.11. Técnica MD en la detección de subtipos de gripe A

Subtipo gripe A	N (%)	Total Positivos
AH1	23 (95,8)	24
AH3	77 (90,6)	85
TOTAL	100 (91,7)	109

IV.3.2.2. Método SV-IF

Con el método de SV-IF se detectó virus de la gripe en 119 muestras de las 152 positivas (78,2%), de los que 78 fueron virus gripe A (71,5% de las 109 virus gripe A) y 41 virus gripe B (95,3% de las 43 gripe B) (ver tabla IV.9) (**figura IV.7**).

Figura IV.7. Detección de los tipos de gripe mediante la técnica SV-IF



Cuando analizamos los resultados obtenidos en la detección de **SUBTIPOS** de virus gripe A, se observa que en el caso de virus gripe AH3, con este método se detectaron 54 de las 85 positivas (63,5%) y todos los virus de la gripe AH1 fueron detectados por este método (**tabla IV.12**).

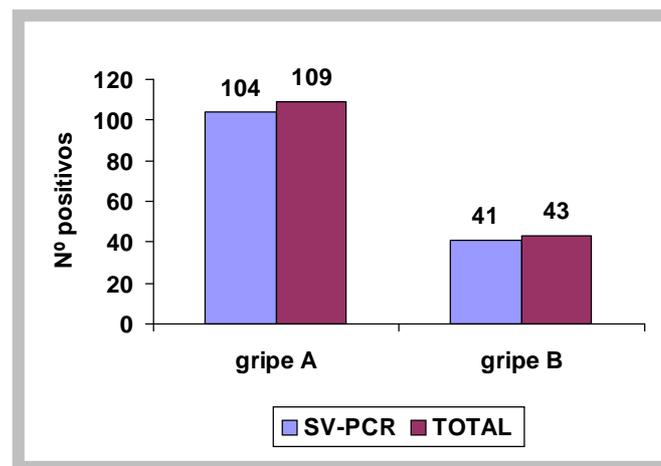
Tabla IV.12. Técnica SV-IF en la detección de subtipos de gripe A

Subtipo	N (%)	Total Positivos
AH1	24 (100)	24
AH3	54 (63,5)	85
TOTAL	78 (71,5)	109

IV.3.2.3. Método SV-PCR

Mediante esta técnica, se detectaron 145 positivos (95,3% del total de positivos), 104 fueron virus gripe A (95,4% del total de positivos de gripe A) y 41 fueron gripe B (95,3% del total de virus gripe B detectados) (**figura IV.8**).

Figura IV.8. Detección de los tipos de gripe mediante la técnica SV-PCR



Dentro de los virus de la gripe A detectados, mediante SV-PCR, se detectaron 81 de las 85 muestras positivas con AH3 (95,2%) y 23 de las 24 positivas con AH1 (95,8%) (**tabla IV.13**).

Tabla IV.13. Técnica SV-PCR en la detección de subtipos de gripe A

Subtipo	N (%)	Total Positivos
AH1	23 (95,8)	24
AH3	81 (95,2)	85
TOTAL	104 (95,4)	109

En conclusión, la mayor sensibilidad se obtuvo con SV-PCR. Con las técnicas SV-IF y MD, se obtuvieron resultados similares con gripe AH1, sin embargo SV-IF fue mejor en la detección de gripe B y MD en la detección de gripe AH3.

IV.3.3. CONCORDANCIA ENTRE LOS TRES MÉTODOS PARA DETECCIÓN DE GRIPE

En las tablas IV.14 a IV.16 se muestra la comparación y concordancia de resultados dos a dos entre los tres métodos para detección de gripe.

Tabla IV.14. Concordancia entre los métodos SV-PCR y MD

		<i>MD</i>	
		Positivo	Negativo
SV-PCR	Positivo	125	20
	Negativo	6	415

Kappa:0,876

Tabla IV.15. Concordancia entre los métodos SV-IF y MD

		<i>MD</i>	
		Positivo	Negativo
SV-IF	Positivo	104	15
	Negativo	27	420

Kappa: 0,785

Tabla IV.16. Concordancia entre los métodos SV-IF y SV-PCR

		<i>SV-PCR</i>	
		Positivo	Negativo
SV-IF	Positivo	118	1
	Negativo	27	420

Kappa: 0,862

Como se puede observar, la mayor concordancia se obtiene entre los métodos SV-PCR y MD. (tabla IV.14).

IV.3.3.1. CONCORDANCIA ENTRE LOS MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE GRIPE AH3

En las tablas IV.17 a IV.19, se muestra la comparación de resultados dos a dos entre los tres métodos para detección de gripe AH3. La mayor concordancia se obtiene de nuevo entre los métodos SV-PCR y MD. (tabla IV.17).

Tabla IV.17. Concordancia entre MD y SV-PCR en la detección de gripe AH3

		<i>MD</i>	
		Positivo	Negativo
SV-PCR	Positivo	73	8
	Negativo	4	481

Kappa: 0,912

Tabla IV.18. Concordancia entre MD y SV-IF en la detección de gripe AH3

		<i>MD</i>	
		Positivo	Negativo
SV-IF	Positivo	52	2
	Negativo	25	487

Kappa: 0,768

Tabla IV.19. Concordancia entre SV-PCR y SV-IF en la detección gripe AH3

		<i>SV-PCR</i>	
		Positivo	Negativo
SV-IF	Positivo	54	0
	Negativo	27	487

Kappa: 0,774

IV.3.3.2. CONCORDANCIA ENTRE LOS MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE GRIPE AH1

En las **tablas IV.20 a IV.22**, se muestran la comparación de resultados dos a dos entre los tres métodos para detección de gripe AH1.

La mayor concordancia se vuelve a obtener entre los métodos SV-PCR y MD (**tabla IV.20**), aunque fue muy alta para el resto de los métodos comparados dos a dos.

Tabla IV.20. Concordancia entre MD y SV-PCR en la detección de gripe AH1

		MD	
		Positivo	Negativo
SV-PCR	Positivo	23	0
	Negativo	0	543

Kappa: 1,000

Tabla IV.21. Concordancia entre MD y SV-IF en la detección de gripe AH1

		MD	
		Positivo	Negativo
SV-IF	Positivo	23	1
	Negativo	0	542

Kappa: 0,978

Tabla IV.22. Concordancia entre SV-PCR y SV-IF en la detección de gripe AH1

		SV-PCR	
		Positivo	Negativo
SV-IF	Positivo	23	1
	Negativo	0	542

Kappa: 0,978

IV.3.3.3 CONCORDANCIA ENTRE LOS MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE GRIPE B

En las **tablas IV.23 a IV.25**, se muestran la comparación de resultados dos a dos entre los tres métodos para detección de gripe B. La mayor concordancia en este caso se obtiene para los métodos SV-IF y SV-PCR (**tabla IV.25**).

Tabla IV.23. Concordancia entre MD y SV-PCR en la detección de gripe B

		<i>MD</i>	
		Positivo	Negativo
SV-PCR	Positivo	29	2
	Negativo	12	523

Kappa: 0,793

Tabla IV.24. Concordancia entre MD y SV-IF en la detección de gripe B

		<i>MD</i>	
		Positivo	Negativo
SV-IF	Positivo	29	12
	Negativo	2	523

Kappa: 0,793

Tabla IV.25. Concordancia entre SV-IF y SV-PCR en la detección de gripe B

		SV-PCR	
		Positivo	Negativo
SV-IF	Positivo	41	0
	Negativo	0	525

Kappa: 1,000

IV.4. RELACIÓN ENTRE LOS DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS DEL SÍNDROME GRIPAL Y LOS RESULTADOS VIROLÓGICOS

IV.4.1. RELACIÓN ENTRE GRIPE Y EDAD, SEXO Y ESTADO VACUNAL

Se encontraron diferencias significativas en el nº de casos de gripe por grupos de edad. El análisis de comparación de los resultados por grupos de edad dos a dos (residuos tipificados) demostró que esta significación se daba en los grupos de edad <15 años, en los que el porcentaje de positivos fue menor, y en el grupo de edad de 15 a 49 años, en el que este porcentaje fue mayor con respecto al resto.

No se encontraron diferencias significativas en los casos de gripe por sexo ni en función del estado vacunal de los sujetos, aunque se observa un porcentaje mayor (tabla IV.26).

Tabla IV.26. Relación entre gripe y edad, sexo y estado vacunal

EDAD (años)	POSITIVOS [n (%)]*	TOTAL	<P
<15	88 (22,7)	388	0,005
15-49	49 (38,6)	127	
50-65	7 (26,9)	26	
>65	8 (32)	25	
SEXO			
Mujer	70 (26,5)	264	0,865
Hombre	82 (27,2)	302	
ESTADO VACUNAL			
VACUNADO	22 (34,4)	64	0,150
NO VACUNADO	130 (25,9)	502	

*% respecto al total de cada categoría

IV.4.2. RELACIÓN ENTRE GRIPE Y DATOS CLÍNICOS

Se analizó la presencia o ausencia de síntomas clínicos y otros datos como la administración de antibióticos en los casos confirmados de gripe. No se demostró una relación directa entre gripe confirmada y presencia de un determinado síntoma o dato clínico, excepto para la fiebre y la CGT. Casi la mitad de los pacientes con CGT tenían gripe, frente a sólo un 16% con gripe y sin este dato clínico. En el caso de la fiebre, este resultado no es analizable ya que uno de los criterios de inclusión para la toma de muestra para investigación de virus de la gripe dentro de la campaña de vigilancia era la presencia de fiebre. Por tanto, casi todos los pacientes con estudio virológico tienen este signo clínico. No obstante, se enviaron muestras de 56 pacientes sin fiebre y en 5 de ellos se detecta virus de la gripe (**tabla IV.27**).

Tabla IV.27. Correlación entre casos confirmados de gripe y clínica

	N (%) [*]		p
	SI	NO	
Fiebre >38,5°C	147/510	5/56	0,001
Tos	135/485	17/81	0,198
Rinorrea	121/443	31/123	0,640
Odinofagia	106/387	46/179	0,673
S.G.I.	31/113	121/453	0,877
Antibióticos	15/77	137/489	0,116
CGT	94/213	58/353	<0,0001

S.G.I, síntomas gastrointestinales; CGT, clínica de gripe típica; *nº positivos/nº pacientes con y sin síntomas (%)

Se calcularon los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para los síntomas y CGT, demostrando que a excepción de los SGI, todos ofrecen una elevada E y VPN, sin embargo, la S y VPP son muy bajos (**tabla IV.28**). Solamente la CGT ofreció diferencias estadísticamente significativas en los casos confirmados de gripe, y por

los datos de S, E, VPP y VPN demostró ser el parámetro clínico que mejor se correlacionaba con la gripe.

Tabla IV.28. Sensibilidad (S), Especificidad (E), valor predictivo positivo, (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y Odds ratio (OR) de los datos clínicos para predecir los casos de gripe

Variable	S	E	VPP	VPN	OR (IC 95%)*
Fiebre	0,96	0,12	0,29	0,91	4,13 (1,62-10,56)
Tos	0,89	0,15	0,28	0,79	1,45 (0,82-2,57)
Rinorrea	0,79	0,22	0,28	0,75	1,11 (0,71-1,76)
Odinofagia	0,68	0,32	0,27	0,74	1,09 (0,73-1,63)
SGI	0,20	0,80	0,27	0,7	1,04 (0,65-1,65)
CGT	0,62	0,71	0,44	0,84	4,02 (2,72-5,94)

*Intervalo de confianza del 95%

IV.4.3. RELACIÓN ENTRE TIPO Y SUBTIPO DE GRIPE Y EDAD, SEXO Y ESTADO VACUNAL

La mayor tasa de detección de gripe se obtuvo para el grupo de edad comprendido entre 15 y 49 años (ver tabla IV.26). Sin embargo, en números absolutos, el mayor nº de casos de gripe se dio en menores de 15 años. Este hecho fue más manifiesto cuando se trató de gripe B y AH1 (69,7 y 70,8% de casos de cada tipo, respectivamente) que en el caso de gripe AH3 (48,2%). Sin embargo, no se demostraron diferencias significativas por grupos de edad en relación al tipo o subtipo detectado ($p= 132$) (**tabla IV.29**). No se detectó gripe AH1 en las personas mayores de 50 años.

Tabla IV.29. Distribución de tipo y subtipo de gripe por grupos de edad

EDAD (años)	N (%)*			TOTAL
	TIPO/SUBTIPO			
	Gripe B	Gripe AH1	Gripe AH3	
< 15	30 (69,8)	17 (70,8)	41 (48,2)	88
15 – 49	10 (23,3)	7 (29,2)	32 (37,6)	49
50 – 65	2 (4,7)	0	5 (5,9)	7
>65	1 (2,3)	0	7 (8,2)	8

*% respecto al total de cada tipo o subtipo

No se demostraron diferencias significativas en la distribución de tipo y subtipo de gripe en función del **sexo** de los pacientes ($p=0,063$) (tabla IV.30).

Tabla IV.30. Distribución de tipo y subtipo de gripe por sexo

SEXO	N (%)*			TOTAL
	TIPO/SUBTIPO			
	Gripe B	Gripe AH1	Gripe AH3	
Mujer	16 (37,2)	16 (66,7)	38 (44,7)	70 (46)
Hombre	27 (62,8)	8 (33,3)	47 (55,3)	82 (54)

*% respecto al total de cada tipo o subtipo

No se demostraron diferencias significativas entre los tipos y subtipos detectados de gripe y el estado vacunal ($p=0,514$). Con respecto a los casos aparecidos en vacunados el mayor porcentaje se debió a virus de la gripe B (18,6%) (tabla IV.31).

Tabla IV.31. Distribución de tipo y subtipo de gripe por estado vacunal

VACUNACIÓN	N (%)*			TOTAL
	TIPO/SUBTIPO			
	Gripe B	Gripe AH1	Gripe AH3	
No vacunado	35 (81,3)	22 (91,6)	73 (85,8)	130 (85,5)
Vacunado	8 (18,6)	2 (8,3)	12 (14,1)	22 (14,5)

*% respecto al total de cada tipo o subtipo

Hay que destacar que de los 43 casos de gripe B, 21 de éstos se dieron en la temporada 2004-2005 (19,8% del total de positivos de gripe en esa temporada), y sólo 1 (4,8%) estaba vacunado. En la temporada 2005-2006 hubo 22 casos de gripe B (47,8% del total de positivos en esa temporada) y 7 de ellos eran vacunados (31,8%).

IV.4.4. RELACIÓN ENTRE TIPO Y SUBTIPO DE GRIPE Y DATOS CLÍNICOS

Los resultados de la comparación entre los datos clínicos y los distintos tipos y subtipos de gripe aparecen reflejados en la **tabla IV.32**.

Tabla IV.32. Distribución de tipo y subtipo de gripe en función de los datos clínicos

CLÍNICA	TIPO/SUBTIPO			TOTAL	p
	Gripe B	Gripe AH1	Gripe AH3		
Fiebre	42 (97,6)	23 (95,8)	82 (96,4)	147 (96,7)	0,902
Tos	38 (88,4)	22 (91,6)	75 (88,2)	135 (88,8)	0,890
Rinorrea	32 (74,4)	17 (70,8)	72 (84,7)	121 (79,6)	0,201
Odinofagia	26 (60,4)	16 (66,6)	64 (75,3)	106 (69,7)	0,212
SGI	10 (23,2)	2 (8,3)	19 (22,3)	31 (20,4)	0,277
CGT	18 (41,9)	12 (50)	64 (75,3)	94 (61,8)	< 0,001
Antibióticos	3 (6,9)	2 (8,4)	10 (11,7)	15 (9,9)	0,666
TOTAL	43 (100)	24 (100)	85 (100)	152 (100)	

SGI, síntomas gastrointestinales, CGT, clínica de gripe típica; *N (% respecto al total de cada tipo o subtipo)

Los datos clínicos más frecuentes fueron en los tres virus de gripe los mismos: fiebre, tos y rinorrea. Pero donde se observó más sintomatología en general fue en los casos con subtipo AH3.

Se apreció relación estadística entre tipo y subtipo de gripe y CGT. Al analizar este resultado, se observó que los pacientes infectados con gripe AH3 presentaban CGT de forma mayoritaria (75,3%), frente a los infectados por AH1 que la

presentaban en un 50%, y sobre todo frente a los infectados por gripe B, que sólo presentaban CGT en el 42% de los casos.

Ninguno de los restantes datos clínicos se asoció significativamente a padecer infección por un determinado subtipo de gripe. Sólo se apreció alguna diferencia, que no llegó a ser significativa, en el caso de la odinofagia y la rinorrea, que se dio con más frecuencia en pacientes infectados con gripe AH3 y los síntomas gastrointestinales que se dieron con menor frecuencia en infectados por gripe AH1.

La sensibilidad de los SGI fue muy baja en los tres tipos de gripe. Sin embargo los valores de especificidad fueron elevados para todos. Destaca especialmente el subtipo AH3 por el cual los datos clínicos ofrecieron en general los mejores resultados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo (**tablas IV.33, IV.34 y IV.35**).

Tabla IV.33. Sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los datos clínicos para el subtipo AH1

Variable	S	E	VPP	VPN
Fiebre	0,96	0,77	0,16	0,99
Tos	0,92	0,79	0,16	0,99
Rinorrea	0,71	0,81	0,14	0,98
Odinofagia	0,67	0,83	0,15	0,98
SGI	0,08	0,95	0,06	0,96
CGT	0,50	0,85	0,13	0,97

Tabla IV.34. Sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los datos clínicos para el subtipo AH3

Variable	S	E	VPP	VPN
Fiebre	0,95	0,86	0,56	0,99
Tos	0,88	0,87	0,56	0,98
Rinorrea	0,85	0,90	0,59	0,97
Odinofagia	0,75	0,91	0,60	0,95
SGI	0,22	0,97	0,61	0,88
CGT	0,75	0,94	0,68	0,96

Tabla IV.35. Sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los datos clínicos para el tipo B

Variable	S	E	VPP	VPN
Fiebre	0,97	0,80	0,28	0,99
Tos	0,88	0,82	0,28	0,99
Rinorrea	0,74	0,83	0,26	0,97
Odinofagia	0,60	0,85	0,24	0,96
SGI	0,23	0,96	0,32	0,94
CGT	0,42	0,85	0,19	0,95

DISCUSIÓN

Desde el punto de vista **clínico**, la gripe es una enfermedad generalmente autolimitada, que afecta a la población general y cuya morbi-mortalidad es especialmente importante en ciertos grupos de población denominados de “riesgo” (mayores de 65 años y personas con patologías de base), aunque su distribución es universal y puede afectar a personas de todas las edades.

Anualmente, en la época invernal (generalmente de Diciembre a Abril en nuestro medio) aparecen epidemias de gravedad variable, durante las cuales la tasa de ataque pueden ser del 10-20% en la población general, y aún mayor en determinados grupos de edad, especialmente en niños (**Neuzil y cols, 2000**); esto se traduce en un incremento en el número de personas atendidas en centros sanitarios por infecciones respiratorias agudas. Durante estas epidemias se observa un incremento de la mortalidad global que puede ser atribuible a complicaciones debidas a la gripe.

Además, el potencial pandémico de la gripe, unido a la posibilidad de su control, lograron que esta enfermedad pasara a ser el objetivo preferente de la vigilancia nacional e internacional, incluso antes de que la detección de casos de infección humana por cepas aviares de los virus de la gripe en estos últimos años volviera a poner de actualidad la amenaza de una nueva pandemia (**Mateo y cols, 2006**), que se ha materializado recientemente en la primera pandemia del siglo XXI, por el nuevo virus de la gripe A(H1N1)v (**Dawood y cols, 2009**).

Cualquier sistema que imaginemos para vigilar esta enfermedad debe atender a los objetivos de detectar y caracterizar precozmente los virus de la gripe circulantes y evaluar su capacidad de difusión en la población. Y eso sólo puede hacerse con la integración de la información virológica y epidemiológica de la enfermedad. El mantenimiento de sistemas de vigilancia, basados exclusivamente en procedimientos de declaraciones universales de casos de enfermedades según criterios de sospecha clínica, no ha ayudado mucho a la vigilancia de la gripe, porque el registro y el análisis de casos individuales es habitualmente una tarea lenta, cuando no imposible, mientras que la falta de especificidad de los datos recogidos convierte esa tarea en algo de limitado

valor. Otros procedimientos que han pretendido añadir más especificidad a la vigilancia de la enfermedad, como la notificación microbiológica de laboratorios, tampoco han sido de gran ayuda, puesto que siempre resulta difícil conocer la repercusión epidemiológica de esos datos. La posibilidad de unir información clínica, epidemiológica y microbiológica de una enfermedad en una población, junto a la rapidez en la transmisión de esa información ha sido durante años el viejo sueño de los “vigilantes” de la gripe y sólo ha hecho falta el desarrollo de los denominados sistemas centinela para hacerse realidad (**Mateo y Sánchez, 2002; Mateo y cols, 2006**).

V.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

La distribución de la población de estudio demuestra que casi el 70% de los pacientes correspondió a la edad pediátrica. Aunque esta cifra es muy elevada, no es sorprendente dado que se ha descrito que los niños son el principal reservorio de las infecciones respiratorias y que las tasas de ataque son mayores en este grupo de población (**Gwaltney, 2000; Munoz, 2002**). Además, el hecho de que algunos de los médicos generales atendieran también a población pediátrica puede haber influido en parte al incremento en el nº de niños incluidos en el estudio.

Independientemente de los resultados de laboratorio, el curso epidemiológico de las epidemias anuales de gripe se recogen por el Centro Nacional de Epidemiología, dentro de la Red Nacional de Vigilancia de gripe, mediante informes semanales en base a las declaraciones que los médicos centinela realizan por casos de gripe clínica. Aparte de la fiebre, cuya presencia fue uno de los criterios de inclusión de la población de estudio, el análisis del resto de síntomas demuestra que la tos, la rinorrea y la odinofagia son mayoritarios frente a los síntomas gastrointestinales. Estos síntomas (tos, rinorrea y odinofagia) están habitualmente incluidos entre los criterios de síndrome gripal o infección respiratoria aguda (**ECDC, 2009**).

Sin embargo, aunque los criterios clínicos de síndrome gripal se suelen aplicar a toda la población, los diferentes grupos de edad pueden reflejar diferentes síntomas. En el grupo de población pediátrica se dan

mayoritariamente tos y rinorrea, sin embargo es menos frecuente la odinofagia. En este grupo puede haber influido la incapacidad de valorar este signo en lactantes y niños pequeños, que constituyen un porcentaje importante entre el grupo de población pediátrica evaluada. Igualmente, la CGT incluye síntomas clínicos que probablemente sólo han podido ser evaluados en niños mayores como escalofríos y mialgias.

La vacunación y la prescripción de antibióticos se dieron más frecuentemente en el grupo > 65 años. Este grupo de población supone uno de los grupos de riesgo en los habitualmente se recomienda la vacunación frente a la gripe estacional cada año (**CDC, 2005**).

La prescripción de antibióticos en casos clínicos de infección respiratoria se da más frecuentemente en estos pacientes. Tanto la vacunación como la prescripción de antibióticos son lógicamente más frecuentes en este grupo de edad porque ambos van encaminados a evitar las complicaciones debidas a la gripe. Se sabe que la neumonía bacteriana secundaria, una de las complicaciones de la gripe, requiere muy frecuentemente hospitalización, y la tasa de mortalidad es elevada especialmente en pacientes ancianos y aquellos con enfermedades cardiovasculares o respiratorias (**Low, 2008**).

V.2. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y VIROLÓGICAS DE LOS AISLADOS

Durante la temporada 2004-2005, la tasa de detección de virus gripales fue el doble de la obtenida en la siguiente temporada. Según los datos del Centro Nacional de Epidemiología, es durante esta temporada cuando el pico de incidencia de gripe ha alcanzado su máximo, incluso superior al alcanzado con la actual gripe pandémica.

La distribución temporal de los tipos y subtipos gripales detectados en las dos temporadas refleja que: durante ambas temporadas cocirculan los dos tipos virales A y B. En la temporada 2004-2005, la circulación de gripe B sigue a la de gripe AH3, único subtipo de gripe A detectado en nuestra población de estudio. La cocirculación de gripe A y B dentro de una misma temporada suele ser frecuente, y también ha sido descrito que habitualmente el pico de incidencia de gripe B sigue al pico de actividad de gripe A, como ocurre en

nuestra muestra durante esta temporada y como ha sido reflejado en otras áreas del mundo durante ese periodo (**Hay y cols, 2001, Huang y cols, 2007**).

Las detecciones virales durante la siguiente temporada, 2005-2006 se produjeron más tarde con respecto a la temporada anterior. La actividad gripal tuvo un comienzo tardío en la temporada 2005-2006. En la temporada 2004-2005, se inició la onda epidémica en la semana 50/2004 y se alcanzó la máxima incidencia en la semana 2/2005. El análisis de los datos epidemiológicos y virológicos, procedentes del Sistema Centinela para la vigilancia de la gripe en nuestro país, reflejó un ligero aumento de la incidencia en la semana 6/2006 (5 al 11 de febrero de 2006), aunque no fue hasta la semana 9 (26 de febrero al 9 de marzo de 2006) cuando la tasa global de incidencia superó el umbral basal. Al igual que ocurre con el resto de sistemas de vigilancia regionales de España, durante esa temporada hubo un predominio claro en la detección de subtipo AH1, seguido de gripe B, que en este caso, circularon concomitantemente durante el mismo periodo (**SVEA, 2006**).

El análisis filogenético del gen de la hemaglutinina de las cepas aisladas demostró que en la **temporada 2004-2005** las cepas de gripe A agrupaban, junto con todas las demás cepas caracterizadas a nivel nacional y otras de países del Hemisferio Norte, en un cluster único. Estas cepas eran similares a **A/California/1/2004 (H3N2)**, variante distinguible antigénicamente de la cepa A/Fujian/411/2002 (H3N2) utilizada en la vacuna recomendada para esa temporada. Las cepas de gripe B fueron similares a **B/Shanghai/361/2002** (linaje Yamagata), coincidente con la incluida en la vacuna (**Red de Vigilancia epidemiológica, 2005**).

En la **temporada 2005-2006**, las cepas de gripe A fueron similares a **A/New Caledonia/20/99 (H1N1)**, cepa utilizada en la vacuna recomendada para esa temporada, y las cepas de gripe B fueron del linaje Victoria, similares a **B/Malasya/2506/04 (Red de Vigilancia epidemiológica, 2006)**.

El análisis genético de las cepas en cada temporada nos viene a reflejar dos hechos:

- En la primera temporada, la cepa de gripe AH3 aislada era diferente de la incluida en la vacuna. Esta temporada la tasa de incidencia de gripe fue muy

elevada, de hecho es la más elevada de los últimos años (por encima de la tasa de incidencia detectada para la gripe A(H1N1)v en 2009-2010. La gripe AH3 circulante en la temporada 2004-2005 fue la responsable principal de numerosos brotes y este pico tan elevado de incidencia. Puede que, en parte, esta actividad alta de gripe se debiera a fallos vacunales por la variabilidad antigénica entre las dos cepas, la circulante y la vacunal.

- Por otra parte, la actividad gripal en la temporada 2005-2006 fue casi de la mitad con respecto a la temporada anterior. La cepa de gripe AH1 circulante era similar a la incluida en la vacuna. El único hecho destacable tras el análisis filogenético de las cepas fue que la cepa de gripe B (B/Malasya/2506/04) era de diferente linaje que el incluido en la vacuna. Esto condicionó el cambio de formulación de la vacuna del año siguiente, en que se sustituyó la variante B/Shanghai/361/2002 (detectada en años anteriores, e incluida en la vacuna de esa temporada) por B/Malasya/2506/04. Estos resultados pueden explicar que un nº importante de las cepas de gripe B detectadas en la temporada 2005-2006 fueran pacientes vacunados.

V.3. UTILIDAD DE TRES MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN EL SISTEMA DE VIGILANCIA DE GRIPE EN ANDALUCÍA

El estándar de oro para la detección de virus de la gripe ha sido tradicionalmente el cultivo celular por su buena sensibilidad, pero en contra está el tiempo preciso para emitir un resultado (6-14 días). Posteriormente, se consiguió acortar este tiempo gracias al cultivo rápido mediante técnica de “shell-vial” y posterior revelado con anticuerpos monoclonales tipo y/o subtipo-específicos mediante IF que reduce el tiempo a 48 h. El SV ha demostrado tener buena correlación con el cultivo tradicional para la detección de los virus de la gripe A y B (**Navarro y cols, 1999; Shin-Ru y cols, 1999; Zitterkopf y cols, 2006**). Sin embargo, la detección de los virus en cultivo celular mediante técnicas de IF está condicionada a una elevada variabilidad, dependiente entre otros de factores como la experiencia del observador y un adecuado número de células. Además tienen baja sensibilidad y especificidad especialmente en los periodos de menor prevalencia del virus en cada temporada y en poblaciones especiales, tales como los inmunodeprimidos y la población anciana

(**Henrickson 2004**). Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales para subtipado de gripe A mediante IF, han demostrado ofrecer una baja sensibilidad.

Los métodos moleculares de diagnóstico, y en concreto el más utilizado en virología clínica que es la PCR, están basados en la detección del genoma viral en la muestra. Han sido utilizadas dianas de diferentes genes para amplificación, tipado y/o subtipado de virus de la gripe como el gen de la matriz, de la hemaglutinina, y de la proteína NS. Al ser el virus de la gripe un virus ARN, se requiere un paso previo de conversión a ADN complementario (ADNc) mediante retro-transcripción (RT).

La elevada sensibilidad y especificidad de la RT-PCR ha revolucionado el diagnóstico virológico de la gripe, mejorando así la calidad de los datos de casos confirmados dentro de los sistemas de vigilancia (**Liolios y cols, 2001, Coiras y cols, 2003, Freymuth y cols, 2006, Rahman y cols, 2008; Mahony, 2008**).

En un sistema de vigilancia de gripe, nos interesa conseguir la máxima sensibilidad para la detección de virus, y lo que ha contribuido al aumento de sensibilidad de detección de tipo y subtipo de gripe ha sido las técnicas de **biología molecular**. Desde la introducción de estas técnicas, la detección de virus gripales así como el subtipado ha mejorado respecto a temporadas anteriores donde se detectada por inmunofluorescencia y existía un alto porcentaje de virus de la gripe A que no se subtipaban (**Navarro y cols, 2005**).

La **prevalencia** en nuestro estudio fue del 26,8%. La prevalencia puede variar respecto a otros estudios dado que tiene que tenerse en cuenta que los valores de positividad pueden variar ampliamente dependiendo de la temporada y las características antigénicas de los virus circulantes. Esta variabilidad podemos observarla al analizar otras temporadas. En Andalucía (temporadas 2000-2001, 2001-2002) encontramos una prevalencia de virus de gripe detectados de un 18,5% (**Navarro y cols, 2005**). En la temporada 2003-2004, en Andalucía, la prevalencia aumenta a un 21,5%. En estas temporadas la detección de virus de la gripe se realizaba mediante cultivo celular. A partir de la temporada 2007-2008 la detección de virus de la gripe se realiza por

métodos de biología molecular. La prevalencia aumenta a partir del momento en que se aplica RT-PCR para la determinación de gripe. La prevalencia en la temporada 2006-2007 en Andalucía es un 23,5% y en la temporada 2007-2008 (que se introduce la RT-PCR para la detección de gripe) aumenta a un 37,3% (**Red de Vigilancia centinela de gripe de Andalucía, 2008**). Otros autores demuestran tasa de detección de virus gripales superiores a las encontradas en el sistema de Vigilancia de Gripe en Andalucía en periodos anteriores a la introducción de la biología molecular como herramienta diagnóstica, oscilando entre 32,3% y 56% (**Ellis y cols, 1997; Zambon y cols, 2001; Leitmeyer y cols, 2002; Hyndiyeh y cols, 2005**), aunque en algunos de estos estudios sólo se evalúa el periodo epidémico de la temporada, lo cual hace que aumente significativamente el rendimiento de la prueba.

Otros factores pueden a su vez haber influido en este aumento de la tasa de detección, entre los cuales cabría destacar el tipo de muestra.

Entre las muestras respiratorias para aislamiento del virus o la detección rápida, las **muestras nasofaríngeas** son típicamente más efectivas que los escobillones faríngeos (**Heikkinen y cols, 2001; Sung y cols, 2008**). En temporadas anteriores a la temporada 2005-2006, las muestras utilizadas para detección de virus de la gripe en la Red de Vigilancia en Andalucía eran exudados faríngeos o nasales. A partir de esa temporada, se tomaron exudados de ambas localizaciones de cada paciente. Actualmente, esta es la muestra recomendada para detección de virus de la gripe en los sistemas de Vigilancia a nivel mundial. Este hecho puede a su vez haber influido en un mejor rendimiento en el diagnóstico de gripe, sobre todo teniendo en cuenta que otros factores, como la demora en el transporte y/o las condiciones inadecuadas del mismo pueden ser efectos deletéreos adicionales en la carga vírica de la muestra.

Las técnicas de **RT-PCR** se han mostrado como las técnicas de mayor sensibilidad. La superioridad de la RT-PCR frente al cultivo ha sido demostrada por muchos estudios (**Atmar y cols, 1996; Ellis y cols, 1997; Boivin y cols, 2001; Liolios y cols, 2001, Coiras y cols, 2003, Freymuth y cols, 2006; Rahman y cols, 2008**).

En el análisis de la distribución de positivos para virus de la gripe por método y por temporada, obtenemos la mayor sensibilidad en la técnica SV-PCR (95,4% de los positivos por cualquiera de los tres métodos). Existen pocos trabajos en los que esta técnica, es decir el procedimiento integrado de cultivo celular y posterior detección del crecimiento viral mediante RT-PCR, se haya evaluado. También estos autores demuestran un mejor rendimiento diagnóstico utilizando esta combinación de métodos (**Chan y cols, 2003; Choo y Kim, 2006**).

Sólo hubo un resultado positivo por SV-IF y negativo por SV-PCR, correspondiente a una gripe AH1 (0,6% de las muestras positivas). Teóricamente, las técnicas moleculares son más sensibles que las que detectan antígenos virales, como es el caso de la IF (**Pregliasco y cols, 1998; Plakokefalos y cols, 2000; Loens y cols, 2006; Tenorio y cols, 2009; Reina y cols, 2010**) El resultado discrepante obtenido en este caso sólo podría explicarse por presencia de sustancias inhibitoras de la PCR en esa muestra concreta, hecho que no puede excluirse dado que no se utilizó control interno de la reacción para detectar posibles inhibiciones. Algunas muestras nasofaríngeas pueden contener inhibidores de la reverso-transcriptasa y la *Taq* DNA polimerasa, y los inhibidores pueden permanecer en el producto de la extracción junto con los ácidos nucleicos. Algunos estudios demuestran a su vez que los escobillones de alginato cálcico pueden inhibir la PCR (**Poddar y cols, 1998; Queiroz y cols, 2001**).

Los restantes resultados negativos mediante SV-PCR fueron sólo positivos por la técnica MD. Esto podría haber sido consecuencia de una demora en el envío y/o procesamiento de la muestra y/o toma de muestra subóptima, que pudieran conducir a la presencia de virus no viables, de los que sólo sería detectable el ARN viral mediante técnicas de amplificación génica.

Mediante la técnica **SV-PCR**, se detectaron 145 positivos: 104 fueron virus gripe A (95,4% del total de virus de la gripe A detectados) y 41 fueron

gripe B (95,3% del total de virus de la gripe B detectados). Dentro de los subtipos de gripe A, mediante esta técnica se detectaron 23 de las 24 muestras positivas para gripe AH1, y 81 de las 85 muestras positivas para gripe AH3; la tasa de detección de cada subtipo fue similar con esta técnica, 95,8% y 95,3%, respectivamente.

Con la técnica **MD**, se obtuvieron los mismos resultados de sensibilidad con gripe AH1 que con la técnica SV-PCR (23 de 24 positivos); sin embargo, la sensibilidad de detección de gripe AH3 y gripe B fue menor, 90,6% y 72,1%, respectivamente.

El virus de la gripe tiene una elevada tasa de mutación espontánea. Mutaciones en los diferentes genes del virus, y principalmente en aquellos que codifican para la hemaglutinina y neuraminidasa, conducen a cambios antigénicos menores que determinan la revisión y/o cambio de la composición de la vacuna antigripal anualmente (**Hay y cols, 2001; CDC, 2004**). Estas nuevas variantes, a su vez, pueden condicionar la sensibilidad de las técnicas moleculares de diagnóstico por mutaciones puntuales en las regiones que hibridan con los cebadores diseñados para la RT-PCR específica de cada tipo o subtipo.

En este trabajo, la detección mediante SV-PCR ofrece mejor rendimiento que la técnica MD. Aunque la herramienta para la detección del virus es la misma, el material de partida varía. Con la integración de la RT-PCR del sobrenadante del cultivo como método de lectura del crecimiento viral se consigue una doble amplificación del virus: amplificación "in vivo" mediante el cultivo celular y posterior amplificación "in vitro" mediante el sistema de lectura más sensible, que es la RT-PCR. Esta doble amplificación puede explicar una mayor sensibilidad de la técnica SV-PCR con respecto a MD para detectar determinados tipos o subtipos de gripe.

La RT-PCR utilizada en las temporadas evaluadas en este trabajo (**Stockton y cols, 1998**) fue diseñada en 1996. La composición de la vacuna para la temporada 1997-1998 incluía una cepa de gripe A H3N2 análoga a A/Sydney/5/97(H3N2). Por el contrario, la cepa de gripe A H3N2 recomendada para la vacuna antigripal de la temporada 2004-2005 (primera temporada de este trabajo) era una cepa similar a A/Fujian/411/2002 (H3N2). Aunque la homología entre ambas cepas es alta (**Nelson y cols, 2009**), la evolución

filogenética a lo largo de los años en el gen de la hemaglutinina, podría explicar diferencias en la sensibilidad de distintos métodos diagnósticos. Así, determinadas cepas podrían ser más fácilmente recuperables mediante cultivo celular que mediante técnicas moleculares subóptimas y viceversa.

Con el método **SV-IF** se detectó virus de la gripe en un 78,2%, 71,5% de los virus de gripe A y 95,3% de los virus de gripe B. Esto coincide con otros trabajos donde encontramos sensibilidades de detección por IF de SV desde 55,2% hasta 86% (**Zitterkopf y cols, 2006; Boivin y cols, 2001**).

Esta técnica tiene además un inconveniente con respecto a la RT-PCR, tanto de muestra directa como de sobrenadante de cultivo. Sólo permite diferenciar el tipo de virus de la gripe con un rendimiento aceptable. Existen anticuerpos monoclonales comerciales para detección específica de cada subtipo de gripe A. Sin embargo, el subtipado de gripe A mediante técnicas de IF ofrece un rendimiento muy bajo. En un estudio previo, que utilizaba IF directa sobre la monocapa celular para detección de subtipo de gripe A, de los 123 aislados de virus de la gripe A, sólo pudo identificarse el subtipo en 67 de ellos, siendo no subtipables el 45,5% de los aislados (**Cantudo, 2003**).

Cuando analizamos los resultados obtenidos con la técnica SV-IF para cada subtipos de virus gripe A (caracterizado mediante RT-PCR), se observa que en el caso de virus gripe AH3, con este método se detectaron 54 de las 85 positivas (63,5%) y que todos los virus de la gripe AH1 fueron detectados por este método. Para gripe B también la sensibilidad fue baja, un 71,5% frente a 95,4% por el método SV-PCR.

La **mayor concordancia** se obtuvo en el diagnóstico de gripe B, entre las técnicas SV-IF y SV-PCR. Probablemente, el óptimo rendimiento del cultivo celular para este tipo viral, y un rendimiento homogéneo en la detección de antígeno de gripe B en cultivo mediante técnicas de IF, por estar éste sujeto a menores cambios antigénicos a lo largo del tiempo, hacen que las técnicas de RT-PCR e IF como sistema de lectura del crecimiento viral ofrezcan tasas de sensibilidades similares.

Por tanto, la combinación de cultivo rápido mediante técnica “shell-vial” seguido de detección del crecimiento mediante RT-PCR del sobrenadante del cultivo, ofrece sensibilidad máxima. Además, este método permite recuperar la cepa de gripe para posteriores estudio de caracterización genética, que son fundamentales en los sistemas de Vigilancia de Gripe, porque permiten definir las cepas circulantes en cada temporada, y rediseñar nuevas vacunas para temporadas venideras que incluyen cepas gripales análogas a las detectadas en temporadas anteriores.

La reciente introducción de kits de PCR en tiempo real, con claras ventajas con respecto a la nested-PCR en cuanto a menor riesgo de contaminación y menor tiempo requerido para obtener un resultado, en combinación con el empleo de sistemas automáticos de extracción de ácidos nucleicos, ha simplificado bastante el procedimiento diagnóstico de virus de la gripe. Un ejemplo de ello es la PCR en tiempo real recomendada como técnica de referencia para la detección del virus pandémico H1N1 2009 (**WHO, 2009**).

V.4. RELACIÓN ENTRE LOS DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS Y LOS RESULTADOS DE LABORATORIO

Aunque más de la mitad de los casos de gripe corresponde a menores de 15 años, la tasa de detección en este grupo es menor que en el grupo de edad de 15-49 años. Estos dos grupos de edad constituyen el 90% de los casos confirmados de gripe. A partir de 50 años, hay una reducción importante en el nº de casos de gripe. Los niños son la población más afectada de gripe anualmente (**Monto y Kioumehr, 1975**). Por otra parte, la población adulta de mayor edad es la menos afectada. Una posible explicación a estos resultados puede extraerse de la mayor cobertura vacunal en este grupo de edad y/o al papel que pueden jugar otros patógenos virales y bacterianos en estos síndromes (**Graat y cols, 2003**).

Es de destacar el resultado, en principio contradictorio, en cuanto a los casos de gripe entre vacunados, que fue superior a los no vacunados. Cuando analizamos los tipos virales detectados en estos dos grupos vemos que es el tipo B el que se detecta en mayor porcentaje (18,3%) entre los pacientes

vacunados seguido de la gripe AH3 (14%). Sólo un 8% de los casos de gripe AH1 estaban vacunados. Probablemente esto es debido a fallo vacunal en ambas temporadas, en 2004-2005 por la cepa de gripe AH3 que circuló, y en la temporada 2005-2006 por la cepa de gripe B, en ambos casos, fue antigénicamente diferente a la incluida en la vacuna de cada temporada (**Red de Vigilancia de la gripe en España, 2005**).

Además no hubo ningún caso de gripe AH1 entre los pacientes mayores de 50 años. Este grupo de edad, y principalmente los mayores de 65 años son los individuos en los que mayor cobertura vacunal se obtiene cada año, y además la cepa de gripe AH1 que circuló en nuestro grupo de estudio estaba antigénicamente relacionada con la cepa vacunal.

Cuando se comparan los datos clínicos con los resultados de laboratorio vemos que, de forma general, los parámetros mejor asociados con gripe confirmada fueron fiebre y CGT. En el primer caso, el resultado obtenido no es valorable, ya que la fiebre era uno de los criterios de inclusión de los pacientes. A pesar de ello, algunos médicos centinela de la Red enviaron muestra de pacientes sin fiebre (n=56), confirmándose gripe en 5 casos (8,9%). Esto demuestra que a pesar del elevado valor predictivo negativo de la fiebre, existen casos de gripe que pueden cursar sin este síntoma. En numerosos estudios y sistemas de vigilancia ha sido incluido este síntoma como criba para el estudio de laboratorio de gripe (**Bonhoeffer y cols, 2004**). Sin embargo, hay que analizar la prioridad para realizar el estudio microbiológico en pacientes sin fiebre, especialmente cuando se trata de definir los parámetros clínicos ante nuevas variantes de virus gripales. En este sentido, la experiencia que se tiene con la actual gripe pandémica A(H1N1)v nos ha demostrado que alrededor de un 3% de pacientes con gripe pandémica en España no tenían fiebre (**Ministerio de Sanidad y Política Social, 2009**).

A diferencia de estudios previos, la tos no fue un buen parámetro clínico para predecir los casos de gripe. En este estudio, el valor predictivo negativo fue inferior al obtenido en un estudio similar realizado en temporadas anteriores (**Navarro y cols, 2005**). Al igual que en este estudio, los restantes datos

clínicos no se correlacionaron con los casos confirmados de gripe. Y solamente la CGT muestra diferencias estadísticamente significativas.

En el trabajo realizado por Navarro y cols en 2005, la insensibilidad de la técnica de subtipado no permitió establecer una relación entre los tipos y subtipos de gripe con la clínica. En este trabajo, hemos estudiado además esta relación.

El cuadro típico de gripe se produce con cualquier tipo de virus de la gripe, aunque algunos autores sugieren que la enfermedad causada por virus de la gripe B puede ser más leve e incluso pueden existir diferencias en la presentación clínica dependiendo del subtipo de virus de la gripe A (**Carrat y cols, 1999**). El subtipo de gripe podría estar relacionado con la gravedad de la enfermedad. El subtipo AH3 es más severo que la infección por gripe AH1. (**Zambon M y cols, 2001**).

Como se ha reflejado anteriormente, los resultados obtenidos en este trabajo son similares. Donde se observó más sintomatología en general fue en los casos con subtipo AH3. Aunque sigue observándose un elevado valor predictivo negativo de todos los datos clínicos para los casos de gripe producidos por los 3 tipos virales, pero destaca el elevado valor predictivo positivo de la clínica para el subtipo AH3.

Se apreció significación estadística entre tipo y subtipo de gripe y CGT. Al analizar este resultado, se observó que los pacientes infectados con gripe AH3 presentaban CGT de forma mayoritaria (75,3%), frente a los infectados por AH1 que la presentaban en un 50%, y sobre todo frente a los infectados por gripe B, que sólo presentaban CGT en el 42% de los casos.

Ninguno de los restantes datos clínicos se asoció significativamente a padecer infección por un determinado subtipo de gripe. Sólo se apreció alguna diferencia, que no llegó a ser significativa, en el caso de la odinofagia, que se dio con más frecuencia en pacientes infectados con gripe AH3 y los síntomas gastrointestinales que se dieron con menor frecuencia en infectados por gripe AH1.

No se observaron diferencias en cuanto a sensibilidad, especificidad y valores predictivos de los datos clínicos entre los pacientes con gripe AH1 y los pacientes con gripe B.

En este estudio, la variante de gripe AH3 es la que ocasiona una infección más sintomática. La posibilidad de ausencia de inmunidad en la población afectada de gripe AH3 por variabilidad antigénica entre la cepa que circulo en el periodo de estudio y la cepa vacunal, han podido determinar que en nuestro grupo de población los síntomas de un síndrome gripal se hayan correlacionado mejor con este subtipo viral.

CONCLUSIONES

1. El mayor nº de casos de IRA y/o síndrome gripal correspondió a la población pediátrica.
2. Los síntomas más comúnmente asociados al síndrome gripal fueron tos, rinorrea y clínica típica de gripe.
3. Se detectó una distribución temporal de muestras positivas diferente en los dos periodos evaluados: la tasa máxima de detecciones en la temporada 2004-2005 correspondió a la semana 3, mientras que en la temporada 2005-2006 se produjo en la semana 13.
4. No se detectó cocirculación de subtipos de gripe A dentro de una misma temporada, mientras que los casos de gripe B se dieron en ambas temporadas, independientemente de la detección de otro subtipo de gripe A.
5. El análisis filogenético de los aislados demostró similitud con las cepas vacunales para la gripe AH3 y AH1, y para la gripe B en la temporada 2004-2005. Sin embargo, en la 2ª temporada, los aislados de gripe B analizados correspondían a un linaje diferente al incluido en la vacuna de ese año. Esto podría explicar la mayor tasa de detección de este tipo gripal en ese periodo, probablemente por fallo de la vacuna.
6. El método diagnóstico que ofreció un mejor rendimiento fue el cultivo en shell-vial y detección de aislados mediante RT-PCR del sobrenadante. Este método además ofrece una ventaja con respecto a la detección directa de la muestra por métodos moleculares, ya que permite realizar posteriores estudios de caracterización genética, imprescindibles en un sistema de vigilancia de gripe.
7. La mayor concordancia entre técnicas se obtuvo para la detección de gripe AH1.
8. Cualquiera de las técnicas moleculares (MD y SV-PCR) demostró una buena concordancia en la detección de los subtipos de gripe A; sin embargo, en el

caso de la gripe B, la concordancia máxima se dio entre las técnicas que utilizaban el cultivo (SV-IF y SV-PCR).

9. El mejor parámetro clínico para predecir la gripe fue la presencia de clínica típica según los criterios establecidos por la WONCA.

10. Este dato fue especialmente relevante cuando se trató de casos de gripe AH3, por lo que parece que la infección por este subtipo produce un cuadro clínico más intenso.

11. La confirmación de casos de gripe en un Sistema de Vigilancia mediante la doble amplificación, *in vivo* por cultivo celular, e *in vitro* por amplificación del genoma de aislados ofrece enormes ventajas con respecto a las otras técnicas: permite caracterización posterior de los aislados y ofrece resultados más fiables para establecer los criterios clínicos relacionados con la gripe y para la detección precoz de la misma en cada temporada.

BIBLIOGRAFÍA

Arostegi K, Montes M, Pérez-Yarza EG, Sardon O, Vicente D, Cilla G. Clinical characteristics of children hospitalized for influenza virus infection. *An Pediatr (Barc)* 2005; 62(1): 1-4.

Atmar R, Baxter B, Dominguez E, Taber L. Comparison of Reverse Transcription-PCR with Tissue Culture and Other Rapid Diagnostic Assays for Detection of Type A Influenza Virus. *J Clin Microbiol* 1996; 34(10): 2604-2606.

Belshe RB. The Origins of Pandemic Influenza-Lessons from the 1918 virus. *N Engl J Med* 2005; 353:2209-2211.

Belshe R, Mendelman P, Treanor J, King J, Bruber W, Piedra P, Bernstein D, Hayden F, Kotloff K, Zangwillk, Lacuzio D . The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children. *N Engl J Med* 1998; 338: 1405-12.

Barker W, Borisute H, Cox C. A Study of the Impact of Influenza on the Functional Status of Frail Older People. *Arch Intern Med* 1998; 158: 645-650.

Boivin G, Hardy I, Kress A. Evaluation of a Rapid Optical Immunoassay for Influenza Viruses (FLUO OIA Test) in Comparison with Cell Culture and Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2): 730-732.

Boivin G, Hardy I, Tellier G, Maziade J. Predicting influenza infections during epidemics with use of a clinical case definition. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1166-9.

Bonhoeffer J, Kohl KS, Chen RT, Duclos P, Heijbel H, Heining U, Jefferson T, Loupi E and The Brighton Collaboration. Standardized case definitions of adverse events following immunization (AEFI). *Vaccine* 2004;22:547-550.

Brammer T, Murray E, Fukuda K, Hall HE, Klimov A, Cox N. Surveillance for influenza-United States, 1997-98, 1998-99, and 1999-00 seasons. *MMWR Surveill Summ* 2002; 51(SS07): 1-10.

Bridges CB, Lim W, Hu-Primmer J, Sims L, Fukuda K, Mak KH, Rowe T, Thompson WW, Conn L, Lu X, Cox NJ, Katz JM. Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong 1997-1998. *J Infect Dis* 2002; 15;185(8):1005-10.

Bridges CB, Thompson WW, Meltzer MI, Reeve GR, Talamonti WJ, Cox N, Lilac HA, Hall H, Klimov A, Fukuda K . Effectiveness and cost-benefit of influenza vaccination of healthy working adults: a randomized controlled trial. *JAMA* 2000; 284: 1655-63.

Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox N, Klimov AI. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA* 2006; 295(8): 891-4.

Cantudo Muñoz P. Utilidad de los datos clínicos de la gripe para el diagnóstico y control de pacientes atendidos en atención primaria. [Tesis doctoral]. Granada. Universidad de Granada. 2003.

Carrat F, Tachet A, Rouzioux C, Housset B, Valleron AJ. Evaluation of clinical case definitions of influenza: detailed investigation of patients during the 1995-1996 epidemic in France. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 283-90.

Casas I, Eiros JM, Ortíz R, Pérez P, Pozo F, Ruíz G, Tenorio A. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por virus respiratorios. Procedimientos en Microbiología clínica. SEIMC 2008.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of influenza: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR* 2004; 53 (RR06): 1-40.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of influenza: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), *MMWR* 2005; 54(RR-8):1-31.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus infection. MMWR 2009; 8; 58:467-470.

CDC. Center for Disease control and Prevention. Use of Influenza A(H1N1) 2009 Monovalent Vaccine. MMWR 2009; 58(rr-8):1-40.

Chan P, Tam J, Lam C, Chan E, Wu A, Li C, Buckley T, Cheung K, Joynt G, Cheng F, To K, Lee N, Hui D, Cheung J, Chu I, Liu E, Chung S, Sung J. Human Metapneumovirus Detection in Patients With Sever Acute Respiratory Syndrome. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(9):1058-1063.

Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell J. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* 2001; 7: 1306-12.

Choo YJ y Kim SJ. Detection of Human Adenoviruses and Enteroviruses in Korean Oysters Using Cell Culture, Integrated Cell Culture-PCR, and Direct PCR. *J Microbiol* 2006; 44(2): 162-170.

Classification Committee of WONCA (World Organization of National Colleges, Academies, and Academic Associations of General Practitioners/Family Physicians). Classification of Health Problems in Primary Care. In: ICHPPC-2-defined. New York: Oxford University Press; 1983:487.

Coiras MT, Pérez-Breña P, García ML, Casas I . Simultaneous Detection of Influenza A, B, and C Viruses, Respiratory Syncytial Virus, and Adenovirus in Clinical Samples by Multiplex Reverse Transcription Nested-PCR Assay. *J Med Virol* 2003; 69: 132-144.

Committe of the WHO Consultation on Clinical Aspects of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza. Clinical Aspects of Pandemic 2009 Influenza A(H1N1) Virus Infection. *N Engl J med* 2010; 362:1708-1719.

Couch RB. Prevention and treatment of influenza. *N Engl J Med* 2000; 343: 1778-87.

Covalciuc KA, Webb KH, Carison CA. Comparison of four clinical specimen types for detection of influenza A and B virus by optical immunoassay (FluOIA test) and cell culture methods. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3971-4.

Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom s, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki TM. Emergence of novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in human. *N Engl J Med* 2009; 360:2605-2615.

Demicheli V, Fefferson T, Rivetti D, Deeks J. Prevention and early treatment of influenza in healthy adults. *Vaccine* 2000; 18: 957-1030.

Elden L, Nijhuis M, Schipper P, Schuurman R, Loon A. Simultaneous Detection of Influenza viruses A and B Using Real-Time Quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(1): 196-200.

Ellis JS, Fleming DM, Zambon M. Multiplex Reverse Transcription-PCR for surveillance of Influenza A and B Viruses in England and Wales in 1995 and 1996. *J Clin Microbiol* 1997; 35(8): 2076-2082.

Englund JA, Champlin RE, Wyde PR, Kantarjian H, Atmar RL, Tarrand J, Yousuf H, Regnery H, Klimov AI, Cox N, Whimbey E. Common emergence of amantadine and rimantadine resistant influenza A viruses in symptomatic immunocompromised adults. *Clin Infect* 1998; 26: 1418-24.

European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) 2005-2009. Influenza case definition. Disponible en : <http://www.ecdc.europa.eu>

Fader RC. Comparison of the Binax NOW Flu A enzyme immuno chromatographic assay and R-Mix shell vial culture for the 2003-2004 influenza season. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12): 6133-5.

Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus ADME. Characterization of a Novel

Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *J Virol* 2005; 79(5):2814-2822.

Freytmuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, Gouarin S, Pettiean J, Eckart P, Brouard J. Comparison of Multiplex PCR Assays and conventional Techniques for the Diagnostic of Respiratory Virus Infections in Children Admitted to Hospital With an Acute Respiratory Illness. *J. Med Virol* 2006 78(11):1498-1504.

Gao P, Watanabe S, Ito T, Goto H, Wells K, McGregor M, Cooley AJ, Kawaoka Y. Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong. *J Virol* 1999; 73: 3184-9.

Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, y cols. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009; 325(5937):197-201).

Glezen WP. Serious morbidity and mortality associated with influenza epidemics. *Epidemiology Rev.* 1982; 4:25-44.

Glezen P, Decker M, Perrotta D. Survey of Underlying Conditions of Persons Hospitalized with Acute Respiratory Disease during Influenza Epidemics in Houston, 1978-1981. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 550-555.

Goto H and Kawaoka Y. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 10.224-10.228.

Graat JM, Schouten EG, Heijnen ML, Kok FJ, Pallast EG, de Greeff SC, Dorigo-Zetsma JW. A prospective, community-based study on virologic assessment among elderly people with and without symptoms of acute respiratory infection. *J Clin Epidemiol.* 2003; 56: 1218-23.

Greenbaum E, Morag A, Zakay-Rones Z . Isolation of Influenza C virus during an Outbreak of Influenza A and B viruses. *J Clin Microbiol* 1998; 36(5): 1441-1442.

Griffin MR, Coffey CS, Neuzil KM, Mitchell EF, Wright PF, Edwardas KM. Winter viruses: influenza and respiratory syncytial virus related morbidity in chronic lung disease. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1229-36.

Gross PA, Hermogenes AW, Sacks HS, Lau J, Levandowski RA . Efficacy of influenza vaccine in elderly persons: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1995; 123: 518-27.

Gwaltney JM. The common cold. In: Mandell GI, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 651-6.

Hall JL y Katz BZ. Cost of influenza hospitalization at a tertiary care children's hospital and its impact on the cost-benefit analysis of the recommendation for universal influenza immunization in children age 6 to 23 months. *J Pediatr* 2005; 147(6): 807-11.

Hannoun C, Tumova B. Survey on influenza laboratory diagnostic and surveillance methods in Europe. European Scientific Working Group on Influenza. *Eur J Epidemiol* 2000; 16(3):217-22.

Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. Molecular Basis for High Virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A Viruses. *Science* 2001; 293: 1840-2.

Hausmann J, Kretzschmar E, Garten W, Klenk HD. N1 neuraminidase of influenza virus A/FPV/Rostock/34 has haemadsorbing activity. *J Gen Virol* 1995; 76: 1719-28.

Hay AJ, Gregory V, Douglas AR, Lin YP. The evolution of human influenza viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001; 356: 1861-70.

Hayden FG and Palese P. Influenza virus. In richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (eds.): *Clinical Virology*. New York: Churchill Livingstone; 1997. p. 911.

Heikkinen T, Booy R, Campins M, Finn A, Olcen P, Peltola H, Rodrigo C, Schmitt HJ, Schumacher F, Teo S, Weil-Olivier C . Should healthy children

be vaccinated against influenza? A consensus report of the Summits of Independent European Vaccination Experts. *Eur J Pediatr* 2006; 165(4): 223-8.

Heikkinen T., Salmi AA and Olli Ruuskanen. Comparative study of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for detection of influenza. *BMJ* 2001; 322:138.

Henrickson KJ. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23(Suppl 1): S6-10.

Henter JI, Chow CB, Waileung CW, Lau YL. Cytotoxic therapy for severe avian influenza A (H5N1) infection. *Lancet* 2006; 367:870-873.

Herrmann B, Larsson C, Zwegberg B . Simultaneous Detection and Typing of Influenza Viruses A and B by a Nested Reverse Transcription-PCR: Comparison to Virus Isolation and Antigen Detection by Immunofluorescence and Optical Immunoassay (FLU OIA). *J Clin Microbiol* 2001; 39(1): 134-138.

Hindiye M, Levy V, Azar R, Varsano N, Regev L, Shalev Y, Grossman Z, Mendelson E. Evaluation of a Multiplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection and Differentiation of Influenza Viruses A and B during the 2001-2002 Influenza Season in Israel. *J Clin Microbiol* 2005; 43(2): 589-595.

Horimoto T y Kawaoka Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 129-49.

Huang QS, Lopez L, Adlam B. Influenza surveillance in New Zealand in 2005. *N Z Med J.* 2007; 120: U2581.

Ito T. Interspecies transmission and receptor recognition of Influenza A viruses. *Microbiol Immunol* 2000; 44:423-430.

Izureta HS, Thompson WW, Kramarz P, Shay DK, Davis RL, DeStefano F, Blacks S, Shinefield H, Fukuda K. Influenza and the rates of hospitalization

for respiratory disease among infants and young children. *N Engl J Med* 2000; 342: 232-9.

Joseph A, Itskovitz-Cooper N, Samira S, Flasterstein O, Eliyahu H, Simberg D, Goldwaser I, Barenholz Y, Kedar E . A new intranasal influenza vaccine based on a novel polycationic lipid-ceramide carbamoyl-spermine (CCS) I. Immunogenicity and efficacy studies in mice. *Vaccine* 2005; *Vaccine* 2006; 1:24818):3990-4006.

Katz JM, Lim W, Didges CB, Rowe T, Hu-Primmer J, Lu X, Abernathy RA, Clarke M, Conn L, Kwong H, Lee M, Au G, Ho YY, Mak KH, Cox N, Fukuda K. Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts. *J Infect Dis* 1999; 180:1763-70.

Keitel WA, Cate TR, Nino K, Huggins LL, Six HR, Quarles JM, Couch RB . Immunization against Influenza: Comparison of various topical and parenteral regimens containing inactivated and/or live attenuated vaccines in healthy adults. *J Infect Dis* 2001; 183(2): 329-32.

Kilbourne ED, Couch RB, Kasel JA, Keitel WA, Cate TR, Quarles JM, Grajower B, Pokorny BA, Johansson BE . Purified influenza A virus N2 neuraminidase vaccine is immunogenic and nontoxic in humans. *Vaccine* 1995; 13(18): 1799-803.

Klimov AI, Rocha E, Hayden F, Shult P, Roumillat F, Cox N. Prolonged Shedding of Amantadine-Resistant Influenza A Viruses by Immunodeficient Patients: Detection by Polymerase Chain Reaction-Restriction Analysis. *J Infect Dis* 1995; 172: 1352-5.

Kobasa D, Rodgers ME, Wells K, Kawaoka Y. Neuraminidase hemadsorption activity, conserved in avian influenza A viruses, does not influence viral replication in ducks. *J Virol* 1997; 71: 6706-13.

Krug RM. Clues to the Virulence of H5N1 Viruses in Humans. *Science* 2006; 311:1562-1563.

Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, Rimmelzwaan GF, Williams CS, Grenfell B. Host Species Barriers to Influenza Virus Infections. *Science* 2006; 312:394-397.

Kwok S y Higuchi R. Avoiving false positives with PCR. *Nature* 1989; 339:237-238.

Kynel J, Prochazka B, Goddard NL, Havlickova M, Castkova J, Otavova M, Kriz B. A study of excess mortality during influenza epidemics in the Czech Republic, 1982-2000. *Eur J Epidemiol* 2005; 20(4): 365-71.

Lamb RA and Krug RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Virology*, 3rd edition. New York: Lippincott-Raven Press; 1996. p. 1353-1395.

Leitmeyer K, Buchholz U., Kramer M., Schweiger B. Enhancing the predictive value of throat swabs in virological influenza surveillance. *Euro Surveill* 2002; 7(12):180-3.

Li J, Chen S, Evans D. Typing and Subtyping Influenza Virus Using DNA Microarrays and Multiplex Reverse Transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2): 696-704.

Liolios L, Jenney A, Spelman D, Kotsimbos T, Catton M, Wesselingh S. Comparison of a Multiplex Reverse Transcription-PCR-Enzyme Hybridization Assay with Conventional Viral Culture and Immunofluorescence Techniques for the Detection of Seven Viral Respiratory Pathogens. *J Clin Microbiol* 2001; 39(8): 2779-2783.

Loens K, Goossens H, de Laat C, Foolen H, Oudshoorn P, Pattyn S, Sillekens P, Ieven M. Detection of rhinoviruses by tissue culture and two independent amplification techniques, nucleic acid sequence-based amplification and reverse transcription-PCR, in children with acute respiratory infections during a winter season. *J Clin Microbiol* 2006; 44:166-171.

Long CE, Hall CB, Cunningham CK, Weiner LB, Alger KP, Gouveia M, Colella CB, Schnabel KC, Barker WH. Influenza surveillance in community-dwelling elderly compared with children. *Arch Fam Med* 1997; 6:459-65.

Low D. Reducing antibiotic use in influenza: challenges and rewards. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14: 298-306.

Lu XH, Tumpey TM, Morken T, Zaki SR, Cox N, Katz JM. A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A H5N1 viruses isolated from humans. *J Virol* 1999; 73: 5903-11.

Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular method. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(4):716-47.

Malakhov MP, Aschenbrenner ML, Smee KF, Wandersee MK, Sidwell RW, Gubareva LV, Mishin VP, Hayden FG, Kim DH, Ing A, Campbell ER, Yu M y Fang F. Sialidase Fusion Protein as a Novel Broad-Spectrum Inhibitor of Influenza Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(4):1470-1479.

Martínez A, Domínguez A y Grupo de Trabajo de Vigilancia de la Gripe en Cataluña. Vigilancia epidemiológica de la gripe: indicadores directos e indirectos. *Vacunas* 2002; 3(Supl 1):16-23.

Mateo S, Larrauri A, Mesonero C. La vigilancia de la gripe. Nuevas soluciones a un viejo problema. *Gaceta Sanitaria* 2006; 20(1):67-73.

Mateo S, Sánchez LP. La notificación de casos de enfermedades. Un siglo de tradición. *Gaceta Sanitaria.* 2002; 16:362-4

Mayoral JM, Puell L, Pérez E, Gallardo V, Duran E, Fernández JC, Guillén J, Carmona JC, Andérica G, Mateos I, Navarro JM, Pérez M, Daponte A. Behaviour of the pandemic H1N1 influenza virus in Andalusia, Spain, at the onset of the 2009-10 season. *Euro Surveill* 2009; 14(49):1-4.

Meerhoff TJ, Meijer A, Paget WJ. Methods for sentinel virological surveillance of Influenza in Europe – an 18- country survey. *Euro Surveill* 2004; 9(1): 34-8.

Meijer A, Valette M, Manuguerra, Pérez P, Paget J, Brown C, van der Velden K. Implementation of the Community Network of Reference Laboratories for Human Influenza in Europe. *J Clin Virol* 2005; 34:87-96.

Mendoza J, Navarro JM, Rojas A, de la Rosa M . Evaluation of immunofluorescence, two enzyme immunoassays and the shell vial assay for detection of respiratory syncytial virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 40-42.

Ministerio de Sanidad y Consumo. Plan nacional de preparación y respuesta ante una pandemia de gripe. Madrid; 2005.

Ministerio de Sanidad y Política Social. Plan Nacional de Preparación y Respuesta ante una pandemia de gripe. Vigilancia Epidemiológica de casos humanos de infección por virus pandémico (H1N1) 2009. Madrid; 2009.

Monto AS . Studies of the community and family: acute respiratory illness and infection. *Epidemiol Rev* 1994; 16: 351-73.

Monto AS, Kioumeh F. The Tecumseh study of respiratory illness. IX. Occurrence of influenza in the community, 1966-1971. *Am J Epidemiol* 1975; 102: 553-63.

Morishima T, Togashi T, Yokota S, Okuno Y, Miyazaki C, Tashiro M, Okabe N. Encephalitis and Encephalopathy Associated with an Influenza Epidemic in Japan. *Clin Infect Dis* 2002; 35:512-7.

Munoz FM. The impact of influenza in children. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002; 13: 72-8

Navarro JM, Mayoral JM, Pérez M, Rodríguez J, Carratalá J y Gallardo V. Infección en humanos por virus de la gripe A(H1N1)v: revisión al 30 de octubre de 2009. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009. doi:10.1016/j.eimc.2009.11.001.

Navarro JM, Pérez M, Cantudo P, Petit C, Jiménez M, de la Rosa M. Influenza-like illness criteria were poorly related to laboratory-confirmed influenza in a sentinel surveillance study. *J Clin Epidemiol* 2005; 58:275-279.

Navarro JM, Sanbonmatsu S, Pérez M, de la Rosa M. Rapid detection of respiratory viruses by shell vial assay using simultaneous culture of Hep-2, LLC-MK2, and MDCK cells in a single vial. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2346-7.

Neiryneck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Min Jou, Fiers W . A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nature Med* 1999; 5: 1157-1163.

Nelson M, Simonsen L, Viboud C, Miller M, Holmes E. The origin and global emergence of adamantane resistant A/H3N2 influenza viruses. *Virology* 2009; 388:270-278.

Neuzil KM, Dupont WD, Wright PF, Edwards KM . Efficacy of inactivated and cold adapted vaccine against influenza A infection 1985-1990: the pediatric experience. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: 733-40.

Neuzil KM, Mellen BG, Wright PF, Mitchell EF Jr, Griffin MR.

The effect of influenza on hospitalizations, outpatient visits, and courses of antibiotics in children. *N Engl J Med* 2000; 342: 225-31.

Neuzil KM, Zhu Y, Griffin MR, Edwards KM, Thompson JM, Toleefson SJ, Wright PF . Burden of interpandemic influenza in children younger than 5 years: a 25-years prospective study. *J Infect Dis* 2002; 185: 147-52.

Nichol KL, Baken L, Nelson A. Relation between influenza vaccination and outpatient visits, hospitalization and mortality in elderly persons with chronic lung disease. *Ann Intern Med* 1999; 130: 397-403.

Nichol KL, Lind A, Margolis KL, Murdoch M, Mc Fadden R, Hauge M, Magnan S, Drake M . Effectiveness of vaccination against influenza in healthy, working adults. *N Engl J Med* 1995; 333: 889-93.

Nordin J, Mullooly J, Poblete S, Strikas R, Petrucci R, Wei F, Safirstein B, Wheeler D, Nichol KL . Influenza vaccine effectiveness in preventing hospitalization and deaths in persons 65 years or older in Minnesota, New York and Oregon: data from 3 health plans. *J Infect Dis* 2001; 184: 665-70.

Noyola DE, Clark B, O'Donnell FT, Atmar RL, Greer J, Demmler GJ. Comparison of a new neuraminidase detection assay with and enzyme immunoassay, immunofluorescence and culture for rapid detection of influenza A and B viruses in nasal wash specimens. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1161-5.

Ohmit SE y Monto AS. Symptomatic Predictors of Influenza Virus Positivity in Children during the Influenza Season. *Clin Infect Dis* 2006; 43:564-8.

Organización Mundial de la Salud (OMS): boletín epidemiológico semanal-OMS 2005; 80(33): 279-287.

Osiowy C . Direct Detection of Respiratory Syncytial Virus , Parinfluenza Virus, and Adenovirus in Clinical Respiratory Specimens by a Multiplex Reverse Transcription-PCR Assay. *J Clin Microbiol* 1998; 36(11): 3149-3154.

Osterhaus A, Rimmelzwaan GF, Martina B, Bestebroer TM, Ouchier R. Influenza B virus in seals. *Science* 2000; 288: 1051-3.

Patel R, Klein DW, Espy MJ, Harmsen WS, Ilstrup DM, Paya CV, Smith TF . Optimization of detection of cytomegalovirus viremia in transplantation recipients by shell vial assay. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2984-6.

Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PL, Lai RW, Orr WK, Shortridge KF. Human infection with influenza H9N2. *Lancet* 1999; 354: 916-7.

Peltola V, Ziegler T, Ruuskanen O. Influenza A and B virus infection in children. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 299-305.

Pérez P y Aguilar JC. La importancia de los sistemas de vigilancia gripal. Servicio de Virología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid. SEIMC; 2005.

Perez P y Casas I. Infecciones producidas por los virus de la gripe aviar A (H5N1) en las poblaciones de aves del sudeste asiático y en la especie humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(7): 412-8.

Plakokefalos E, Markoulatos P, Ktenas E, Spyrou N, Vamvakopoulos N. A comparative study of immunocapture ELISA and RT-PCR for screening clinical samples from southern Greece for human influenza virus types A and B. *J Med Microbiol* 2000;49:1037-1041.

Pregliasco F, Mensi C, Camorali L, Anselmi G. Comparison of RT-PCR with other diagnostic assays for rapid detection of influenza viruses. *J Med Virol* 1998; 56:168-173.

Queiroz A, Santos F, Sassaroli A, Hársi C, Monezi T, Mehnert D. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:4614-8.

Rahman M., Vandermause M, Kiekeb B, Belongiab E. Performance of Binax NOW Flu A and B and direct fluorescent assay in comparison with a composite of viral culture or reverse transcription polymerase chain reaction for detection of influenza infection during the 2006 to 2007 season. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62: 162-166.

Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Vigilancia de la gripe en España. Sistema centinela. Resumen de la temporada 2005-2006. Instituto San Carlos III, 2006. Disponible en: <http://vgripe.isciii.es/gripe>

Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Vigilancia de la gripe en España. Sistema centinela. Resumen de la temporada 2004-2005. Instituto San Carlos III, 2005. Disponible en: <http://vgripe.isciii.es/gripe>

Red de Vigilancia centinela de gripe de Andalucía. Informe de la temporada 2007-2008.

Regoes RR y Bonhoeffer S. Emergence of Drug-Resistant Influenza Virus: Population Dynamical Considerations. *Science* 2006; 312:389-391.

Reina J . Factores de virulencia y patogenicidad en las cepas gripales (virus de la gripe A) aviáres y humanas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20(7): 346-53.

Reina J, Fernández-Baca V, Blanco I, Munar M . Comparison of Madin-Darby Canine Kidney cells (MDCK) with a Green Monkey Continuous Cell Line (Vero) and Human Lung Embryonated Cells (MRC-5) in the isolation of Influenza A virus from nasopharyngeal aspirates by shell vial culture.. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1900-1.

Reina J, Munar M, Blanco I. Evaluation of a direct immunofluorescence assay, dot-blot enzyme immunoassay, and shell vial culture in the diagnosis of lower respiratory tract infections caused by influenza A virus. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 25: 143-5.

Reina G, Pérez M, Avellón A, Trallero B, Otero A, de la Rosa M, Jiménez M, Navarro JM. Enterovirus 75, un nuevo virus patógeno en nuestro medio. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25:566-569.

Reina J, Plasencia V, Leyes M, Nicolau A, Galmés A, Arbona G. Estudio comparativo entre una técnica de reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa en tiempo real, un método de enzimoanálisis y el cultivo *Shell-vial* en la detección de virus gripales A y B en paciente adultos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28: 95-8.

Reina J, Saurina J, Fernández-Baca V, Munar M . Evaluation of and indirect immunofluorescence assay and two cell lines in the detection of influenza B virus in nasopharyngeal sample. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 532-4.

Ritchey M, Palese P y Kilbourne E. RNAs of Influenza A, B and C Viruses. *J Virol* 1976; 18(2):738-744.

Rodríguez A. La amenaza de la gripe pandémica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1998; 16(3): 107-9.

Ryan K . Influenza virus infection in children. *Adv Pediatr Infect Dis* 1995; 10: 125-56.

Seno M, Kanamoto Y, Takao S, Kakey N, Fukuda S, Umisa H . Enhancing effect of centrifugation on isolation of influenza virus from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1669-70.

Shin SR, Tsao KC, Ning HC, Huang YC, Lin TY. Diagnosis of respiratory tract viruses in 24 h by immunofluorescent staining of shell vial cultures containing Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells. *J Virol Meth* 1999; 81:77-81.

Shortridge KF. The next pandemic influenza virus?. *Lancet* 1995; 346: 1210-12.

Sistema de Vigilancia Epidemiológica de la gripe en Andalucía (SVEA). Protocolo funcional temporada 2005-2006. Sevilla: Consejería de Salud y Servicio Andaluz de Salud; 2006.

Smit M, Beynon KA, Murdoch DR, Jennings L. Comparison of the NOW influenza A and B, NOW Flu A, NOW Flu B, and directigen Flu A+B assays, and immunofluorescence with viral culture for the detection of influenza A and B viruses. *Diagn Microbiol Infec Dis* 2007; 57:67-70.

Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP Zambon M . Multiplex PCR for Typing and Subtyping Influenza and Respiratory Syncytial Viruses. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10): 2990-2995.

Suárez DL, Perdue ML, Cox N, Rowe T, Bender C, Huang J, Swayne DE. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J Virol* 1998; 72: 6678-88.

Subbarao EK, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lin W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 1998; 279: 393-6.

Sugaya N, Mitamura K, Nirasawa M, Takahashi K . The impact of winter epidemics of Influenza and Respiratory Syncytial Virus on pediatric admissions to an urban general hospital. *J Med Virol* 2000; 60: 102-6.

Sugaya N, Nerome K, Ishida M, Nerone R, Nagae M, Takeuchi Y, Osano M. Impact of influenza virus infection as a cause of pediatric hospitalization. *J Infect Dis* 1992; 165: 373-5.

Sung RY, Chan PK, Choj KC, Yeung AC, Li AM, Tang JW, Ip M, Tsen T, Nelson EA. Comparative study of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for diagnosis of acute viral respiratory infection. *J Clin Microbiol* 2008; 46(9):3073-3076.

Swayne DE and Suárez DL. Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech Off int Epiz* 2000; 19:463-482.

Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. Initial Genetic Characterization of the 1918 "Spanish" Influenza Virus. *Science* 1997; 275: 1793-1796.

Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Guozhong J, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 2005; 437: 889-893.

Templeton K, Scheltinga S, Beersma M, Kroes A, Claas E. Rapid and Sensitive Method Using Multiplex Real-Time PCR for Diagnosis of Infections by Influenza A and Influenza B Viruses, Respiratory Syncytial virus, and Parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol* 2004; 42(4): 1564-1569.

Tenorio A, Eiros JM, Rodríguez E, Bermejo JF, Dominguez M, Vega T, Castrodeza J, Ortiz R. Vigilancia de la gripe mediante diagnóstico molecular. *Rev Esp Quimioter* 2009; 22:214-220.

Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, Fukuda K. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* 2003; 289: 179-86.

Tumpey TM, Maines TR, Van Hoeven N, Glaser L, Solórzano A, Pappas C, Cox NJ, Swayne DE, Palese P, Katz JM, García-Sastre A. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science* 2007; 315:655–659).

Uphoff H, Stilianakis NI . Influenza-associated excess mortality from monthly total mortality data for Germany from 1947 to 2000. *Methods Inf Med* 2004; 43(5): 486-92.

Uyeki TM, Chong Y, Katz JM, Lim W, Ho Y, Wang SS, Tsang TH, Au WW, Chan SC, Rowe T, Hu-Primmer J, Bell JC, Thompson WW, Bridges CB, Cox N, Mak KH, Fukuda K. Lack of evidence for human to human transmission of avian influenza A (H9N2) viruses in Hong Kong, China, 1999. *Emerg Infect Dis* 2002; 39:221-6.

Valette M, Aymard M. Quality control assessment of Influenza and RSV testing in Europe: 2000-2001 season. *Euro Surveill* 2002; 7:161-165.

Venkatramani L, Bochkareva E, Lee JT, Gulati U, Graeme Laver W, Bochkarev A, Air GM . An epidemiologically significant epitope of a 1998 human influenza virus neuraminidase forms a highly hydrated interface in the NA-antibody complex. *J Mol Biol* 2006; 356(3): 651-63.

Villena A, Téllez JM, Ayuso MC, Ponce I, Morena S, Martínez M. Cinco preguntas clave en la gripe: una revisión de guías. *Rev Clin Med Fam* 2009; 2(8):412-425.

Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y . Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992; 56: 152-79.

Weekly epidemiological record. *Influenza vaccines* 2002; N° 28, 77; 229-40.

World Health Organization. 30 April 2009, posting date. CDC protocol of real-time RT-PCR for influenza A(H1N1). Available from: www.who.int/csr/resources/publicatons/swineflu/CDCrealtimerTPCR_protocol_20090428.pdf

WHO influenza surveillance. *Wkly Epidemiol Rec.* 1996; 71(47):353-357.

Wright PF and Webster RG. Orthomyxoviruses. In Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. and Straus, S.E. (eds.), *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2001. p.1533-1579.

Wright KE, Wilson G, Novosad D, Dimock C, Tan D, Weber JM . Typing and Subtyping of Influenza Viruses in Clinical Samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33(5): 1180-1184.

Wu C, Cheng X, He J, Ly X, Wang J, Deng R, Long Q, Wang X. A multiplex real-time RT-PCR for detection and identification of Influenza virus types A and B and subtypes H5 and N1. *J Virol Methods* 2008; 148(1-2):81-8.

Yuen KY, Chan PKS, Peiris M, Tsang DNC, Que TL, Shortridge KF, Cheung WKTo, Ho ETF, Sung R, Cheng AFB, and members of the H5N1 study group. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 1998; 351: 467-71.

Zambon M, Hays J, Webster A, Newman R, Keene O. Diagnosis of influenza in the community. Relationship of clinical diagnosis to confirmed virological, serologic, or molecular detection of influenza. *Arch Intern Med* 2001; 161: 2116-22.

Zitterkopf N, Leekha S, Espy M, Wood C, Priya S and Smith T. Relevance of Influenza A virus detection by PCR, Shell Vial Assay and tube cell culture to rapid reporting procedures. *J Clin Microbiol* 2006; 44(9):3366-3367.

Zou S . A Practical Approach to Genetic Screening for Influenza Virus Variants. *J Clin Microbiol* 1997; 35(10): 2623-2627.