

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



TESIS DOCTORAL

**IMPLICACIÓN DE NUEVOS VIRUS RESPIRATORIOS
EN INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA
EN LA COMUNIDAD**

Irene Pedrosa Corral
Granada, 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Irene Pedrosa Corral
D.L.: GR 3785-2011
ISBN: 978-84-694-4445-0

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 **Irene Pedrosa Corral** **“IMPLICACIÓN DE NUEVOS VIRUS RESPIRATORIOS EN INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA EN LA COMUNIDAD”** 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, marzo 2011

Fdo: Mercedes Pérez Ruíz

Fdo: Alfonso Ruíz-Bravo López

ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario
ADV	adenovirus
CoHLM	cocultivo en shell-vial con línea celular Hep-2, LLC-MK2 y MDCK
CoV	coronavirus humano
CV	coeficiente de variación
ECP	efecto citopático
EIA	enzimoinmunoanálisis
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
HA	hemaglutinina
HBoV	bocavirus humano
HEp-2	línea celular de carcinoma epidermoide de laringe humano
hMPV	metapneumovirus humano
IC	inmunocromatografía
IF	inmunofluorescencia
IRA	infección respiratoria aguda
LBA	lavado broncoalveolar
LLC-MK2	línea celular de riñón de mono Rhesus, Macaca mulatta
MDCK	línea celular de riñón canino de Cocker Spanier (“Madin Darby canine kidney”)
MEM	medio esencial mínimo de Eagle
MRC-5	línea celular diploide de pulmón humano fetal
MTV	medio de transporte de virus
NA	neuraminidasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino (del inglés “phosphate buffered saline”)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “polymerase chain reaction”)
PCR-TR	PCR en tiempo real
rpm	revoluciones por minuto
RT	retrotranscripción
SFB	suero fetal bovino

SG	síndrome gripal según los criterios de la Organización Mundial de Médicos de Familia
SSPA	Sistema Sanitario Público de Andalucía
SV	shell vial
TAAN	técnicas de amplificación de ácidos nucleicos
TBE	Tris-Bórico-EDTA
VPI	virus parainfluenza
VR	virus respiratorios
VRS	virus respiratorio sincitial

ÍNDICE

I. Introducción	15
I.1. Manifestaciones clínicas de las infecciones respiratorias virales.....	17
I.1.1. Infecciones del tracto respiratorio superior	19
I.1.2. Infecciones del tracto respiratorio inferior	21
I.2. Etiología de las infecciones respiratorias agudas de origen viral	22
I.2.1. Virus respiratorios “clásicos”	23
I.2.1.1. Virus de la gripe.....	23
I.2.1.2. Virus respiratorio sincitial (VRS)	27
I.2.1.3. Virus parainfluenza (VPI).....	29
I.2.1.4. Adenovirus (ADV).....	30
I.2.1.5. Rinovirus.....	31
I.2.1.6. Enterovirus	32
I.2.1.7. Coronavirus (CoV) OC43 y 229E	33
I.2.2. “Nuevos” virus respiratorios.....	34
I.2.2.1. Metapneumovirus humano (hMPV)	34
I.2.2.2. Nuevos coronavirus (CoV).....	35
I.2.2.3. Bocavirus humano (HBoV)	37
I.2.2.4. Nuevos poliomavirus HKU1 Y WU.....	40
I.2.3. Otros virus respiratorios.....	40
I.2.4. Otros virus no respiratorios que causan patología respiratoria.....	41
I.2.5. Infecciones mixtas o codetecciones	41
I.3. Diagnóstico microbiológico de las infecciones respiratorias agudas	42
I.3.1. Recogida y transporte de muestras.....	42
I.3.2. Microscopía electrónica	43
I.3.3. Aislamiento de los virus respiratorios en cultivo celular.....	43
I.3.4. Técnicas de detección de antígeno	45
I.3.5. Técnicas de detección de ácidos nucleicos.....	46
I.4. Programas de vigilancia epidemiológica y virológica de la gripe.....	48
I.4.1. Vigilancia epidemiológica	49
I.4.2. Vigilancia virológica	50
II. Estado actual del tema y objetivos	53
III. Material y métodos	57
III.1. Período de estudio	59
III.2. Ámbito, pacientes y muestras.....	59
III.2.1. Muestras hospitalarias.....	59
III.2.1.1. Ámbito del estudio	59
III.2.1.2. Sujetos de estudio	60
III.2.1.3. Recogida y transporte de las muestras	60
III.2.1.4 Recepción, almacenaje y procesamiento inicial de las muestras en el laboratorio.....	60

III.2.2. Muestras extrahospitalarias.....	61
III.2.2.1. Ámbito del estudio.....	61
III.2.2.2. Sujetos de estudio.....	62
III.2.2.3. Recogida y transporte de las muestras.....	62
III.2.2.4 Recepción, almacenaje y procesamiento inicial de las muestras en el laboratorio.....	64
III.3. Métodos de diagnóstico virológico.....	64
III.3.1. Técnicas de detección de antígeno.....	64
III.3.1.1. Detección de antígeno de vrs.....	64
III.3.1.2. Detección de antígeno de gripe.....	65
III.3.2. Aislamiento y detección de virus en cultivo celular.....	65
III.3.2.1. Mantenimiento y preparación de las líneas celulares.....	65
III.3.2.1.1. Preparación de shell-vial de MDCK.....	65
III.3.2.1.2. Preparación de shell-vial de cocultivo.....	66
III.3.2.1.3. Preparación de tubos de cultivo celular tradicional y SV de MRC-5.....	67
III.3.2.2. Cultivo viral.....	68
III.3.2.2.1. Cultivo en tubos de fondo plano mediante técnica “shell-vial”.....	68
III.3.2.2.2. Cultivo tradicional en tubo.....	68
III.3.2.3. Detección de virus respiratorios en cultivo.....	68
III.3.2.3.1. Inmunofluorescencia de screening sobre cultivo en SV.....	68
III.3.2.3.2. Tipado de virus gripales mediante inmunfluorescencia directa.....	69
III.3.2.3.3. Tipado de virus respiratorios.....	70
III.3.2.3.4. Detección de efecto citopático sobre cultivo en tubo tradicional.....	70
III.4. Métodos de diagnóstico molecular.....	71
III.4.1. Extracción de ácidos nucleicos.....	71
III.4.1.1. Extracción de ácidos nucleicos de la muestra.....	71
III.4.2. Retrotranscripción del ARN.....	72
III.4.3. Amplificación de ácidos nucleicos.....	73
III.4.3.1. Detección de virus de la gripe en sobrenadante de MDCK.....	73
III.4.3.2. Detección de nuevos virus respiratorios.....	75
III.4.3.1.1. Detección de HBoV.....	75
III.4.3.1.2. Detección de hMPV.....	76
III.4.3.1.3. Detección de CoV.....	77
III.5. Registro y análisis de los datos.....	79
III.5.1. Análisis descriptivo.....	79
III.5.2. Análisis bivalente para estudiar las posibles relaciones entre variables.....	79
Anexo I.....	80
Anexo II.....	83
IV. Resultados.....	85
IV.1. Datos de las muestras y de los pacientes.....	87
IV.1.1. Procedencia de las muestras.....	87
IV.1.2. Tipo de muestra.....	87
IV.1.3. Distribución estacional de las muestras.....	88

IV.1.4. Datos demográficos	89
IV.1.4.1. Sexo de los pacientes	89
IV.1.4.2. Edad de los pacientes	89
IV.2. Resultados del estudio virológico	90
IV.2.1. Frecuencia de los virus detectados	90
IV.2.2. Codetección de virus respiratorios	92
IV.3. Comparación de los datos epidemiológicos con los resultados de laboratorio.....	94
IV.3.1. Resultados generales.....	94
IV.3.2. Relación entre los virus respiratorios detectados y la temporada	95
IV.3.3. Relación entre los virus respiratorios detectados y la procedencia de las muestras.....	96
IV.3.4. Relación entre los virus respiratorios detectados y el tipo de muestra.....	97
IV.3.5. Distribución estacional de virus respiratorios	97
IV.3.6. Relación entre los virus respiratorios detectados y el sexo de los pacientes	98
.....	98
IV.3.7. Relación entre los virus respiratorios detectados y la edad de los pacientes	99
.....	99
IV.4. Papel de HBoV como patógeno respiratorio	99
IV.4.1. Relación entre las tasas de detección de HBoV y la presencia de síntomas de IRA del tracto superior	99
IV.4.2. Detección de HBoV en muestras con y sin otro virus respiratorio.....	100
IV.4.3.1. Ensayo de validación de la técnica de PCR en tiempo real	102
IV.4.3.2. Comparación de datos clínico-epidemiológicos con la carga viral de HBoV	103
IV.4.3.3. Relación entre la carga viral de HBoV y la codetección de otros virus respiratorios.....	104
V. Discusión	107
V.I. Incidencia de virus respiratorios y relación con datos demográficos y epidemiológicos	109
V.II. Tipo de virus respiratorios detectados	112
V.III. Papel de HBoV como patógeno respiratorio	116
VI. Conclusiones.....	119
VII. Bibliografía	123

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infecciosa a nivel mundial. Se estima que representan alrededor del 75% de las patologías agudas en países desarrollados, y que el 80-90% de las IRA son de etiología viral. Las infecciones del tracto respiratorio superior, como rinitis, faringitis o laringitis son las infecciones más frecuentes en niños, en quienes se producen de 3 a 8 episodios al año, que suponen a nivel mundial, según datos del CDC, 12-32 millones de episodios al año en niños de entre 1 y 2 años (**Bloom y Cohen, 2007**).

Constituyen un importante motivo de hospitalización y muerte, fundamentalmente en los meses fríos del año (**Neuzil y cols, 2003; Navarro-Marí y cols, 2003**), y sobre todo en niños menores de 2 años, ancianos mayores de 60 años, inmunocomprometidos o enfermos crónicos con cardiopatías, broncopatías crónicas, etc (**Arnold y cols, 2006**). Tienen gran impacto socioeconómico debido al amplio consumo de recursos del sistema sanitario, sobre todo por el tratamiento de sus complicaciones y el uso inapropiado de antibióticos (**Gonzales y cols, 2001; Neuzil y cols, 2000**), y debido a que son responsables de un elevado número de casos de absentismo laboral (**Barenfanger y cols, 2000**).

En la práctica clínica, no siempre se identifica un virus específico causante de la enfermedad, debido a las limitaciones de las técnicas diagnósticas disponibles y/o a la presencia de patógenos aún no conocidos (**Allander y cols, 2007b**). Las técnicas usadas tradicionalmente en el diagnóstico de laboratorio de las IRA de etiología viral han sido el cultivo celular o técnicas de inmunofluorescencia. Los recientes avances en biología molecular, y sobre todo la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han mejorado considerablemente la proporción de infecciones respiratorias no diagnosticadas. A pesar de todo, aún queda por asociar un microorganismo causal en el 40-60% de las infecciones respiratorias agudas (**Louie y cols, 2005**).

I.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS VIRALES

Una de las principales características clínicas de las infecciones respiratorias agudas es la inespecificidad de los síntomas: un mismo cuadro clínico puede estar causado por distintos agentes virales, y un virus concreto puede producir diferentes

cuadros clínicos. Además, las IRA de etiología viral suelen presentar algunas características comunes, como son la existencia de un período de incubación relativamente corto, o similares mecanismos de transmisión (**tabla I.1**).

Tabla I.1. Epidemiología y manifestaciones clínicas de las IRA de origen viral

Virus	Período de incubación	Vía de transmisión	Predominio estacional
Gripe A, B y C	1-5 días	Contacto directo, fómites	Invierno
Rinovirus	2-3 días	Contacto directo (gotas respiratorias)	Otoño y primavera
Virus respiratorio sincitial (VRS)	5 días	Contacto directo (gotas respiratorias, nosocomial)	Invierno y primavera (noviembre-marzo)
Parainfluenza 1, 2, 3, 4 y 5	2-6 días	Contacto directo gotas respiratorias, nosocomial)	P-1 y 2 (otoño-invierno) P-3 (primavera)
Adenovirus	2-14 días	Contacto directo (gotas respiratorias, vía conjuntival), vía fecal-oral	Todo el año, en forma de brotes intermitentes. Pequeñas epidemias en instituciones
Coronavirus	3-4 días	Contacto directo (gotas respiratorias)	Invierno y primavera
Metapneumovirus	¿?	Contacto directo (gotas respiratorias)	Invierno y primavera
Bocavirus	¿?	Contacto directo (gotas respiratorias)???	Todo el año (invierno y primavera) ???
Poliomavirus KIV y WUV	¿?	Contacto directo ???	Primavera
Nuevos coronavirus (HCoV-NL63 y HKU1)	¿?	Contacto directo (gotas respiratorias)	Otoño e invierno
SARS-CoV	4-7 días	Contacto directo (gotas respiratorias, nosocomial)	??
Enterovirus	2-5 días	Contacto directo (gotas respiratorias), vía fecal-oral	Brotos epidémicos en verano y otoño

IRVA: infección respiratoria de vías altas. IRVB: infección respiratoria de vías bajas.

También es muy variable la gravedad de los síntomas de una IRA, que puede determinar la necesidad de atención médica primaria, en centros de salud y consultorios, y en otras ocasiones, de atención médica hospitalaria.

Otro elemento de variabilidad es el nivel de afectación del tracto respiratorio, que da lugar a que las IRA se clasifiquen en infecciones del tracto respiratorio superior o infecciones de vías altas e infecciones del tracto respiratorio inferior o infecciones de vías bajas.

I.1.1. INFECCIONES DEL TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR

- RESFRIADO COMÚN. Es una enfermedad leve, autolimitada y muy frecuente. En los países desarrollados es una de las principales causas de absentismo laboral y escolar. Fuera de los estudios epidemiológicos, no se realiza diagnóstico etiológico; pero se ha relacionado con rinovirus, coronavirus (CoV), virus respiratorio sincitial (VRS), virus parainfluenza (VPI), adenovirus (ADV), enterovirus, virus de la gripe y metapneumovirus humano (hMPV), entre otros (**Pérez-Trallero y Vicente-Anza, 2005**).

La transmisión de los virus se produce por contacto directo con secreciones contaminadas a través de las manos, seguido de la autoinoculación en la nariz o la mucosa conjuntival, y en menor proporción por aerosoles directamente de una persona contaminada a otra sana. El período de incubación es de 12-72 horas. Las personas infectadas son contagiosas desde horas antes del inicio de los síntomas hasta el segundo o tercer día desde la aparición de los mismos.

Son frecuentes los brotes familiares, en colegios e instituciones cerradas, debido a la gran cantidad de virus excretado y la alta vulnerabilidad de los sujetos.

En el cuadro clínico predominan la congestión nasal y la rinorrea, sin fiebre. Comienza con dolor de garganta, que enseguida se acompaña de picor nasal, estornudos, rinorrea y tos.

El diagnóstico es clínico y el tratamiento sintomático.

- FARINGITIS AGUDA. Afecta a nasofaringe y/o orofaringe. Además del importante papel del estreptococo β -hemolítico del grupo A (*Streptococcus pyogenes*), los virus respiratorios (VR) (sobre todo ADV, virus de la gripe, VPI, rinovirus y VRS) son los agentes etiológicos más frecuentes, causando en torno al 40% de los casos (**Pérez-Trallero y Vicente-Anza, 2005**).

Aunque es una enfermedad leve, su impacto sociosanitario es muy elevado, ya que constituye uno de los motivos más frecuentes de consulta médica y de prescripción antibiótica.

El síntoma clave es la odinofagia, que suele acompañarse de malestar general, conjuntivitis, tos, rinorrea o diarrea. Generalmente, la ausencia de fiebre sugiere una etiología vírica.

El diagnóstico es clínico, y solo se realiza cultivo bacteriano para confirmar la implicación del estreptococo β -hemolítico.

- **LARINGITIS AGUDA.** Es la inflamación de la mucosa laríngea y de las cuerdas vocales. Cursa con disfonía y tos seca irritativa, sin fiebre. El curso es leve y autolimitado, con una duración media de 3 días. La mayoría de los episodios son secundarios a procesos víricos (por virus de la gripe, VPI, ADV, rinovirus y CoV) de las vías altas y aparecen tras cuadros catarrales (**Pérez-Trallero y Vicente-Anza, 2005**).
- **LARINGOTRAQUEOBRONQUITIS AGUDA o CRUP.** Es la inflamación del espacio subglótico que afecta a niños y que produce un cuadro característico de estridor inspiratorio, tos y ronquera. La etiología es habitualmente vírica. Se relaciona fundamentalmente con VPI tipo 1, pero también con VPI tipo 2 y 3, virus de la gripe, VRS, rinovirus y enterovirus (**Pérez-Trallero y Vicente-Anza, 2005**).

Tras un catarro en los días previos, el cuadro comienza generalmente durante la noche, de forma brusca, con tos seca y resonante, ronquera y estridor inspiratorio.
- **OTITIS MEDIA AGUDA.** Es la inflamación del oído medio, y se caracteriza por la presencia de líquido en él, junto con la aparición de síntomas locales o generales de comienzo rápido. La etiología es principalmente bacteriana (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*). La coinfección con virus se observa en el 30-40% de los casos, pero menos del 10% de las otitis medias están causadas exclusivamente por virus (**Pérez-Trallero y Vicente-Anza, 2005**).

- **SINUSITIS.** Es la inflamación de los senos paranasales, que se acompaña de congestión nasal, dolor o presión facial y rinorrea purulenta. Se produce por obstrucción al flujo de las secreciones sinusales, habitualmente secundaria a la inflamación de la mucosa nasal. Una vez que se ha producido el edema de la mucosa y la obstrucción al flujo sinusal, las secreciones quedan atrapadas y de forma secundaria se produce sobrecrecimiento bacteriano (**Pérez-Trallero y Vicente-Anza, 2005**).

En su etiología intervienen todas las posibles causas de inflamación de la mucosa, destacando los procesos infecciosos víricos y los alérgicos.

- **EPIGLOTITIS.** Es un proceso infeccioso que cursa con inflamación de la epiglotis y estructuras supraepiglóticas, y que puede producir obstrucción súbita de las vías respiratorias. La faringe y las cuerdas vocales están indemnes. La etiología suele ser bacteriana (**Pérez-Trallero y Vicente-Anza, 2005**).

I.1.2. INFECCIONES DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR

- **BRONQUITIS AGUDA.** Se caracteriza por inflamación de la mucosa bronquial, de menos de 90 días de duración. En niños y adultos sanos, la etiología vírica, por rinovirus, CoV, ADV y hMPV, es la más frecuente. También son posibles la etiología bacteriana, cuando se producen complicaciones del cuadro o en pacientes con alguna patología de base, y la etiología no infecciosa.

El síntoma principal es la tos, y la expectoración es frecuente (**Gobernado-Serrano y Menéndez-Villanueva, 2005**).

- **REAGUDIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC).** Aunque son más frecuentes las causas no infecciosas o las causas bacterianas, aproximadamente el 30% de las agudizaciones infecciosas de la EPOC están causadas por virus, sobre todo por virus de la gripe, VPI, ADV, rinovirus y VRS (**Gobernado-Serrano y Menéndez-Villanueva, 2005**).
- **BRONQUIOLITIS.** Afecta a las vías respiratorias superior e inferior, y conduce a la obstrucción de los bronquiolos. Ocurre en niños menores de 2 años, con incidencia máxima entre los 3 y 6 meses de edad. Antes del mes de vida es

menos frecuente por la protección de los anticuerpos transplacentarios maternos (**Gobernado-Serrano y Menéndez-Villanueva, 2005**).

El agente etiológico más frecuente es el VRS, que se descubre en más del 80% de los niños menores de 2 años con bronquiolitis. Otros agentes menos frecuentes son ADV, VPI, virus de la gripe B, hMPV, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, rinovirus, enterovirus y citomegalovirus en inmunodeprimidos.

El cuadro clínico comienza con coriza, congestión nasal y febrícula. En 2-5 días afecta a vías inferiores, con tos, a veces vómitos, disnea, sibilancias, retracción de músculos intercostales y dificultad para la respiración y la alimentación.

- **NEUMONÍA.** Existe afectación del parénquima pulmonar, producido por la proliferación de microorganismos en el interior de los alveolos, que provocan una respuesta inflamatoria y lesión de los tejidos (**Carratalà-Fernández y Verdaguer-Rius, 2005**).

Los VR son causa poco frecuente de neumonía (2-15%). Suelen estar implicados los virus de la gripe, VPI, ADV y VRS, sobre todo en adultos y durante los meses fríos del año. Producen un cuadro clínico conocido clásicamente como neumonía atípica, que se caracteriza por inicio subagudo, tos seca o escasamente productiva, ausencia de dolor pleurítico, predominio de las manifestaciones extrapulmonares (cefalea, artromialgias, etc.), condensación radiológica de tipo no lobular, y disociación clínico-radiológica.

I.2. ETIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS DE ORIGEN VIRAL

Tradicionalmente, en la categoría de VR se incluyen los llamados virus respiratorios “clásicos”; es decir, los virus de la gripe A y B, VRS, VPI tipos 1, 2 y 3, ADV, rinovirus, CoV 229E y OC43, y algunos enterovirus (**Henderson y cols, 1979; Yun y cols, 1995**). Pero en los últimos años se han añadido a este grupo otros virus, como hMPV (**Van den Hoogen y cols, 2001**), nuevos CoV [CoV humano NL63 (**Van der Hoek y cols, 2004**), CoV humano HKU1 (**Woo y cols, 2005**) y CoV causante del Síndrome Respiratorio Agudo Grave o CoV-SRAG (**Ksiazek y cols. 2003**)], bocavirus (HBoV, **Allander y cols, 2005**) o los nuevos poliomavirus HKU (**Allander y cols,**

2007(a)) y WU (**Gaynor y cols, 2007**), parvovirus tipo 4 (**Jones y cols, 2005**) y 5 (**Manning y cols, 2007**) o mimivirus (**La Scola y cols, 2005**).

Los VR tienen distribución mundial, y también en España se han comunicado casos debidos a estos nuevos virus (**Ordás y cols, 2006**; **Vicente y cols, 2003**).

La identificación de nuevos virus en muestras de pacientes hace necesario establecer su potencial patógeno y, para ello, redefinir los postulados de Koch (**Fredericks y Relman, 1996**), de forma que para considerar que un microorganismo es el causante de una enfermedad, es necesario que:

- el microorganismo esté presente en pacientes con la enfermedad y ausente en los sanos
- el microorganismo provoque la enfermedad en un animal sano susceptible de ser inoculado, y luego pueda ser aislado en dicho animal
- el hospedador demuestre la relación causal entre el nuevo microorganismo por una respuesta inmune específica frente al virus

Además, la asociación nuevo microorganismo-enfermedad solo se confirma con la ausencia de dicho microorganismo en grupos control.

I.2.1. VIRUS RESPIRATORIOS Í CLÁSICOSÍ

I.2.1.1. VIRUS DE LA GRIPE

I.2.1.1.1. Etiología

Pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Son virus esféricos, de 80-120 nm de diámetro, con ARN monocatenario de polaridad negativa y segmentado. Este ARN está rodeado por una nucleocápside, de simetría helicoidal, formada por un solo tipo de proteína: una nucleoproteína (NP). Rodeando la nucleocápside, existe una envoltura lipídica, que tiene su origen en la membrana celular de la célula huésped, y está revestida en su interior por la proteína matriz (M1) y la proteína transmembrana (M2).

En base a los antígenos de la NP y M1, se diferencian tres tipos: virus de la gripe A, virus de la gripe B y virus de la gripe C. Además, el virus de la gripe A se divide en subtipos en base a las glicoproteínas mayores de membrana: hemaglutinina (HA) y

neuraminidasa (NA), que se encuentran atravesando la envoltura a modo de proyecciones.

En el interior de la nucleocápside también existen tres proteínas con actividad polimerasa, asociadas al ARN y la NP: PB1 y PB2, implicadas en la transcripción del ARNm, y PA, implicada en la replicación del ARN viral.

También se han descrito dos proteínas no estructurales: NS1 y NS2, cuya función no se conoce bien.

Las dos proteínas más importantes del virus desde el punto de vista de la infectividad, antigenicidad e inmunidad son HA y NA (**Atmar, 2007**).

La HA, llamada así por su capacidad para aglutinar eritrocitos, es responsable de la unión del virus 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.

La NA tiene actividad sialidasa, y por tanto interviene en la ruptura de la unión entre los residuos de ácido siálico de la superficie celular y la HA, favoreciendo así 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.

Se han descrito en el virus A 16 HA (H1 a H16) y 9 NA (N1 a N9). La combinación de estas dos proteínas da lugar a los diferentes subtipos de gripe A. Aunque actualmente solo afectan a humanos los subtipos H1N1 y H3N2, responsables junto con el virus B de las epidemias anuales de gripe, a lo largo de la historia han circulado otros subtipos en el hombre que han producido brotes y epidemias (H2N2, H5N1, H7N7, H7N3, H9N2) (**Casas y Pozo, 2005**).

Para la gripe B solo se conoce un subtipo de hemaglutinina y neuraminidasa.

La segmentación del genoma hace posible el intercambio de material genético entre dos virus A de distintos subtipos antigénicos, incluyendo cepas que solo afectan a animales, dentro de un mismo hospedador. Esto constituye lo que conocemos como cambios antigénicos mayores (“antigenic shift”), que dan lugar a un nuevo virus, frente

al cual el hombre carece de inmunidad, y a la aparición de pandemias, que no ocurren necesariamente en los meses fríos, y se extienden en pocos meses a todo el mundo.

También se producen variaciones menores o deslizamientos antigénicos (“antigenic drift”), que afectan sobre todo a la HA y suponen la aparición de una nueva cepa o variante frente a la cual la población tiene solo una inmunidad parcial por exposiciones anteriores a las cepas originarias. Estas son responsables de las epidemias anuales y de la necesidad de reformulación de la vacuna antigripal trivalente cada año.

Parece que el subtipo H3N2 produce epidemias más graves que H1N1 o gripe B, lo que provoca mayores tasas de ingreso y mayor morbilidad (**Ortiz de Lejarazu y Rodríguez-Torres, 2005**).

El virus puede ser inactivado por radiaciones ionizantes, $\text{pH} > 9$ o < 5 , temperaturas superiores a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, detergentes iónicos y no iónicos y solventes orgánicos. Se mantiene estable durante meses en tampón fosfato salino (PBS) con albúmina y refrigerado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

I.2.1.1.2. Epidemiología

El virus de la gripe es adquirido a través de las secreciones respiratorias, por inhalación de aerosoles que contienen el virus, o por contacto directo con las secreciones contaminadas.

Una vez que el virus se deposita en las vías aéreas, puede adherirse y penetrar en las células del epitelio columnar si esto no es impedido por la acción mecánica del aparato mucociliar o por anticuerpos secretores específicos. Producida la adsorción, el virus inicia su ciclo de replicación, que dura de 4 a 6 horas. El virus puede replicarse tanto en el tracto respiratorio superior como en el inferior en personas infectadas.

El período de incubación hasta el comienzo de la enfermedad y excreción del virus es de 1 a 5 días. La duración de la excreción viral después del comienzo de la enfermedad es de 3 a 5 días en los adultos. Los niños pueden excretar el virus durante un período más prolongado (desde 6 días antes del comienzo de los síntomas hasta 13 días después). Las personas inmunodeprimidas pueden excretar el virus durante semanas.

El mayor impacto socioeconómico de la gripe recae en ancianos y niños pequeños, pues en ellos se produce el mayor número de hospitalizaciones (**Neuzil y cols, 2003; Navarro-Marí y cols, 2003**). Además, la población infantil es la responsable de la introducción, difusión y probablemente del mantenimiento de la gripe en la comunidad (**Monto, 2004; Peltola y cols, 2003**).

I.2.1.1.3. Clínica

La patología que acompaña a la infección por influenza resulta de la destrucción celular causada por la replicación viral. El virus produce inflamación difusa de la laringe, tráquea y bronquios, con inflamación de la mucosa y edema. A partir del tercero a quinto día del inicio de los síntomas, comienza la regeneración del epitelio, estando presentes, simultáneamente, procesos destructivos y procesos reparativos (**Murphy y Webster, 1996**).

La gripe no complicada se caracteriza por el comienzo brusco de síntomas sistémicos como dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, mialgias, malestar y anorexia acompañados por síntomas respiratorios, principalmente tos seca, secreción nasal y dolor de garganta (**Dolin, 1991; Treanor, 2000**). En los niños son frecuentes las náuseas, vómitos y otitis (**Ryan-Poirier, 1995; Neuzil y cols, 2002; Peltola y cols, 2003**).

Una de las complicaciones mayores de la gripe es la neumonía bacteriana secundaria. (**Glezen y Couch, 1997**).

I.2.1.1.4. Virus de la gripe A H5N1

Los primeros casos de gripe A H5N1 (gripe aviar) en humanos se detectaron en 1997 (**Beigel y cols, 2005**). Hasta entonces, se consideraba un subtipo patógeno exclusivo de aves. Estos casos se produjeron en niños y adultos jóvenes con un contacto estrecho y continuado con poblaciones de aves infectadas. Después de un período de incubación de 2-4 días, se presenta de forma muy variable, pudiendo producir desde una infección asintomática, fiebre con síntomas gastrointestinales, o neumonía y fallo multiorgánico.

I.2.1.1.5. Virus de la gripe A H1N1 variante pandémica 2009

En abril de 2009, la OMS informó de un nuevo virus de la gripe A(H1N1)v, productor de gripe en humanos en Méjico y EE.UU. (**World Health Organization, 2009**). La extensión del nuevo virus a otros países llevó a la situación de alerta pandémica, y en junio de 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) elevó el nivel de la pandemia de fase 5 a fase 6 (**Chan, 2009**).

El análisis filogenético del nuevo virus reveló un cuádruple origen, con presencia de material genético del linaje clásico porcino americano, el linaje aviar norteamericano, el linaje humano H3N2 y el inaje porcino H1N1 euroasiático (**Dawood y cols, 2009; Garten y cols, 2009**).

En la mayoría de los casos la infección cursa en forma de infección respiratoria autolimitada, no complicada, y la mayoría de los casos graves se presentaron en personas jóvenes menores de 60 años, a diferencia de lo que suele observarse durante las epidemias de gripe anuales, en donde los casos graves ocurren más frecuentemente entre niños menores de 2 años y mayores de 65 años. En un alto porcentaje de los casos graves existían factores de riesgo conocidos para padecer las complicaciones de la gripe (como enfermedad pulmonar crónica o enfermedad cardiovascular (**World Health Organization, 2009; Navarro-Marí y cols, 2010**)).

I.2.1.2. VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL (VRS)

I.2.1.2.1. Etiología

Pertenece a la familia *Paramixoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae* género *Pneumovirus*. El virión está formado por una nucleocápside (proteínas N, P y L) y el genoma, constituido por ARN monocatenario de polaridad negativa. Está rodeado por una doble capa lipídica que proviene de la membrana de la célula huésped, y en la que se encuentran tres glucoproteínas de membrana codificadas por el genoma vírico: la glucoproteína G, que se encarga de la adhesión del virus a las células; la proteína F, responsable de la fusión de la membrana del virus con la de la célula huésped; y la glucoproteína SH, con carácter hidrofóbico.

Pueden distinguirse dos grandes grupos en el VRS, por sus diferencias antigénicas: VRS A y VRS B, que circulan simultáneamente en el mismo lugar, aunque

el grupo A es más prevalente y produce infecciones más graves en niños (**Sullender, 2000**). Además, cada uno de estos tipos contiene varios subtipos.

1.2.1.2.2. Epidemiología

El VRS es un virus que solo afecta a humanos, y tiene distribución universal (**Tang y Crowe, 2007**). La infección primaria tiende a ocurrir en edades muy tempranas de la vida (en el primer año de vida en el 50% de los niños, y en los 3 primeros años en el 65-98% de los niños que acuden a guardería). La tasa de reinfección es muy elevada (del 40-70% en preescolares al 20% en escolares, adolescentes y adultos).

En lactantes produce infecciones graves, responsables del 10-20% de todos los ingresos hospitalarios en niños menores de 1 año de edad. Las infecciones repetidas a partir de los 2 años de edad suelen tener un curso más benigno, manifestándose en la mayor parte de los casos como una enfermedad de vías respiratorias altas o traqueobronquitis (**Darville y Yamauchi, 1998**).

La infección por VRS se presenta en forma de epidemias anuales durante los meses de invierno y comienzo de la primavera, entre noviembre y marzo, con máxima incidencia entre enero y marzo. Aunque en la misma temporada circulen cepas de VRS grupo A y grupo B, la proporción de ambos grupos varía de una temporada a otra.

La transmisión se produce por contacto directo, por inhalación de gotas respiratorias. El período de incubación es de 3 a 7 días. La eliminación del virus suele durar de 2 a 8 días, pero en los niños pequeños puede ser muy profusa y prolongarse hasta 3-4 semanas (**Darville y Yamauchi, 1998**).

Las infecciones intrahospitalarias son muy frecuentes.

1.2.1.2.3. Cuadro clínico

El VRS produce en primer lugar invasión directa del epitelio de vías respiratorias superiores e inferiores, y posteriormente lesión celular por un mecanismo inmune. La necrosis de bronquios y bronquiolos provoca la formación de tapones de moco, fibrina y material necrótico en las vías aéreas menores, que ocasionan obstrucción e inflamación de los bronquiolos.

El VRS puede provocar cualquier cuadro clínico, desde un resfriado común hasta una neumonía. En niños mayores y adultos suele producir infecciones del tracto respiratorio superior, con abundante rinorrea. En niños pequeños suele afectar a las

vías respiratorias bajas, en forma de bronquiolitis o broncoalveolitis (50% de los casos) y con menor frecuencia en forma de neumonía o traqueobronquitis. Tras 2-4 días de rinitis y fiebre, aparece tos seca y dificultad respiratoria progresiva, con taquipnea y tiraje intercostal y subcostal. En la exploración física se advierten sibilancias y espiración alargada. La mayoría de los lactantes sanos el proceso evoluciona hacia la curación en un par de semanas. Algunos estudios han demostrado una asociación entre la infección por VRS en estas fases precoces y el desarrollo de asma en los años sucesivos (**Rabella-García y Blanes-Juliá, 2005**).

Para evitar la difusión de la enfermedad, hay que recurrir a medidas de aislamiento de contacto de los niños hospitalizados (**Rodrigo-Gonzalo-de-Liria, 2004**).

I.2.1.3. VIRUS PARAINFLUENZA (VPI)

I.2.1.3.1. Etiología

Pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*. Se distinguen 5 serotipos en base a sus diferencias antigénicas, que pertenecen a dos géneros diferentes: *Respirovirus* (VPI serotipos 1 y 3) y *Rubulavirus* (VPI serotipos 2, 4A y 4B) (**Leland, 2007**).

Posee ARN monocatenario de polaridad negativa, rodeado por una nucleoproteína de simetría helicoidal, y por una envoltura. En la nucleocápside se encuentran las proteínas estructurales N, P y L, y la proteína de matriz M. En el exterior de la envoltura se encuentran las glicoproteínas HN (hemaglutinina-neuraminidasa), que median la unión a receptores de la célula hospedadora, y la proteína de fusión F, que media la entrada del virus a la célula infectada.

I.2.1.3.2. Epidemiología

El más frecuente es el VPI tipo 3. Es endémico durante todo el año, aunque más frecuente en los meses de primavera. Aproximadamente el 50% de los niños se infectan durante el primer año de vida y, parece ser el único de los VPI capaz de infectar a niños menores de 6 meses. Los tipos 1 y 2 producen epidemias en otoño e invierno, sobre todo en niños de 2-3 años; y el tipo 4 se comporta igual que el 3, aunque con menos virulencia.

I.2.1.3.3. Cuadro clínico

Son virus productores sobre todo de rinitis y faringitis, generalmente leves y autolimitadas. Solo en niños pequeños producen infecciones más graves, acompañadas a veces de fiebre elevada (**Rodrigo-Gonzalo-de-Liria, 2004**) (**Nuibó Bosch, 2005**). Es el caso de la laringotraqueitis aguda infantil, del que el VPI tipo 1 es el principal agente etiológico.

I.2.1.4. ADENOVIRUS (ADV)

I.2.1.4.1. Etiología

Pertenecen a la familia *Adenoviridae*, género *Mastadenovirus*. Son virus de simetría icosaédrica, sin envoltura lipídica, con una doble cadena de ADN. Desde los vértices de la cápside se prolongan unas fibras rectilíneas, en cuyo extremo distal se encuentran unas glucoproteínas, que tienen la propiedad de adherirse a los receptores de las células del hospedador, con una relativa especificidad, de forma que determinadas cepas de ADV afectan a los aparatos respiratorio o digestivo, la conjuntiva o la vejiga urinaria.

Se han descrito cerca de 100 serotipos, de los que la mitad pueden afectar al hombre, y que producen una inmunidad tipo-específica, por lo que no son raras las reinfecciones en el mismo individuo.

Al carecer de envoltura lipídica, son virus muy resistentes, lo que caracteriza los mecanismos epidemiológicos de difusión y trasmisión.

I.2.1.4.2. Epidemiología

Son una causa muy frecuente de infección en el hombre, con un pico de máxima incidencia entre los 6 y 12 meses de edad. Se producen infecciones por ADV durante todo el año, presentándose en forma de brotes intermitentes.

El virus llega al ser humano por inhalación, por contacto de la mucosa conjuntival con manos contaminadas o con gotas respiratorias suspendidas en el aire, o por vía fecal-oral. El período de incubación oscila entre 2 y 14 días, y la contagiosidad es máxima en los primeros días de enfermedad aguda (**Calicó-Bosch y Navas-Elorza, 2005**)

I.2.1.4.3. Clínica

La enfermedad por ADV está determinada por el tropismo tisular del grupo o serotipo de ADV (**Robinson y Echevarría, 2007**), que infecta a las células mucoepiteliales del tracto respiratorio, tracto gastrointestinal, córnea y conjuntiva, provocándoles una lesión directa.

Los procesos respiratorios en los que con más frecuencia se identifica ADV son rinofaringitis, faringoamigdalitis y otitis medias, acompañados la mayoría de las veces por fiebre más o menos elevada de varios días de duración.

La neumonía por ADV es especialmente grave en lactantes pequeños y pacientes inmunodeprimidos.

I.2.1.5. RINOVIRUS

I.2.1.5.1. Etiología

Pertenecen a la familia *Picornaviridae*, género *Enterovirus*. Son virus ARN, pequeños (10-30 nm), sin envoltura y de simetría cúbica. Se describen dos especies, rinovirus A y rinovirus B, en base a diferencias antigénicas, constituidas por 74 y 25 serotipos, respectivamente. Crecen mejor en los cultivos celulares sometidos a temperaturas similares a las que se encuentran en la nariz (33°C). A temperaturas más elevadas (como las de las vías respiratorias bajas) su crecimiento es inferior (**Landry, 2007**).

I.2.1.5.2. Epidemiología

Es el agente causal más común de las infecciones respiratorias de vías altas, tanto en niños como en adultos. Son mucho más frecuentes y graves en los niños de edad preescolar (en especial en los menores de 2 años). Prácticamente todos los niños han experimentado al menos un catarro por rinovirus a los 2 años (**Blomqvist y cols, 2002**).

La transmisión se produce fundamentalmente por contacto directo con secreciones contaminadas a través de las manos, seguido de autoinoculación en la nariz o la mucosa conjuntival, y en menor proporción a través de aerosoles. Las infecciones por rinovirus ocurren durante todo el año, pero predominan en otoño y primavera (**Perez-Trallero y Vicente-Anza, 2005**).

I.2.1.5.3. Cuadro clínico

El período de incubación es de 1-2 días. La primera manifestación clínica suele ser dolor de garganta, que se acompaña de picor nasal, estornudos, congestión nasal y tos. La fiebre en niños es infrecuente. También se ha visto que puede ser causante de infecciones de vías bajas en lactantes (**Andreoletti y cols, 2000**), o como desencadenante de exacerbaciones de asma en escolares (**Rawlinson y cols, 2003**)

I.2.1.6. ENTEROVIRUS

I.2.1.6.1. Etiología

El género *Enterovirus* pertenece a la familia *Picornaviridae*. Son virus pequeños, con ARN monocatenario, sin envoltura y con una cápside de simetría icosaédrica formada por cuatro proteínas (VP1, VP2, VP3 y VP4). Existe una clasificación clásica de los enterovirus en función de la capacidad de replicación en cultivos celulares y la patogenicidad en modelos animales, que distingue Poliovirus, virus Cosackie A y B y Echovirus (**Pallans y Ross, 2001**). Con la aplicación de técnicas de biología molecular a la taxonomía de los enterovirus, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus reconoce 10 especies (**ICTV, 2009**). Por otra parte, en base a la secuencia de nucleótidos de VP1 y otras características biológicas, se distinguen 63 serotipos diferentes (**Romero, 2007**)

I.2.1.6.2. Epidemiología

Las infecciones por enterovirus tienen distribución mundial. Aunque pueden afectar a personas de todas las edades, son más frecuentes en lactantes menores de 3 meses de edad. Pueden presentarse en forma de brotes epidémicos durante los meses de verano y otoño.

La forma de transmisión más frecuente es la feco-oral, aunque también se han descrito la transmisión por vía respiratoria y la vertical de madre a hijo (**Romero, 2007**).

I.2.1.6.4. Cuadro clínico

Aunque la principal diana de los enterovirus sea la intestinal, también pueden infectar a meninges, SNC, miocardio, pericardio, vías respiratorias, ojos y piel. A nivel

respiratorio, destaca la herpangina o faringitis vesicular, causada por el virus Coxsackie A (tipos 1 al 10, 16 y 22), que se presenta en niños y adultos jóvenes, con múltiples vesículas en paladar blando, lengua, faringe y amígdalas, fiebre, cefalea, odinofagia. También se han descrito cuadros de tos por Echovirus 11 y Coxsackie B5, y bronquitis aguda, bronquiolitis y neumonía por Coxsackie A9, Coxsackie B, Echovirus y Enterovirus 71 (Romero , 2007) (Fortuny-Guash y Pumarola-Suñé, 2005).

I.2.1.7. CORONAVIRUS (CoV) OC43 y 229E

I.2.1.7.1. Etiología

Pertenecen al orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*. Son pleomórficos, de 80-160 nm de diámetro, rodeados por una envoltura que contiene la proteína de adherencia viral E2, la proteína de matriz transmembrana E1 y la proteína de la nucleocápside N, y que le confiere al virus su aspecto de corona solar.

Poseen el mayor genoma viral de los virus ARN, el cual es monocatenario, y de polaridad positiva, y con gran facilidad para mutar (Kahn y McIntosh, 2005).

Crece mal en los cultivos celulares, por lo que la mayoría de los estudios epidemiológicos se basan en el diagnóstico serológico e infraestiman su importancia en las infecciones respiratorias.

Los CoV se clasifican en tres géneros en función de sus características genéticas y antigénicas:

- Género *Alphacoronavirus* o Grupo I: incluye CoV-229E y CoV NL63, y otros virus animales
- Género *Betacoronavirus* o Grupo II: incluye CoV-HKU1 y CoV-SARS y otros virus animales
- Género *Gammacoronavirus* o Grupo III: incluye únicamente patógenos aviares

I.2.1.7.2. Epidemiología

La infección permanece localizada en el tracto respiratorio superior, ya que su temperatura óptima de crecimiento es de 33 a 35 °C. Se transmite a través de gotas respiratorias.

Las infecciones suelen aparecer en invierno y primavera, esporádicamente o en forma de brotes (**Marcos-Maeso y de Benito-Hernández, 2005**).

I.2.1.7.3. Cuadro clínico

Los CoV OC43 y 229E infectan a las células epiteliales del tracto respiratorio superior, sobre todo en lactantes y niños, provocando el resfriado común. Se ha descrito que su período de incubación es de 2 a 5 días y por lo general los síntomas desaparecen a la semana. Suelen asociarse con intensa rinorrea.

Pueden exacerbar una enfermedad pulmonar crónica preexistente, como el asma o la bronquitis, y en raras ocasiones pueden provocar neumonía como el SARS (**Mahony, 2007**).

I.2.2. Í NUEVOSÍ VIRUS RESPIRATORIOS

I.2.2.1. METAPNEUMOVIRUS HUMANO (hMPV)

I.2.2.1.1. Etiología

Fue descrito por primera vez por Van der Hoogen, en Holanda, en 2001, en niños con infección respiratoria, aunque se considera que circula en el hombre desde la década de los 50 (**Van den Hoogen y cols, 2001**). Este nuevo “viejo” virus se asignó a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumoviridae* (al igual que el VRS), género *Metapneumovirus*. Es un virus ARN, de características muy similares al VRS. El virión, de 150 a 600 nm, es pleomórfico, con una envuelta que presenta proyecciones cortas o espículas, y un genoma constituido por una única molécula de ARN de polaridad negativa. Se han definido dos genotipos A y B, que se subdividen en cuatro subgenotipos, A1, A2, B1 y B2, en función de las secuencias de los genes que codifican para las proteínas F y G (**Casas y Pozo, 2005**).

I.2.2.1.2. Epidemiología

La infección por hMPV es más frecuente al final del invierno y principio de la primavera, entre febrero y abril, cuando suele descender el número de casos de infección por VRS y gripe. Su incidencia es menor que VRS, y mayor que otros virus como VPI o ADV. No obstante, de manera esporádica, se producen casos en enero, mayo, junio, octubre, noviembre y diciembre (**Boivin y cols, 2003**).

Estudios de seroprevalencia han mostrado que la presencia de anticuerpos frente a hMPV era mayor del 90% en niños de 5 años. Esto sugiere que la primera infección ocurre normalmente entre los 1 y 5 años (**Van den Hoogen y cols, 2001**). No obstante, ocurren nuevas infecciones durante toda la vida debido a la inmunidad protectora incompleta o a la adquisición de nuevos serotipos.

Se han publicado diversos estudios sobre hMPV en España (**Ordás y cols, 2006; Vicente y cols, 2003, García-García y cols, 2007**). En resumen, en nuestro medio, la infección por hMPV supone el 8-10% de los casos de IRA, y en el 17-34% se producen coinfecciones, que parecen agravar los cuadros. Alrededor del 50% son infecciones de vías bajas, su pico de incidencia se da en marzo, y los cuadros son más graves cuando afectan a menores de 6 meses y a inmunocomprometidos.

I.2.2.1.3. Cuadro clínico

En general, los niños infectados por hMPV presentan un cuadro clínico semejante a la infección respiratoria del tracto inferior asociada al VRS (**Tang y Crowe, 2007**). El espectro de la enfermedad varía desde leves síntomas de vías respiratorias superiores (rinitis, faringitis) a cuadros graves de bronquiolitis y neumonía. Los cuadros más graves aparecen en niños menores de 5 años, y los menores de 2 años tienden a ser hospitalizados con síntomas más severos como bronquiolitis o neumonía (**Van den Hoogen y cols, 2004; Ordás y cols, 2006**). También la existencia de una enfermedad subyacente, como prematuridad, enfermedad cardíaca congénita, enfermedad pulmonar crónica, inmunodeficiencia o neoplasia, parecen predisponer a la infección por hMPV. En un reciente estudio se vio que el 61% de los niños infectados por hMPV desarrollaba una otitis media aguda (**Heikkinen y cols, 2008**). Además, se ha demostrado que la coinfección entre el VRS y el hMPV supone un aumento de la gravedad del cuadro respiratorio de los niños infectados. Muchos estudios han demostrado la asociación entre hMPV y las exacerbaciones del asma (**Schildgen y cols, 2004; García-García y cols, 2007**)

I.2.2.2. NUEVOS CORONAVIRUS (CoV)

I.2.2.2.1. Etiología

El síndrome respiratorio agudo grave (SARS) es una enfermedad respiratoria viral causada por un CoV, llamado **CoV asociado al SARS (CoV-SARS)**. La primera

vez que se informó sobre el SARS fue en Asia en febrero de 2003 (**Tsang y cols, 2003**). A los pocos meses, la enfermedad se propagó por Norteamérica, Suramérica, Europa y resto de Asia. El SARS empieza generalmente con fiebre alta de más de 38 °C. Otros síntomas pueden ser cefalea, malestar general, diarrea, síntomas respiratorios leves al comienzo de la enfermedad, seguidos de tos seca a los 2-7 días y neumonía. La forma principal de propagación del SARS parece ser el contacto cercano entre las personas.

El **CoV NL63** fue descrito por primera vez en 2004, en Holanda, en un niño de 7 meses con fiebre, bronquiolitis y conjuntivitis (**Van der Hoek y cols, 2004**) y en una muestra de 1988 procedente de un niño de 8 meses con neumonía (**Fouchier y cols, 2004**). Mediante técnicas de amplificación genómica se secuenció el genoma viral, pudiendo comprobar que era un CoV del grupo I (al igual que CoV-229E). Desde entonces, se ha revelado como un virus de distribución mundial, presente en muestras respiratorias, sobre todo de niños con síntomas respiratorios (**Esper y cols, 2005; Chiu y cols, 2005**), pero también de adultos (**Arden y cols, 2006**). Diversos estudios realizados en pacientes hospitalarios y extrahospitalarios, han detectado CoV NL63 en infecciones respiratorias de vías altas o bajas, aunque se considera que es más frecuente que provoque cuadros de vías bajas, siendo una causa importante de bronquiolitis y crup (**Han y cols, 2007a**).

En 2005 se identificó el **CoV-HKU1** en Hong Kong, en una paciente de 71 años, procedente de una zona con alta incidencia de SARS, con neumonía (**Woo y cols, 2005**). Este nuevo virus se incluyó en el grupo II (al igual que CoV-OC43). Estudios seroepidemiológicos realizados posteriormente en Estados Unidos (**Esper y cols, 2006**) y Australia (**Slouts y cols, 2006**) detectan este virus en el 1-3% de los pacientes, siendo la mayoría de los estudiados niños menores de 2 años con afectación de vías altas.

I.2.2.2.2. Epidemiología

Tras la descripción de los nuevos CoV, varios grupos han publicado series en diferentes países, mostrando su distribución mundial (**Bastien y cols, 2005; Slouts y cols, 2006**).

El virus CoV-NL63 se ha detectado fundamentalmente en los meses de enero a marzo, aunque es posible que circule durante todo el año, ya que también se ha

detectado en verano (**Kuypers y cols, 2007**). Se ha identificado en el 1-10% de las infecciones respiratorias de los niños. Son frecuentes las coinfecciones con otros VR, sobre todo con VRS (**Pyrc y cols, 2007; Chiu y cols, 2005; Van der Hoek 2005**).

El CoV-HKU1, se ha detectado en individuos con infección respiratoria, fundamentalmente durante los meses de invierno. La mayor parte de los pacientes infectados son niños (**Lau y cols, 2006**).

Las infecciones por estos dos nuevos CoV se caracterizan por darse a lo largo de todo el invierno y la primavera, sin ningún pico de incidencia claro (**Kuypers y cols, 2007**). Suponen el 1-10% de todas las IRA. Son muy frecuentes las coinfecciones con otros VR (**Chiu y cols, 2005; van der Hoek 2005**). Algunos estudios han relacionado la infección por estos nuevos CoV con otros procesos no respiratorios; así se ha hablado del CoV NL63 en el síndrome de Kawasaki (**Dominguez y cols, 2006**), y del CoV HKU1 en cuadros de gastroenteritis aguda o en convulsiones febriles en lactantes (**Lau y cols, 2006**).

I.2.2.3. BOCAVIRUS HUMANO (HBoV)

I.2.2.3.1. Etiología

Fue descrito por primera vez en 2005, en un grupo de niños con IRA en Suecia (**Allander y cols, 2005**). Pertenece a la familia *Parvoviridae*, subfamilia *Parvovirinae*, género *Bocavirus*. En esta familia, el único patógeno humano que se conocía hasta la identificación de HBoV era el parvovirus humano B19 (B19V) (familia *Parvoviridae*, género *Erythrovirus*), que es agente causal del eritema infeccioso, en ocasiones conocido como “quinta enfermedad”, del hidrops fetal y de algunas formas de anemia aplásica. HBoV se clasificó como bocavirus en base a su estructura genética y de aminoácidos, similar a otros virus de este género: parvovirus *bovino* y *canino* minute virus.

Todos los miembros de la familia *Parvoviridae* son virus pequeños, sin envoltura, con nucleocápside isométrica de 18-26 nm de diámetro, que contiene una cadena sencilla de ADN lineal, de sentido positivo o negativo. El genoma tiene una longitud aproximada de 4.000 a 6.000 nucleótidos (**Allander y cols, 2007b; Allander y cols, 2005**).

El genoma completo de HBoV aún no ha sido determinado, pero se conoce que contiene tres marcos de lectura abiertos. Dos de ellos codifican las proteínas no estructurales: NS1, de función desconocida, pero relacionada con la replicación viral, y NP1, de función desconocida y ausente en otros parvovirus, y el otro codifica 2 proteínas de la cápside viral, VP1 y VP2 (**Allander y cols, 2005**).

El ADN de HBoV está presente en secreciones respiratorias y en el suero de pacientes con IRA (**Allander y cols, 2007b**), así como en las heces de pacientes con IRA y/o gastroenteritis, sugiriendo la posibilidad de que diferentes células podrían soportar la replicación in vivo de HBoV (**Allander y cols, 2007b; Fry y cols, 2007; McErlean y cols, 2007; Neske y cols, 2007; Vicente y cols, 2007**).

Hasta hace poco, solo era posible identificar HBoV por detección de su genoma. En un trabajo reciente, Brieu y cols describen partículas semejantes a parvovirus, en aspirado nasofaríngeo con ADN de HBoV positivo, mediante microscopía electrónica (**Brieu y cols, 2007**).

1.2.2.3.2. Epidemiología

La mayoría de los autores han observado un comportamiento epidemiológico similar al de VRS, con mayor tasa de detección durante los meses de invierno y primavera y picos de incidencia en los meses de diciembre y enero (**Allander y cols 2005; Smuts y Hardie, 2006; Kesebir y cols, 2006**).

Nada se conoce acerca de las rutas de transmisión de HBoV. Deben considerarse la transmisión por aerosoles y la transmisión directa, al igual que para otros VR. Desde que se conoce la presencia de DNA de HBoV en heces, la posibilidad de transmisión fecal-oral también debe ser considerada. Tampoco puede excluirse la transmisión vertical.

No se conoce el período de incubación.

Son muy frecuentes las codetecciones (5-83%).

Hay pocos estudios sistemáticos que incluyan adultos, pero los estudios disponibles indican muy baja prevalencia de HBoV detectado por PCR en tracto respiratorio de adultos (**Allander y cols, 2005; Fry y cols, 2007; Manning y cols, 2006**).

En un trabajo realizado en Japón (**Endo y cols, 2007**) se detectaron anticuerpos anti-HBoV en más del 70% de las muestras de suero de personas de 0 meses a 41 años. La seroprevalencia más baja (5,6%) se dio en el grupo de 6 a 8 meses; y la más alta en los mayores de 6 años (94,1-100%). Los hallazgos de alta prevalencia de anticuerpos y baja prevalencia de virus entre individuos de más de 6 años son consistentes y sugieren que podría haber inmunidad protectora tras pasar la infección.

I.2.2.3.3. Cuadro clínico

Parece ocasionar alrededor del 5% de las IRA (**Kesebir y cols, 2006**). Los síntomas clínicos más frecuentemente descritos en pacientes donde solo se detectó HBoV fueron tos, rinorrea y fiebre, en el contexto clínico de infecciones del tracto respiratorio superior, bronquitis, bronquiolitis, neumonía y agudización del asma.

Los síntomas pueden persistir durante 1 ó 2 semanas (rango de 2 días a 3 semanas).

Otros síntomas frecuentes en pacientes con HBoV fueron rash cutáneo, otitis media aguda (42%) (**Allander y cols, 2005**) y síntomas gastrointestinales (**Arnold y cols, 2006; Kesebir y cols, 2006; Monteny y cols, 2007; Vicente y cols, 2007**).

Diversos estudios han encontrado asociación estadística entre HBoV y síntomas respiratorios agudos. Sin embargo, los datos actuales indican que no existe un papel causal claro en muchos de los casos de IRA en los que se detecta HBoV. Así, el verdadero papel patógeno de HBoV se pone en duda (**McIntosh, 2006, Anderson, 2007**), y una de las posibilidades que se establece es la de una persistencia prolongada o una excreción viral prolongada (**Manning y cols, 2006**).

De momento, son pocos los estudios que incluyen grupos control de niños asintomáticos (**Allander y cols, 2007b; Fry y cols, 2007; Kesebir y cols, 2006; Maggi y cols, 2007; Manning y cols, 2007**). Todos ellos encuentran diferencias significativas entre los niños con IRA y los niños asintomáticos.

De esta manera, aún quedan muchas cuestiones pendientes, como el estudio de BoV en grupos control, estudios en la comunidad (hasta ahora todos los estudios se refieren a pacientes que necesitaron atención hospitalaria), la valoración de pacientes adultos y pacientes inmunodeprimidos, conocer el papel de las reinfecciones y las coinfecciones con otros VR...

I.2.2.4. NUEVOS POLIOMAVIRUS HKU1 Y WU

I.2.2.4.1. Etiología

En 2007 se identifican dos nuevos poliomavirus, KI (**Allander y cols, 2007a**) y WU (**Gaynor y cols, 2007**), en niños con infección respiratoria aguda. Al igual que otros poliomavirus, son virus pequeños, sin envoltura, de simetría icosaédrica, y con ADN circular.

I.2.2.4.2. Epidemiología

Desde estos primeros artículos, se ha detectado ADN de KI y WU en muestras respiratorias en distintos países, sugiriendo la presencia mundial de estos virus. La prevalencia descrita va desde el 0,04% (**Lin y cols, 2008**) al 2,7% (**Kiasari y cols, 2008; Yuan y cols, 2008**) para el KI; y desde el 0,4% (**Lin y cols, 2008**) y el 7% (**Bialasiewicz y cols, 2008; Han y cols, 2007b**) para el WU.

Muchos trabajos hacen hincapié en la alta tasa de codetecciones, de hasta el 74% para KI (**Bialasiewicz y cols, 2008**) y de hasta el 100% para WU (**Ren y cols, 2008**). Esto hace difícil determinar el verdadero papel patógeno de estos virus, por lo que algunos estudios han estudiado la prevalencia de WU en sanos, que oscila entre el 4 y 6% (**Han y cols 2007b; Abed y cols, 2007**).

I.2.2.4.3. Cuadro clínico

Los estudios de prevalencia se han realizado en pacientes con infección respiratoria aguda del tracto inferior (bronquiolitis, traqueobronquitis, neumonía y crup).

I.2.3. OTROS VIRUS RESPIRATORIOS

Recientemente también se han detectado los **parvovirus humanos tipo 4 y 5** (**Jones y cols, 2005**) en plasma y suero de pacientes con síndrome viral agudo, pero también en pools de plasma o en donantes sanos de plasma. Aunque aún no se conoce su papel como patógeno respiratorio, distintos estudios apuntan esta posibilidad por el comportamiento de otros parvovirus como el parvovirus B19 o HBoV.

Mimivirus es el virus ADN más grande conocido, inicialmente descubierto en *Acanthamoeba polyphagia*, y existe una evidencia creciente de que se trate de otro patógeno respiratorio. La Scola (**La Scola y cols, 2005**) describe que un 9,7% de los

pacientes con neumonía adquirida en la comunidad poseen anticuerpos frente a mimivirus, frente al 2,3% de los controles sanos. Además, en pacientes de UCI, se ha detectado el virus en LBA, así como respuesta serológica.

I.2.4. OTROS VIRUS NO RESPIRATORIOS QUE CAUSAN PATOLOGÍA RESPIRATORIA

Los virus herpes simple tipo 1 y 2 (VHS-1 y VHS-2) se transmiten por gotas respiratorias y por contacto directo. Una de las posibles manifestaciones de la primoinfección cursa con faringoamigdalitis y/o gingivostomatitis (**Jerome y Morrow, 2007; Melón-García y Santamaría-Jauregui, 2005**).

Citomegalovirus (CMV) puede detectarse en las secreciones respiratorias, siendo estas uno de los vehículos de transmisión habituales (**Hodinka, 2007**). La infección por CMV se produce por contacto directo, estrecho y prolongado. En pacientes inmunodeprimidos puede producir cuadros de neumonitis, y en inmunocompetentes un cuadro de mononucleosis, más leve que el producido por el VEB, con faringitis y adenopatías (**Pérez-Sáenz y Cisneros-Herreros, 2005**).

También existen receptores para el virus Epstein Barr sobre todo en linfocitos B y en células epiteliales de la nasofaringe. El virus está presente en saliva de personas sanas seropositivas. El contagio se produce por intercambio de saliva (besos, vasos, cubiertos). La manifestación más clásica es la mononucleosis infecciosa, que se caracteriza por la aparición de odinofagia, fiebre, adenopatías, esplenomegalia y linfocitosis, aunque no siempre el cuadro clínico es completo (**Linde y Falk, 2007**).

I.2.5. INFECCIONES MIXTAS O CODETECCIONES

En las infecciones víricas respiratorias son relativamente frecuentes las infecciones dobles, coinfecciones o infecciones por múltiples virus (**Brodzinski y Ruddy, 2009; Boivin y cols, 2003; Greenough, 2009**). La detección de dos o más agentes víricos en un mismo proceso respiratorio puede ser interpretada como infección doble (o múltiple) de las células del tracto respiratorio, sin embargo también debería contemplarse la posibilidad de que solo uno de los virus sea el verdadero causante del síndrome y el segundo (o el resto) refleje una colonización asintomática del tracto respiratorio o bien un periodo de excreción prolongado tras una infección viral previa, como se ha demostrado para ADV (**Brodzinski y Ruddy, 2009**). Por tanto,

sería más preciso hablar en general de codetección o detección múltiple de virus en una misma muestra respiratoria.

Las infecciones respiratorias atribuidas a más de un agente vírico no es un fenómeno que haya surgido con la generalización de las técnicas moleculares en los laboratorios de microbiología diagnóstica. Se admite que, con independencia de la utilización de la PCR, el porcentaje de estas infecciones aumenta proporcionalmente con el número de métodos empleados para realizar el diagnóstico.

I.3. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS

Para el diagnóstico de VR es posible utilizar diferentes técnicas diagnósticas, que cada laboratorio clínico definirá en función del tipo de población que atiende, así como del personal y recursos de que dispone.

En general, los métodos de elección para diagnóstico de las infecciones respiratorias son los métodos de diagnóstico directo, fundamentalmente las técnicas de detección de antígenos, el aislamiento viral y las técnicas de detección genómica. Los métodos de diagnóstico indirecto o métodos serológicos son poco útiles (salvo algunas excepciones como la reacción de inhibición de la hemaglutinación para el subtipado del virus de la gripe), ya que las infecciones respiratorias víricas son muy prevalentes, ocasionan frecuentes reinfecciones y afectan fundamentalmente a las mucosas, no produciéndose una respuesta inmunitaria sistémica. Así, el uso de técnicas serológicas queda prácticamente reducido a estudios epidemiológicos.

I.3.1. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Las muestras idóneas para detección de VR son: aspirado nasofaríngeo, lavado nasal, escobillón nasal y escobillón faríngeo. Deben obtenerse en los primeros días tras el inicio de los síntomas, cuando la carga viral es mayor. En caso necesario, también son útiles muestras invasivas como el LBA o material de biopsia respiratoria.

En caso de usar escobillón, éste debe tener el hisopo de rayón o poliéster y el mango de plástico, pues los hisopos de algodón o alginato cálcico y los mangos de madera pueden contener sustancias que inhiban los métodos de diagnóstico. Además, las muestras en escobillón deben enviarse en medio de transporte especial para

preservar la viabilidad de los virus, que contiene Medio Esencial Mínimo (MEM) de Eagle con un 1% de albúmina sérica bovina y mezcla antibiótica (figura I.1).



Figura I.1. Medio de transporte para virus

Las muestras se enviarán lo más rápidamente posible al laboratorio, preferiblemente refrigeradas. Deben procesarse lo más pronto posible y, si no se procesan inmediatamente, se deben mantener a 4 °C hasta un máximo de 48 h. Si la demora en el procesamiento se prevé mayor, se deben congelar a temperaturas inferiores a -70 °C. La conservación inadecuada de la muestra o la demora en su procesamiento repercuten negativamente en el diagnóstico.

I.3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La visualización de la estructura del virus en la muestra clínica mediante microscopía electrónica no es un método diagnóstico muy usado en la práctica clínica, debido a que los laboratorios clínicos no siempre tienen acceso a ella, y a que existen otras técnicas más rápidas y sencillas, que requieren menor entrenamiento del personal, como son las técnicas de detección de antígeno y/o de ácidos nucleicos.

I.3.3. AISLAMIENTO DE LOS VIRUS RESPIRATORIOS EN CULTIVO CELULAR

La técnica de referencia clásica en el diagnóstico de infecciones respiratorias víricas es el aislamiento del virus en cultivo celular (figura I.2), con la ventaja de ser un sistema abierto que, en principio, puede detectar cualquiera de los VR (mientras que otras técnicas deben ir dirigidas frente a un microorganismo concreto). Además,

permite disponer de la cepa para poder realizar serotipificación, estudios de susceptibilidad, estudios epidemiológicos, etc.



Figura I.2. Cultivo celular en tubo

Sin embargo, el cultivo presenta importantes desventajas, como la necesidad de sembrar la muestra en diferentes líneas celulares, puesto que no existe ninguna línea celular en la que puedan replicarse todos los VR, ni ningún virus capaz de replicar en todas ellas. Las más utilizadas en las IRA y los virus a los que son sensibles se muestran en tabla I.2.

Tabla I.2. Comparación de crecimiento en cultivo celular de los diferentes virus respiratorios

Virus	Línea celular				
	Hep-2	MRC-5	LLC-MK2	MDCK	A-549
VRS	++	+	+	-	-
Gripe	-	+/-	+	++	-
ADV	++	+	-	-	++
VPI	+	-	++	-	+/-
Rinovirus	+/-	++	-	-	-
CoV	-	-	-	-	-
hMPV	+	-	+	-	-
HBoV	-	-	-	-	-

Hep-2: carcinoma de laringe; MRC-5: fibroblasto de pulmón embrionario humano; LLC-MK2: riñón de mono Rhesus; MDCK: riñón canino Cocker Spaniel; A-549: carcinoma de pulmón humano.

Tomado de Navarro-Marí y Pérez-Ruiz, 2007.

Por otra parte, los resultados del cultivo celular suponen un retraso importante (5-7 días hasta el crecimiento del virus evidente por la presencia de efecto citopático, más 24-48 horas hasta la confirmación definitiva), que le resta utilidad en la práctica clínica.

La técnica de “shell-vial” (SV) (figura I.3), que consiste en inocular la muestra por centrifugación sobre una monocapa celular crecida en un cubreobjetos circular y depositado en un tubo de fondo plano, reduce el tiempo de obtención de resultados.

Tras 18-48 horas de incubación, se realiza inmunofluorescencia (IF) sobre la monocapa, con anticuerpos monoclonales frente a antígenos del virus que queremos detectar (figura I.4). Para resolver el inconveniente de necesitar varias líneas celulares para aislar todos los VR, surge la posibilidad de utilizar en el SV un cocultivo de distintas líneas celulares crecidas sobre un mismo portaobjetos, lo que permite detectar los distintos virus en un solo tubo (**Navarro-Marí y cols, 1999**).



Figura I.3. Í Shell-vialí (SV)

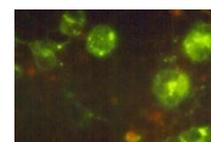
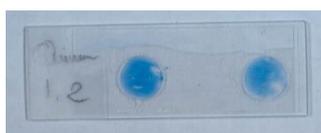


Figura I.4. Inmunofluorescencia sobre monocapa de SV

Otra desventaja es que los nuevos virus implicados en IRA, como se muestra en la tabla I.2, no se replican o lo hacen muy mal en las líneas celulares habituales.

I.3.4. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ANTÍGENO

El uso de técnicas de detección de antígeno ha facilitado en gran medida la identificación de virus aislados en cultivo o el diagnóstico rápido a partir de muestras clínicas (**Rovida y cols, 2005**). Las técnicas más usadas son la inmunofluorescencia (IF), técnicas inmunoenzimáticas (EIA) e inmunocromatografía (IC). En general, estos procedimientos presentan la ventaja teórica sobre el cultivo de poder detectar en la muestra virus no viables incapaces de replicarse posteriormente; aunque en ningún caso se ha conseguido una sensibilidad y/o especificidad equiparables al cultivo.

La IF con anticuerpos monoclonales es una técnica relativamente rápida, y cuando se hace sobre extensiones preparadas con citocentrífuga es la técnica más versátil y la que permite detectar un mayor número de virus. Su principal inconveniente es la necesidad de utilizar muestras con celularidad alta, dado que esta técnica detecta antígenos virales expresados en las células infectadas del epitelio respiratorio. Los mejores resultados se han obtenido con VRS y gripe, probablemente por la mayor carga viral en las secreciones respiratorias.

Los métodos de EIA, debido a su mayor coste (tiempo de realización, entrenamiento del personal, etc), están siendo sustituidos progresivamente por técnicas de IC. Tanto unas como las otras, se han desarrollado fundamentalmente para el

diagnóstico rápido del VRS y de los virus de la gripe (**Borek y cols, 2006; Jonathan, 2006; Smit y cols, 2007**). La sensibilidad de estas técnicas varía mucho según el kit comercial utilizado, el tipo de muestra y la edad del paciente. En este sentido, tienen menor sensibilidad en adultos que en niños (**Ohm-Smith y cols, 2004**)

Su simplicidad de uso las hace muy útiles como determinación de urgencia en cualquier laboratorio de microbiología, para facilitar el manejo del paciente y optimizar los recursos empleados ante el impacto que generan las epidemias anuales de VRS y gripe en los sistemas sanitarios. El tiempo total requerido para obtener un resultado es de 20-45 min, dependiendo de la técnica. Pero tienen una sensibilidad y especificidad en muchos casos baja (sensibilidad del 70-99% y especificidad entre 51-97%), por lo que no deben utilizarse como único procedimiento para establecer el diagnóstico definitivo.

I.3.5. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) son una herramienta muy útil en el diagnóstico de los VR, sobre todo en laboratorios que no tienen disponible el cultivo celular. La técnica más comúnmente utilizada es la PCR, aunque hay otras TAAN como la amplificación isotérmica, que también pueden emplearse en la detección de VR. Constituyen la única posibilidad para detectar nuevos VR emergentes como HBoV o CoV NL63 y HKU1, que no pueden aislarse en cultivo. En el caso de hMPV, aunque se aísla en cultivo celular y existan algunos kits comerciales de detección de antígeno (**Ebihara y cols, 2005a**), éstos no son tan sensibles como las TAAN.

Además, en el caso de los VR “clásicos”, la PCR permite detectar virus no viables en la muestra clínica, reducir el tiempo de obtención de resultados y mejorar la tasa de sensibilidad del cultivo. De ahí que se haya propuesto a las TAAN como nuevo método de referencia para el diagnóstico del virus de la gripe (**Ellis y Zambon, 2002**).

Otra posible aplicación de las TAAN es su empleo como técnica de detección de replicación de virus en cultivo celular, ya que es mucho más sensible que las técnicas de detección de antígeno (**Ebihara y cols, 2005a; Choo y Kim, 2006; Pérez-Ruiz y cols, 2007**). Esto es especialmente útil cuando se requiere recuperar la cepa para posteriores estudios, como se demanda en laboratorios pertenecientes a redes de

vigilancia virológica (vigilancia de gripe, plan de erradicación de polio, sarampión y rubéola, etc.).

Por otra parte, presentan algunas desventajas con respecto al cultivo, como la necesidad de conocer parte de la secuencia del genoma del virus diana y de diseñar una técnica específica para detectar un virus específico. Esto se ha solventado en parte con el diseño de PCRs múltiples, capaces de identificar varios VR de forma simultánea, dado que utilizan parejas de cebadores específicas de cada virus a detectar, y que se incluyen en el mismo tubo de reacción (**Coiras y cols, 2004**).

Otra desventaja de la PCR es la complejidad del proceso (extracción de ácidos nucleicos, retrotranscripción para virus ARN, amplificación, detección), que se intenta paliar con el uso de sistemas automatizados de extracción de ácidos nucleicos y de PCR en tiempo real (PCR-TR). La PCR en tiempo real realiza simultáneamente amplificación y detección, con lo que se reduce el riesgo de contaminación y el tiempo de obtención de resultados (de 10 horas para PCR convencional a 4 horas para protocolos de PCR-TR) (**Henrickson, 2004**). Las publicaciones acerca de protocolos de PCR-TR abarcan prácticamente todos los VR que se investigan (**Lu y cols, 2006; Maertzdorf y cols, 2004; Moës y cols, 2005; Lau y cols, 2006; Kuypers y cols, 2004**).

Actualmente, las TAAN empleadas por muchos laboratorios clínicos son métodos “caseros” que pueden variar de un laboratorio a otro, aunque cada vez más están apareciendo nuevos kits comerciales optimizados, que persiguen simplificar el proceso y acelerar el diagnóstico, mediante la automatización de las técnicas o empleando nuevos formatos, como por ejemplo los arrays de ácidos nucleicos (**Townsend y cols, 2006**).

En la tabla I.3. se resume la utilidad de las distintas técnicas mencionadas en el diagnóstico microbiológico de la IRA de origen viral.

Tabla I.3. Procedimientos diagnósticos útiles en las principales viriasis respiratorias

Virus	Cultivo tradicional	Cultivo en SV	Detección de antígeno	Biología molecular
VRS	++	+++	+	++
Gripe A y B	++	+++	+	++
VPI 1-4	++	++	+/-	++
ADV	++	++	+/-	++
Rinovirus	++	-	-	+++
CoV	-	-	-	+++
hMPV	+	-	+/-	+++
HBoV	-	-	-	+++

Tomado de Navarro-Marí y Pérez-Ruiz, 2007.

I.4. PROGRAMAS DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA Y VIROLÓGICA DE LA GRIPE

La capacidad del virus de la gripe de experimentar constantes cambios antigénicos, así como la posibilidad de una pandemia de gripe que afecte en pocos meses a toda la población mundial, hacen necesario establecer una adecuada vigilancia epidemiológica y virológica de gripe.

Desde 1968, la OMS lleva a cabo una vigilancia virológica de la gripe con la ayuda de una red de 131 Centros Nacionales de Gripe repartidos por todo el mundo, y cuya misión es aislar y caracterizar los virus gripales circulantes en su área geográfica. Estos virus son luego comparados entre sí en cuatro centros colaboradores de referencia (con sede en Tokio, Melbourne, Londres y Atlanta), con el fin de detectar y evaluar la importancia de las nuevas variantes detectadas. La declaración de estos datos virológicos y el acceso a la información generada se realiza a través de Internet mediante un sistema denominado Flunet (<http://www.who.int/csr/disease/influenza/influenzane트워크/en/index.html/>). En España, son Centros Nacionales de Gripe de la OMS: el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III de Majadahonda (Madrid), el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico y la Universidad de Barcelona y el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico y la Universidad de Valladolid.

En Europa existe desde 1992 un proyecto llamado EISS (European Influenza Surveillance Scheme), al que pertenece España, que recoge y analiza de forma

integrada, la vigilancia virológica y epidemiológica, para proporcionar a las administraciones nacionales y autoridades sanitarias una información de la actividad gripal que facilite la planificación de medidas de prevención y control. Puede accederse a esta información en el Boletín-EISS (<http://www.eiss.org>).

La vigilancia de la gripe se basa en el análisis conjunto de los datos virológicos y clínico-epidemiológicos recogidos. Se estudian las características antigénicas y genéticas de los virus, y se determina su potencial capacidad de difusión en las poblaciones, empleando todas las técnicas necesarias.

Así, lo que se pretende con la vigilancia de la gripe es conocer las características virológicas de las cepas circulantes en cada temporada gripal con el fin de:

- establecer homología con las cepas vacunales empleadas
- establecer la similitud entre las cepas circulantes en distintas áreas geográficas en la 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

El esquema de vigilancia de la gripe en España se basa en la colaboración entre las redes de médicos centinelas de las Comunidades Autónomas y los laboratorios de Virología. El conjunto de todos ellos constituye la Red Nacional de Vigilancia de la Gripe. Este sistema de vigilancia posee un protocolo de trabajo que recoge tanto la metodología básica como fichas para la notificación de casos y recogida de muestras. El centro coordinador es el Instituto de Salud Carlos III, donde se informatizan e integran los datos epidemiológicos y virológicos generados durante cada semana, con el fin de ofrecer una información en conjunto de las epidemias de gripe en nuestro país. La información así elaborada se remite a las autoridades e instituciones sanitarias nacionales y a las principales redes de vigilancia internacionales (<http://cne.isciii.es>).

I.4.1. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

Para estimar la extensión de la actividad gripal, se utiliza una amplia variedad de indicadores. El principal marcador de incidencia se basa en el número de pacientes con cuadros gripales vistos en consulta. Otros indicadores que pueden emplearse son el absentismo escolar o laboral, la venta de fármacos antigripales, o la hospitalización de infecciones respiratorias agudas. El impacto de las epidemias de gripe sobre la

mortalidad es estimado de manera retrospectiva, y se evalúa como el exceso de mortalidad asociado a la gripe.

En el sistema de vigilancia español, los médicos centinela de cada Comunidad Autónoma son los encargados de la recogida semanal de la información clínico-epidemiológica, y de la selección y obtención de muestras de secreciones respiratorias de algunos enfermos para ser remitidos al laboratorio correspondiente para el análisis virológico. La distribución de los médicos centinela en cada territorio responde a criterios urbano-rurales, de dispersión geográfica, pirámide de edad, distribución laboral de la población (industrias, servicios, agricultura), etc, y debe cubrir, como mínimo, el 1% de ésta (en <http://www.seimc.org>).

En Andalucía, desde 1994, adaptándose a este sistema, funciona la Red de Vigilancia Epidemiológica de la Gripe, formada por 124 médicos de familia y pediatras, que ejercen su actividad en centros de atención primaria (centros de salud y consultorios) de toda la Comunidad Autónoma. Los datos aportados por la vigilancia epidemiológica son fundamentales para el conocimiento de la difusión e impacto clínico (frecuencia de aparición de la enfermedad, morbilidad y mortalidad) de las cepas de influenza que se aíslan cada temporada.

I.4.2. VIGILANCIA VIROLÓGICA

Hay tres tipos de laboratorios encargados de la vigilancia gripal: laboratorios regionales asociados a redes centinela, laboratorios nacionales y laboratorios internacionales, éstos últimos integrados en el sistema de vigilancia de la OMS.

Los laboratorios regionales realizan el aislamiento de los virus gripales de las muestras remitidas por los médicos centinela de su territorio y, dependiendo de la dotación tecnológica de que dispongan, podrán caracterizarlos en tipos y subtipos. 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.

El laboratorio de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves de Granada participa desde la temporada 1994-95 en el programa de

vigilancia de la gripe en Andalucía, cuya red de vigilancia está integrada en la Red Nacional de Vigilancia de la Gripe.

El papel fundamental del laboratorio de virología dentro de la red de vigilancia es el de procesar las muestras remitidas semanalmente por los médicos centinelas de la Comunidad y aislar e identificar los virus gripales circulantes. Para ello, el laboratorio debe contar con la capacidad de aislar virus gripales en uno o más sistemas de cultivo, y por tanto, disponer de las instalaciones y material necesario para mantener líneas celulares en condiciones óptimas, así como los reactivos necesarios para la correcta identificación de los virus aislados, tanto a nivel de especie como de subespecie, todo ello para cumplir los objetivos básicos de un programa de vigilancia: conseguir aislamientos precoces en la temporada gripal e identificación y caracterización temprana de los virus aislados.

La vigilancia virológica en Andalucía se lleva a cabo en los mismos centros de salud designados para la vigilancia epidemiológica.

Con los datos epidemiológicos y virológicos semanales, recibidos en el Servicio de Vigilancia Epidemiológica y Evaluación, se elabora un informe, que se difunde a:

- los médicos participantes
- la Unidad de Virología del Hospital Virgen de las Nieves de Granada
- el Centro Nacional de Epidemiología (CNE)
- el Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitaria (CNMVIS) de Majadahonda
- otras redes centinela del territorio nacional
- la dirección de todos los Centros de Salud de Andalucía

Al finalizar la temporada de gripe, se realiza un informe final de los datos generados por el Grupo de Vigilancia de Andalucía.

II. ESTADO ACTUAL DEL TEMA Y OBJETIVOS

La IRA de etiología vírica es uno de los síndromes que con más frecuencia afectan al hombre, incluyendo cuadros que van desde el resfriado común hasta otros más graves como la neumonía o la bronquiolitis. En los últimos años, gracias a la aplicación de nuevas tecnologías de detección de ácidos nucleicos, se han añadido a los VR “clásicos” (gripe, VRS, rinovirus, VPI, CoV 229E y OC43, ADV y enterovirus) otros virus capaces de producir infección respiratoria aguda: hMPV, CoV-SRAG, CoV NL63, CoV HKU1 y HBoV.

HBoV se ha identificado en secreciones respiratorias y en suero de pacientes con IRA, así como en el las heces de pacientes con gastroenteritis (con o sin IRA), aunque esto no es garantía de que se comporte como agente causal de los síntomas. Además, la elevada frecuencia de codetección de BoV junto con algún otro VR y la existencia de pocos estudios que incluyan grupos control de individuos asintomáticos, hace difícil asegurar el papel de agente causal de IRA.

Por ello, el **objetivo general** de este trabajo es analizar la presencia de virus productores de infección respiratoria aguda en nuestro medio, incluyendo la investigación de HBoV y hMPV y CoV OC43, 229E, así como nuevos CoV, NL63 y HKU1.

Los **objetivos concretos** son:

1. Screening retrospectivo de nuevos VR, HBoV, hMPV y CoV NL63 y HKU1 (así como CoV OC43 y 229E), mediante TAAN, en muestras respiratorias pertenecientes al periodo comprendido entre octubre de 2006 y septiembre de 2008.
2. Análisis de los resultados globales obtenidos en el estudio virológico de muestras de pacientes con IRA.
3. Estudio de la relación entre los datos clínico-epidemiológicos y los resultados virológicos.
4. Estudio del papel de nuevos VR en la IRA en nuestro medio.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. PERÍODO DE ESTUDIO

El estudio se realizó de manera retrospectiva sobre muestras tomadas entre octubre de 2006 y septiembre de 2008.

III.2. ÁMBITO, PACIENTES Y MUESTRAS

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, y se incluyeron en él dos grupos de muestras: muestras respiratorias de pacientes del área hospitalaria (en adelante, *muestras hospitalarias*), y muestras respiratorias de pacientes de Centros de Salud remitidas por los médicos centinela de la Red de Vigilancia de gripe en Andalucía (en adelante, *muestras extrahospitalarias*).

III.2.1. MUESTRAS HOSPITALARIAS

III.2.1.1. ÁMBITO DEL ESTUDIO

El Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada figura entre los grandes hospitales del Sistema Sanitario Público de Andalucía (SSPA), situándose como un hospital de tercer nivel, dotado de una Cartera de Servicios de alta complejidad, con equipamiento de última generación en las áreas de diagnóstico y tratamiento, y con una plantilla superior a los 4.600 profesionales.

El Hospital da cobertura al área norte de la provincia de Granada, con una población de derecho de 439.035 personas. El Hospital dispone de 1.200 camas instaladas (es decir, 2,73 camas por cada 1.000 habitantes). Atiende más de 900.000 consultas al año y es referencia del SSPA en la provincia de Granada y para las provincias de Jaén y Almería (**Hospital Virgen de las Nieves, 2010**). Constituye referencia, a nivel de nuestra Comunidad Autónoma, en distintas áreas de conocimiento (entre ellas la Unidad de Virología), lo que hace que la población de hecho sea mayor debido a esta fuerte atracción de numerosas personas de fuera de nuestra área hospitalaria.

III.2.1.2. SUJETOS DE ESTUDIO

Los sujetos incluidos en este estudio fueron personas de cualquier edad, atendidas en alguno de los servicios del Hospital (incluyendo los servicios de Urgencias), por presentar un cuadro clínico compatible con IRA.

III.2.1.3. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Las muestras estudiadas fueron lavados nasofaríngeos, exudados nasofaríngeos, LBA, exudados faríngeos y esputos.

El lavado o aspirado nasofaríngeo se realizaba, tras instilación de 1-1,5 mL de suero salino estéril en una de las fosas nasales del paciente, con un catéter conectado a una fuente de succión (jeringuilla, bomba de vacío) que hacía una aspiración suave desde la nasofaringe. El material aspirado llega hasta un contenedor estéril, que servirá como recipiente de transporte.

Para los exudados nasofaríngeo y faríngeo, se usaron hisopos flexibles, de Dacrón o rayón, con mango de alambre o plástico. Con éstos se frotaron la mucosa de nasofaringe posterior o faringe y amígdalas, evitando tocar la lengua. Después, los hisopos se colocaron en tubo con medio de transporte de virus (MTV, *anexo I*), suministrado previamente por el laboratorio de Microbiología.

El LBA se realizaba con fibrobroncoscopio, el cual se inserta hasta el árbol bronquial y se instila suero fisiológico estéril. La aspiración del líquido recupera las secreciones en un contenedor estéril.

La muestra de esputo procedía de expectoración espontánea, preferiblemente matinal.

Las muestras se enviaron al laboratorio de Microbiología en un tiempo inferior a 1h. Cada muestra se acompañó de un volante de petición que debía incluir los datos de filiación del paciente (nombre, edad, sexo), y en ocasiones la orientación diagnóstica.

III.2.1.4 RECEPCIÓN, ALMACENAJE Y PROCESAMIENTO INICIAL DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO

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.

A los tubos de muestras tomadas con escobillón se les añadió una bolita de cristal estéril y se agitaron en vórtex durante unos segundos. Se retiraron los escobillones con una pinza estéril.

En el caso de muestras de lavado o aspirado nasofaríngeo, esputo y LBA, se les añadió una o más bolitas de cristal estéril, y a veces PBS (*anexo I*) y se agitaron en vórtex para romper los restos de moco.

Tras este procesamiento inicial, cada muestra se dividió en dos alícuotas de 2 mL: una para detección de antígenos virales y/o cultivo celular, a la que se añadieron 200 µL de mezcla antibiótica (10% del total de la muestra) (*anexo I*), y se incubó a 4°C durante 30 min, y otra para detección molecular, que se congeló a -80°C.

III.2.2. MUESTRAS EXTRAHOSPITALARIAS

III.2.2.1. ÁMBITO DEL ESTUDIO

La organización de la red de Vigilancia de Gripe en Andalucía corre a cargo de la Subdirección de Coordinación de Salud (Servicio Andaluz de Salud, SAS), y del Servicio de Epidemiología y Salud Laboral (Consejería de Salud, Junta de Andalucía). Esta red lleva a cabo la vigilancia epidemiológica (médicos centinela) y vigilancia virológica (laboratorio de referencia). El laboratorio de referencia para la vigilancia virológica forma parte de la Unidad de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves de Granada. Durante las dos temporadas del estudio (2006-2007 y 2007-2008) la vigilancia virológica se llevó a cabo con las muestras enviadas por 26 médicos centinela, 19 médicos generales y 7 pediatras, que pertenecían a los siguientes centros de salud o consultorios repartidos entre las 8 provincias de la comunidad andaluza:

- Centro de Salud Adra (Adra, Almería)
- Centro de Salud Virgen del Mar-Los Molinos (Almería)
- Consultorio de Pechina (Bajo Andarax, Almería)
- Consultorio de Vera (Vera, Almería)
- Centro de Salud Conil “La Atalaya” (Conil, Cádiz)
- Centro de Salud Jerez-San Telmo (Jerez, Cádiz)
- Consultorio San Martín del Tesorillo (Jimena de la Frontera, Cádiz)
- Centro de Salud Puerto Real (Puerto Real, Cádiz)

- Centro de Salud Rodríguez Arias (San Fernando, Cádiz)
- Centro de Salud Sanlúcar Barrio Bajo (Sanlúcar de Barrameda, Cádiz)
- Centro de Salud La Marina (Córdoba)
- Centro de Salud Poniente Norte (Córdoba)
- Consultorio El Viso (El Viso, Córdoba)
- Centro de Salud La Chana (Granada)
- Centro de Salud Zaidín-Sur (Granada)
- Centro de Salud Guadix (Guadix, Granada)
- Centro de Salud Motril-Centro (Motril, Granada)
- Centro de Salud Cartaya (Cartaya, Huelva)
- Centro de Salud El Torrejón (Huelva)
- Centro de Salud Alcaudete (Alcaudete, Jaén)
- Centro de Salud Úbeda (Úbeda, Jaén)
- Centro de Salud Cártama-Estación (Cártama, Málaga)
- Centro de Salud Palma-Palmilla (Málaga)
- Centro de Salud Virgen de la Estrella (Coria del Río, Sevilla)
- Centro de Salud María Fuensanta Pérez Quirós (Sevilla)

III.2.2.2. SUJETOS DE ESTUDIO

Los sujetos incluidos en este estudio fueron personas de cualquier edad, atendidas por el médico informante o su sustituto, ya sea en urgencias o en consulta, con síndrome febril ($> 38^{\circ}\text{C}$) más un cuadro de IRA, que se encuentre dentro de los tres primeros días desde que se iniciaron los síntomas (hasta 72 horas de evolución).

III.2.2.3. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Las muestras estudiadas fueron exudados orofaríngeo y nasal, que se obtenían frotando enérgicamente 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 2 mL de MTV para la preservación de la viabilidad de virus (*anexo I*), que era suministrado previamente por el laboratorio de Microbiología a los médicos centinela. 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).



Figura III.1. Muestra de exudado nasal+faríngeo en medio de transporte de virus (1a) y bolsa isotérmica utilizados por la red centinela de gripe de Andalucía (1b)

Cada muestra se acompañó de un formulario con los siguientes datos del paciente: datos de filiación (nombre, edad, sexo), estado vacunal, presencia de fiebre, tos, rinorrea, odinofagia o síntomas gastrointestinales, tiempo de evolución de los síntomas, prescripción de antibióticos y si se consideraba “síndrome gripal” (SG) según los criterios de inclusión de la Organización Mundial de Médicos de Familia (**WONCA, 1983**) (tabla III.1).

Tabla III.1 Criterios de inclusión de síndrome gripal (Í influenza-like illness) de la WONCA

1. Epidemia de gripe más 4 de los criterios clínicos incluidos en el punto 2
2. Seis de los criterios siguientes:
 - Comienzo súbito (hasta 12 horas)
 - Tos
 - Fiebre
 - Escalofríos
 - Postración y debilidad
 - Mialgia y dolor generalizado
 - Rinitis
 - Faringitis
 - Contacto con un caso

III.2.2.4 RECEPCIÓN, ALMACENAJE Y PROCESAMIENTO INICIAL DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO

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.

Cada tubo de muestra se agitó en vórtex durante 10 seg. Tras retirar los escobillones con una pinza estéril, se añadieron 200 µL de mezcla antibiótica (*anexo I*), y se incubó a 4°C durante 30 min.

Tras este procesamiento inicial, la muestra se dividió en una alícuota para cultivo viral y otra para detección molecular que se congeló a -80°C hasta su posterior procesamiento.

III.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

III.3.1. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ANTÍGENO

Sólo se emplearon sobre muestras de lavado nasofaríngeo. Se realizaron antes de la descontaminación antibiótica de la muestra.

En primer lugar se realizó un test de detección de antígeno de VRS. Sólo cuando éste resultaba negativo, se continuaba con el test de detección de antígeno de gripe. Y sólo las muestras negativas para las dos pruebas se procesaron para cultivo viral.

III.3.1.1. DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE VRS

Se empleó el kit *Binax NOW® RSV* (*Inverness Medical Innovations, Cranfield, UK*) siguiendo las indicaciones del fabricante. Es una inmunocromatografía de membrana para detección cualitativa del antígeno de la proteína de fusión del VRS.

Las muestras con escobillón requieren un paso preparatorio en el que el hisopo debe introducirse en una solución incluida en el kit. Las pruebas con lavado nasal no necesitan esta preparación.

Para realizar la prueba, la muestra se añade a la almohadilla de color blanco situada en la parte superior de la tira de prueba y se cierra el dispositivo. El antígeno del VRS presente en la muestra reacciona uniéndose al anticuerpo conjugado con oro coloidal presente en la tira. El complejo resultante antígeno-anticuerpo migra a través de la membrana y es capturado por anticuerpos específicos inmovilizados, formando la

línea de la prueba. El exceso de anticuerpo conjugado es capturado por anti-inmunoglobulinas totales formando la línea control (figura III.2).

La prueba se completa en 15 min. Si aparecen tanto la línea específica como la línea control, el resultado es positivo. Si aparece solamente la línea de control, el resultado es negativo. Si no aparece la línea de control, el ensayo no es válido, independientemente de que aparezca o no la línea problema.

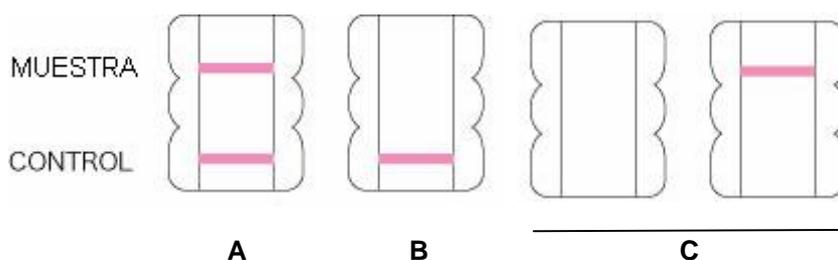


Figura III.2. Esquema de reacción inmunocromatográfica positiva (A), negativa (B) e inválida (C) con el test Binax® Now RSV

III.3.1.2. DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE GRIPE

Se empleó el kit comercial *Clearview Exact Influenza A & B (Inverness Medical Innovations)*. El fundamento es similar al que utiliza Binax Now para detección de VRS.

En este caso, el reactivo contiene anticuerpos específicos de gripe A y B conjugados con oro coloidal. El antígeno presente en la muestra reacciona con éstos, y los complejos son capturados por anticuerpos monoclonales específicos de gripe A y de gripe B inmovilizados a diferentes alturas de la tira. Igualmente, el kit contiene una línea control de reacción.

III.3.2. AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE VIRUS EN CULTIVO CELULAR

Tanto las muestras en las que la detección de antígeno fue negativa, como las muestras en las que no se realizó detección de antígeno, se inocularon en cultivo celular.

III.3.2.1. MANTENIMIENTO y PREPARACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES

III.3.2.1.1. PREPARACIÓN DE SHELL-VIAL DE MDCK

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 MEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) y mezcla antibiótica (MEM 10%, *anexo I*). Semanalmente se preparaban tubos de fondo plano para cultivo rápido mediante técnica de shell-vial (SV). Las células crecen formando monocapa sobre un cubreobjetos circular de 12 mm de diámetro incluido dentro del tubo de fondo plano.

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

1° A un frasco con células MDCK crecidas en monocapa, se le retira el medio de mantenimiento y se trata con una solución para disgregación de células a base de tripsina-EDTA a 2,5mg/mL (*anexo I*).

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

3° Se le añade el resto del MEM 10% necesario, y tras mezclar bien toda la suspensión, se reparte en frascos y tubos de fondo plano para SV a razón de 30 mL por frasco (de 250 mL) y 1 mL de suspensión de células por tubo.

4° Los tubos para shell-vial se incuban verticalmente, para permitir el crecimiento de las células en monocapa, a 37°C.

5° A las 24 h, se observa en microscopio invertido si se ha formado monocapa en los tubos, y se les cambia el medio de crecimiento por medio de mantenimiento, MEM suplementado con un 1% de SFB (MEM 1%, *anexo I*), a razón de 1 mL por tubo.

III.3.2.1.2. PREPARACIÓN DE SHELL-VIAL DE COCULTIVO

Para el aislamiento de virus de la gripe A y B, VPI 1-3, VRS y ADV se utilizaron tres líneas celulares, HEp-2, LLC-MK2 y MDCK, dispuestas en cocultivo (designado con las siglas CoHLM) en el mismo tubo de fondo plano, siguiendo el protocolo descrito por Navarro-Marí y cols (**Navarro-Marí y cols, 1999**). Para ello, las tres líneas se mantuvieron de forma independiente hasta conseguir una concentración final de 150.000 células/mL. Se preparó una suspensión de 50.000 células/ml de cada una de las líneas celulares en MEM 10%.

El procedimiento de preparación de CoHLM se resume a continuación:

1° A un frasco de 30 mL con células (HEp-2, LLC-MK2 o MDCK) crecidas en monocapa, se le retira el medio de mantenimiento y se enjuaga tres veces con solución

de disgregación de células (*anexo I*). Al observar que las células se están desprendiendo del frasco o que la tripsina se enturbia, se retira toda la tripsina y se golpea el frasco con la mano para desprender todas las células y arrastrarlas con la tripsina que hubiese quedado.

2º Tras añadir unos 30 mL del medio de crecimiento correspondiente según el tipo celular (MEM 5% para HEp-2, MEM 10% para LLC-MK2 y MEM 10% para MDCK), se disgregan las células aspirando y expulsando la suspensión unas 20 veces a través de una pipeta de plástico estéril, para homogeneizar las células.

3º Se le añade el resto de medio de crecimiento necesario, y se mezcla bien toda la suspensión. Se mezclan a partes iguales las tres líneas del cocultivo, y esta mezcla se reparte en tubos de fondo plano para SV a razón de 1 mL por tubo.

4º Los tubos se incuban a 37°C verticalmente, durante 24 h, y si tras este periodo se ha formado la monocapa se cambia el medio de crecimiento por medio de mantenimiento (MEM 0%, *anexo I*).

III.3.2.1.3. PREPARACIÓN DE TUBOS DE CULTIVO CELULAR TRADICIONAL Y SV DE MRC-5

Para el aislamiento de rinovirus y enterovirus se usó cultivo tradicional en tubo de línea celular diploide comercial de fibroblastos fetales humanos: MRC-5 (Vircell S.L., Granada, España). En muestras de LBA se investigó además la presencia de virus herpes (herpes 1 y 2, varicela zoster y citomegalovirus) mediante SV con la misma línea celular MRC-5.

Para la preparación de los tubos de cultivo celular se emplea MEM suplementado con un 20% de SFB, que se añade al preparado comercial en la cantidad suficiente para obtener una concentración de 150.000 células MRC-5/mL, y el medio resultante se reparte a razón de 30 mL por frasco de 250 mL, y de 1 mL por tubo de cultivo tradicional o SV.

Los tubos de cultivo tradicional se incuban horizontalmente con una inclinación de 15° y los de SV verticalmente, a 37°C. A las 24 h, se observa en microscopio invertido la formación de monocapa en los tubos, y se les cambia el medio de crecimiento por medio de mantenimiento (MEM 1%, *anexo I*), a razón de 2 mL por tubo.

III.3.2.2. CULTIVO VIRAL

III.3.2.2.1. CULTIVO EN TUBOS DE FONDO PLANO MEDIANTE TÉCNICA “SHELL-VIAL”

Se inocularon dos viales de fondo plano de MDCK (muestras extrahospitalarias) o CoHML (muestras hospitalarias) por cada muestra, y tres viales de MRC-5 en el caso de los LBA.

Tras retirar el medio de crecimiento del vial, se inocularon 200 μ L de muestra. Los viales fueron centrifugados a 800 x g durante 45 min a temperatura ambiente. A continuación, se dejó adsorber la muestra sobre la monocapa durante 1 h a 37°C. Posteriormente, sin decantar la muestra, se añadieron 2 mL de MEM 0% suplementado con TPCK-tripsina (*medio de inoculación, anexo I*), y se incubaron a 37°C y en agitación continua (120 rpm), durante 48 h.

III.3.2.2.2. CULTIVO TRADICIONAL EN TUBO

Se inoculó un tubo de MRC-5 por cada muestra hospitalaria. Tras retirar el medio del tubo, se inocularon 200 μ L de muestra. Se dejó adsorber la muestra sobre la monocapa durante 90 min a 37°C. Posteriormente se añadió a cada tubo 2 mL de medio de inoculación para MRC-5 (*MEM 1%, anexo I*), y se incubó a 37°C horizontalmente con una inclinación de 15°.

Los tubos se observaron diariamente con microscopio invertido, para detección de efecto citopático (ECP) hasta los 14 días.

III.3.2.3. DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS EN CULTIVO

III.3.2.3.1. INMUNOFLUORESCENCIA DE SCREENING SOBRE CULTIVO EN SV

Tras 48 horas de incubación, se retiró el sobrenadante del cultivo en SV, con pipeta estéril, colocándolo en un tubo estéril rotulado con el número de muestra.

El vial con el cubreobjetos con la monocapa celular se lavó con tampón PBS pH 7,2 aspirando con pipeta Pasteur todo el PBS tras el lavado. Se fijó con 2 mL de acetona fría, durante 10 min, tras lo cual se lavó ligeramente con PBS pH 7,2. El cubreobjetos se extrajo del vial y, una vez seco, se pegó sobre portaobjetos con DPX (pegamento) (*Aldrich Chemical Co. Dorset-England*). Se añadieron 25 μ L del reactivo de fluorescencia.

En el caso de los SV de MDCK, se empleó una inmunofluorescencia directa con una mezcla (*A+B Mix, anexo I*) de anticuerpos monoclonales específicos frente a los virus de la gripe A y B [*D³ UltraTM DFA Influenza A/Influenza B 2 mL Reagent Set (Diagnostic Hybrids, Athens, OH)*]. Los portaobjetos se incubaron en cámara oscura y húmeda a 37°C durante 20 min. Tras la incubación se lavaron con PBS pH 7,2 durante 5 min en agitación suave y posteriormente se dejaron secar.

En el caso de los SV de CoHLM se utilizó el kit de IF indirecta *IMAGENTM Respiratory Screen (OXOID, UK)*, que contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales frente a VRS, virus de la gripe A y B, VPI 1,2 y 3, y ADV, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para la detección de VHS y CMV se utilizaron, sobre el cubreobjetos del SV de MRC-5, los anticuerpos monoclonales incluidos en los kits de IF indirecta siguientes: *Cytomegalovirus DFA kit (Light Diagnostics, USA)* y *Herpes simplex 1 and 2 identification Mab (Vircell, Spain)*, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una vez seca la preparación, se le añadió medio de montaje (glicerina tamponada), se le colocó un cubreobjetos encima de cada cubreobjetos, y se observaron en microscopio de fluorescencia (*Leica DMLB*, con objetivo de 40X para detectar células con patrón típico de fluorescencia (color verde manzana).

El sobrenadante del cultivo en MDCK se utilizó para detección de virus de la gripe mediante TAAN (ver más adelante, apartado II.4.1.2).

III.3.2.3.2. TIPADO DE VIRUS GRIPALES MEDIANTE INMUNFUORESCENCIA DIRECTA

En los casos en que la inmunofluorescencia de screening fue positiva, se extrajo el cubreobjetos del segundo SV, se partió por la mitad, se fijó al portaobjetos, y se añadió el anticuerpo monoclonal de gripe A a una mitad, y el anticuerpo monoclonal de gripe B a la otra mitad. Después de esto, se continuó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior.

III.3.2.3.3. TIPADO DE VIRUS RESPIRATORIOS

En caso de que la fluorescencia de screening del CoHLM fuera positiva, se desprendían las células de la monocapa del segundo SV mediante pipeta Pasteur de plástico y se pasaban a un tubo de microcentrífuga. Se centrifugaba a 14.000 rpm en microcentrífuga durante 5 min, se decantaba el sobrenadante y se resuspendía en 0,2 mL de PBS pH=7,2. Se ponían 10 µL de sedimento por pocillo, en un total de 7 pocillos, se dejaba secar y se fijaba con acetona fría durante 10 min.

Sobre cada pocillo se añadía cada uno de los reactivos de IF directa usados para detección de VRS [*IMAGENTM Respiratory Syncytial Virus (VRS) (OXOID, UK)*], virus de la gripe A y B [*D³ UltraTM Influenza A/Influenza B 2 mL Reagent Set (Diagnostics Hybrids, Athens, OH)*], VPI 1, 2 y 3 [*IMAGENTM Parainfluenza (OXOID, UK)*] y ADV [*IMAGENTM Adenovirus (OXOID, UK)*].

III.3.2.3.4. DETECCIÓN DE EFECTO CITOPÁTICO SOBRE CULTIVO EN TUBO TRADICIONAL

El ECP de picornavirus puede aparecer a partir del tercer día tras la inoculación. Las células se redondean, el núcleo se vuelve picnótico y más tarde se fragmenta. Las células se granulan o vacuolan y se desprenden de la superficie del cristal o plástico. Característicamente, el redondeamiento se observa en grupos de células, cuyo tamaño va aumentando en el curso de varios días. Cuando el crecimiento es lento o el inóculo viral es de bajo título, el ECP puede no ser observado.

Cuando se detecta este patrón de ECP, se realizan pases para aumentar el título viral y proceder a las pruebas de identificación. Para detectar y diferenciar enterovirus y rinovirus se emplean las técnicas de sensibilidad al cloroformo y sensibilidad a pH ácido. Al ser virus desnudos, enterovirus y rinovirus son resistentes al tratamiento con cloroformo, y se utiliza la sensibilidad a pH ácido como característica distintiva (tabla III.2).

Tabla III.2. Pruebas físico-químicas para identificación de enterovirus y rinovirus

	Enterovirus	Rinovirus
Tratamiento con cloroformo	Resistente	Resistente
Tratamiento con pH ácido	Resistente	Sensible

III.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

III.4.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

III.4.1.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE LA MUESTRA

Se realizó extracción de ácidos nucleicos totales a 250 μ L de la alícuota de la muestra previamente congelada a -80°C para investigación de HBoV, hMPV y CoV. Para ello se utilizó el sistema automático *COBAS[®] AmpliPrep* y el kit comercial *COBAS[®] AmpliPrep Total Nucleic Acid Isolation Kit (TNAI)* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). En el proceso de extracción se producen los siguientes fenómenos:

1. Digestión de proteínas por una solución de proteasas para facilitar la liberación de los ácidos nucleicos.
2. Desnaturalización de proteínas tras la adición de un buffer de lisis, que consigue que ARN y ADN queden liberados y estabilizados.
3. Unión de los ácidos nucleicos a partículas de cristal magnéticas.
4. Eliminación de todas las sustancias no unidas a las partículas de cristal, como proteínas desnaturalizadas, restos celulares y posibles inhibidores de la PCR como la hemoglobina, y reducción de la concentración de sal.
5. Elución de los ácidos nucleicos purificados a altas temperaturas.

Brevemente, la técnica que se siguió fue la siguiente:

1. Comprobar que el instrumento *COBAS[®] AmpliPrep* tiene todo el material fungible necesario para realizar la técnica (SPUs, k-tips, S-tubes output).
2. Atemperar muestras y reactivos. Incubar el *Specimen Diluent (TNAI CS4)* durante 1 hora a 37°C y mezclar bien antes de su uso.
3. Introducir los cassettes en el instrumento: el CS1 en un rack de reactivos en posición A, y CS2, CS3 y CS4 en un rack en posiciones B, C, D o E.
4. Preparación de las muestras (en cabina de seguridad biológica tipo II):
Colocar en el rack de muestras los clips y los tubos S-tubes input, rotulados en el mismo orden de las muestras. Dispensar 400 μ L de la muestra, control negativo y controles positivos (250 μ L para extracción y resto de volumen “muerto” requerido por el aparato).
5. Introducir la orden de trabajo.

6. Introducir el rack de muestras en el aparato, en posiciones F, G o H.
7. Al finalizar el proceso, sacar los tubos de extracción, comprobar que todos tienen el mismo volumen de extraído y que no presentan anomalías. Rotular los tubos output con el número de muestra o control correspondiente.

III.4.1.2. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DEL SOBRENADANTE DE MDCK

Se utilizaron 200 μL de cada sobrenadante para realizar la extracción de ácidos nucleicos totales mediante el sistema automático *Nuclisens easyMAG* (*BioMérieux, Lyon, Francia*). La muestra se somete primero a lisis y unión de partículas de sílice magnética a los ácidos nucleicos liberados tras la lisis. A la cubeta de reacción se une un imán que captura las partículas de sílice unidas a los ácidos nucleicos. Durante este proceso, se realizan diversos lavados para eliminar el buffer de lisis y productos de desecho de la extracción. En el paso final, tras la adición del buffer de elución y calentamiento de la cubeta, se liberan a ésta los ácidos nucleicos puros en el volumen que se le haya programado.

Brevemente la técnica es la siguiente:

1. Los 200 μL de cada sobrenadante de cultivo se incubaron 10 min a temperatura ambiente con 2 mL de buffer de lisis (suministrado con el kit).
2. El volumen total de esta solución se transfirió a las cubetas de reacción y se les añadieron 100 μL de sílice magnética, previamente diluida 1:2 con buffer 3 de elución (suministrado con el kit). Se programó el instrumento para extracción con lisis previa externa, partiendo de 200 μL de muestra y un volumen de elución de 60 μL .
3. Tras el proceso de extracción se recogen los ácidos nucleicos eluidos en un tubo eppendorf con tapón a rosca previamente rotulado con el número de muestra o tipo de control correspondiente.

III.4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN DEL ARN

La muestra extraída se sometió a retrotranscripción (RT) utilizando el kit comercial *iScript[®] Reverse Transcriptase System* (*Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA*), que sintetiza ADN complementario (ADNc) con cebadores “random”, que consiste en una mezcla de hexanucleótidos. Con estos, se consigue la síntesis de la molécula completa de ADNc al ARN viral de partida. A 10 μL del eluido tras la

extracción se le añadieron 5 μL de agua, 4 μL del tampón de RT (5X) y 1 μL de enzima retrotranscriptasa, en un tubo de PCR de 0,2 ml de pared fina. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, CA) durante 30 min a 37°C, y posterior inactivación de la enzima durante 5 min a 85°C.

III.4.3. AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La síntesis de cebadores y sondas utilizados en los diferentes protocolos de amplificación genómica fueron sintetizados por Applied Biosystems (Cheshire, UK). El nombre, secuencia y aplicación de cada uno de ellos se muestran en el *anexo II*.

III.4.3.1. DETECCIÓN DE VIRUS DE LA GRIPE EN SOBRENADANTE DE MDCK

Se utilizó una PCR anidada múltiple, que en el mismo tubo amplifica simultáneamente virus de la gripe A subtipo H1, virus de la gripe A subtipo H3 y virus de la gripe B, siguiendo 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. En una primera PCR se incluyen tres sets de cebadores para cada uno de los tipos y subtipos a detectar (AH1, AH3 y B). La 2ª PCR o PCR anidada 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.

Primera PCR:

Para un volumen de reacción de 50 μL se utilizó: 5 μL de buffer de PCR 10X, 4 μL de MgCl_2 (25 mM), 10 pmol de cada uno de los cebadores AH1 A, AH1 FII, AH3 A, AH3 DII, BHA A y BHA DII, 0,3 μL de Taq DNA polimerasa (5U/ μL) y 10 μL del ADNc obtenido tras la RT.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, CA), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización durante 3 min a 95 °C, 35 ciclos de 1 min a 94 °C + 1 min a 50 °C + 1 min a 72 °C, y extensión final durante 10 min a 72°C.

Segunda PCR:

Para un volumen de reacción de 50 μL se utilizó: 5 μL de buffer de PCR 10X, 4 μL de MgCl_2 (25 mM), 25 pmol de cada uno de los cebadores AH1 B, AH1 EII, AH3 B, AH3 CII, BHA B y BHA CII, 1 μL de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 10 mM), 0,3 μL de Taq DNA polimerasa (5U/ μL) y 2 μL del producto de la 1ª amplificación.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador bajo las siguientes condiciones: 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 1 min a 93 °C + 1 min a 55 °C + 1 min a 72 °C, y un ciclo de extensión final de 10 min a 72°C.

La detección de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% preparado en tampón TBE 1X (*anexo I*), con 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de bromuro de etidio. Se cargó en cada pocillo del gel 10 μL del producto de la PCR con un 10% de solución de azul de bromofenol como buffer de carga. La visualización de las bandas se realizó bajo luz ultravioleta.

En cada electroforesis se incluyó el marcador de peso molecular *DNA Molecular Weight Marker VI (0.15-2.11kbp)* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

La electroforesis se llevó a cabo con una fuente de alimentación *BIO-RAD Model 200/2.0 Power Supply* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), a 110 V durante 45-50 min.

El tamaño esperado de las bandas para cada tipo y subtipo de virus de la gripe se muestra en la figura III.3.

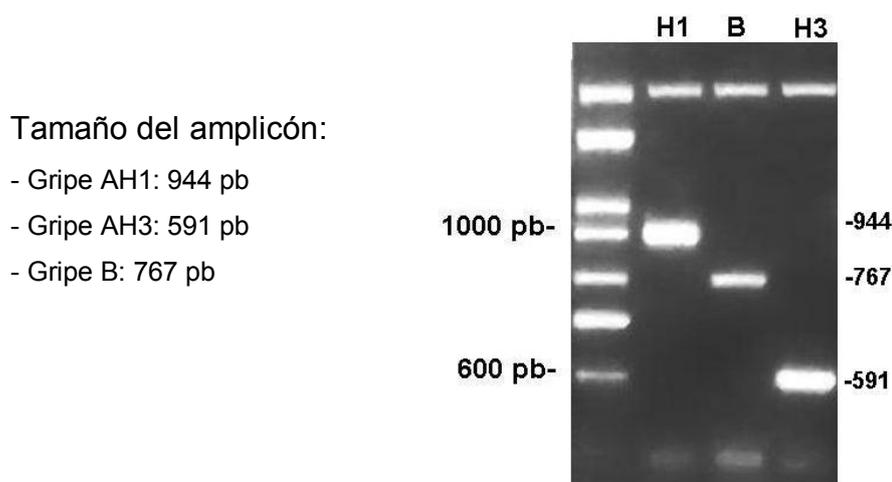


Figura III.3. Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de amplificación de la RT-PCR para virus de la gripe

III.4.3.2. DETECCIÓN DE NUEVOS VIRUS RESPIRATORIOS

III.4.3.1.1. DETECCIÓN DE HBoV

La detección de HBoV se realizó mediante PCR-TR, amplificando un fragmento de 81 pb de la región NP1 del genoma del virus (Lu y cols 2006). Para un volumen de reacción de 20 μL se utilizó: 4 μL del reactivo *LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), 0,5 μM de cebadores BoV-F y BoV-R y 0,2 μM de sonda taqman[®] BoV-PR marcada con fluoresceína, y 5 μL del extracto de ácidos nucleicos.

Esta mezcla de reacción se preparó en un capilar para PCR-TR. La reacción se llevó a cabo en el aparato LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics) según el siguiente protocolo: 10 min a 95°C, y 45 ciclos de 8 seg/95°C y 20 seg/60°C (hibridación de cebadores y extensión de la cadena por la Taq DNA polimerasa). La lectura de la fluorescencia se realizó en el canal 530 en cada ciclo de PCR tras la fase de hibridación/elongación.

En cada PCR se incluyó, desde la extracción, un control negativo (agua) y un control positivo. Inicialmente, se utilizaron como controles positivos muestras de aspirados nasofaríngeos cedidos por el Dr. Vicente (Servicio de Microbiología, Hospital Donostia, San Sebastián). Con posterioridad, se usaron muestras en las que se detectó HBoV durante el curso de este estudio.

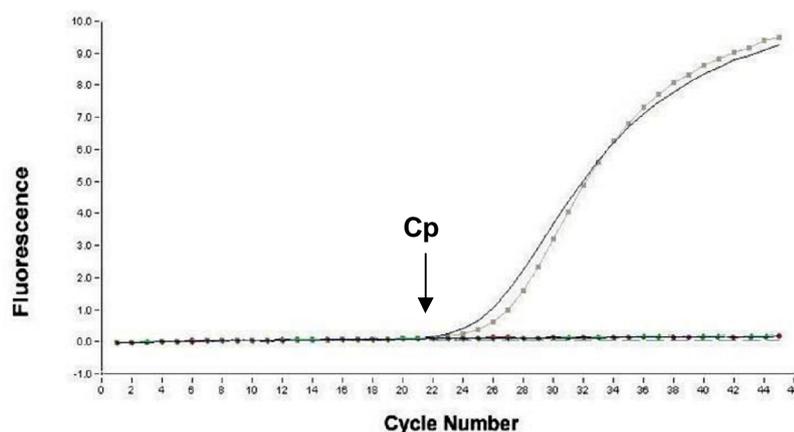


Figura III.4. Curva de fluorescencia de la PCR en tiempo real
(Cp, “crossing point”, ciclo umbral de detección de fluorescencia)

Se consideraron positivas aquellas muestras en las que el ciclo umbral de detección de fluorescencia (“Crossing point”, Cp) estaba comprendido entre 15 y 40. La figura III.4 muestra un ejemplo de una curva típica de fluorescencia obtenida tras un proceso de PCR-TR.

SEMICUANTIFICACIÓN DE HBoV

Se realizó semicuantificación de HBoV en las muestras positivas para este virus tomando como medida el Cp, como parámetro para evaluar la significación clínica real del virus.

Para ello, previamente se realizaron una serie de ensayos de validación de la técnica de PCR en tiempo real para HBoV, para determinar la reproducibilidad de la misma, y hacer uso del valor de Cp como medida semicuantitativa de la presencia de HBoV en la muestra. Se realizó medida de la variabilidad intra e interensayo de la técnica, según el siguiente procedimiento:

Variabilidad intraensayo: fue determinada calculando el coeficiente de variación (CV) de los Cp de una misma muestra analizada 10 veces dentro de una misma serie. Se utilizaron dos replicados: uno de ellos con carga viral elevada (Cp original: 24,49) y otro con carga viral baja (Cp original: 38,57).

Variabilidad interensayo: se determinó calculando el CV de los Cp de ambos replicados utilizados para la validación intraensayo, pero analizados en series diferentes realizadas en días consecutivos.

Se estableció como punto de corte el Cp de 28 para dividir a los pacientes HBoV-positivos en pacientes con carga viral elevada y carga viral baja, dado que este punto de corte había demostrado corresponderse con una carga viral de 10^4 copias/reacción en el trabajo que describe la técnica de PCR-TR utilizada en esta tesis **(Lu y cols 2006)**.

III.4.3.1.2. DETECCIÓN DE hMPV

Se investigó hMPV, previa RT (apartado III.4.2.), mediante PCR-TR según el protocolo descrito por Maertzdorf y cols **(Maertzdorf y cols, 2004)**. Este método amplifica un fragmento de 170 bp del gen conservado N del virus. Para un volumen de reacción de 20 μ L se utilizó: 4 μ L del reactivo *LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), 0,5 μ M de cebadores hMPV-F y

hMPV-R y 0,2 μM de sonda taqman[®] hMPV-PR marcada con fluoresceína, y 5 μL del ADNc.

Esta mezcla de reacción se preparó en un capilar para PCR-TR. La reacción se llevó a cabo en el aparato LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics) según el protocolo descrito en el apartado III.4.3.1.1. para HBoV.

El protocolo de PCR-TR fue el mismo que para HBoV. También se siguieron las mismas condiciones de inclusión de controles negativo y positivo.

III.4.3.1.3. DETECCIÓN DE CoV

Para la detección de CoV OC43, 229E, NL63 y HKU1 se empleó también PCR-TR, con los cebadores forward (F1, F2, F3) y reverse (R1, R2, R3) y sondas taqman[®] (P1 y P2) descritos por Kuypers y cols (**Kuypers y cols 2007**), para amplificar fragmentos de 85-100 bp del gen 1b de la polimerasa. El subtipo de CoV 229E se detectó usando el set de cebadores y sondas F3/R3/P2 y CoV NL63 con F2/R2/P1.

Para un volumen de reacción de 20 μL se utilizó: 4 μL del reactivo *LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), 0,5 μM de cebador forward y reverse y 0,2 μM de sonda taqman[®] marcada con el fluoróforo correspondiente, y 5 μL del ADNc.

Esta mezcla de reacción se preparó en un capilar para PCR-TR. La reacción se llevó a cabo en el aparato LightCycler 2.0 según el siguiente protocolo: 95 °C/10 min, 45 ciclos de 95 °C/10 seg + 60 °C/40 seg.

Los subtipos OC43 y HKU1 se detectaron ambos usando F1/R1/P1. A las muestras positivas con este set de cebadores y sondas, se les realizó PCR específica de HKU1 mediante PCR-TR con los cebadores HKU1-F y HKU1-R, que amplifican un fragmento de 444 pb del gen *pol* (**Lau y cols, 2006**). Se preparó un volumen total de 20 μL de mezcla de reacción, con 10 pmol de HKU1-F y HKU1-R, 3,2 μL de MgCl_2 y 2 μL de DNA Master SYBR Green I del kit *LightCycler[®] FastStart DNA Master Sybr Green I* (Roche Applied Science), y 4 μL de cDNA. El protocolo de PCR incluía 3 min/95 °C; 50 ciclos de 20 seg/94° C, 30 seg/50 °C y 30 seg/30 seg, seguido de un ciclo de 0 seg/95 °C, 30 seg/55 °C y 0/95°C. La detección de los amplicones mediante electroforesis se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado II.4.3.1.

Las muestras en las que se detectó banda con el tamaño esperado se consideraron positivas a HKU1, y aquellas en las que el resultado fue negativo, se consideraron positivas a OC43.

En las figuras III.5 y III.6, se muestra el algoritmo de procesamiento de las principales muestras hospitalarias y extrahospitalarias, respectivamente, para estudio de VR.

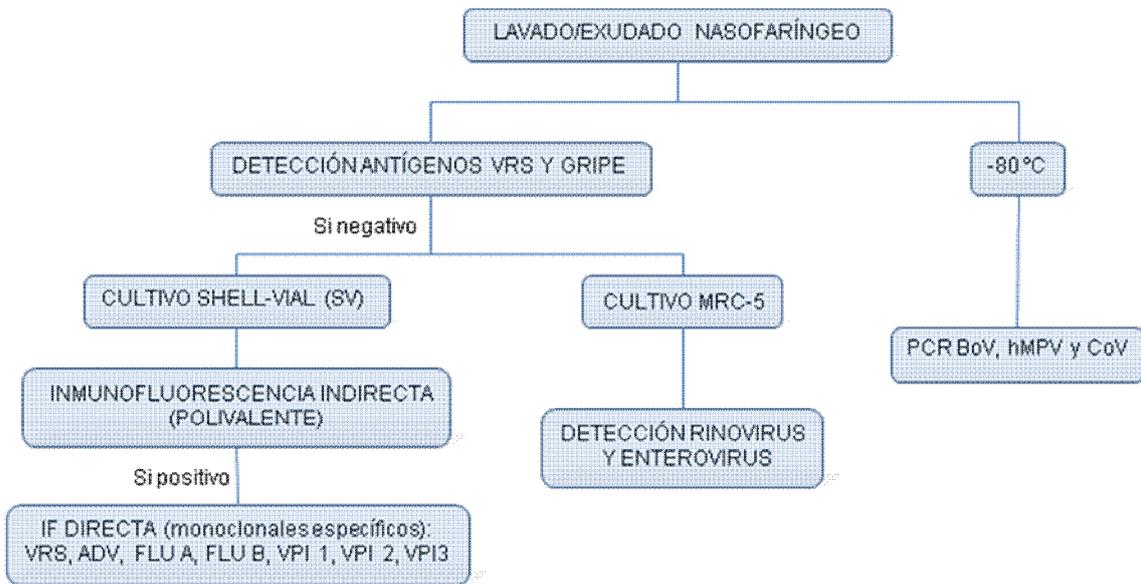


Figura III.5. Procesamiento de muestras hospitalarias

FLU, virus de la gripe

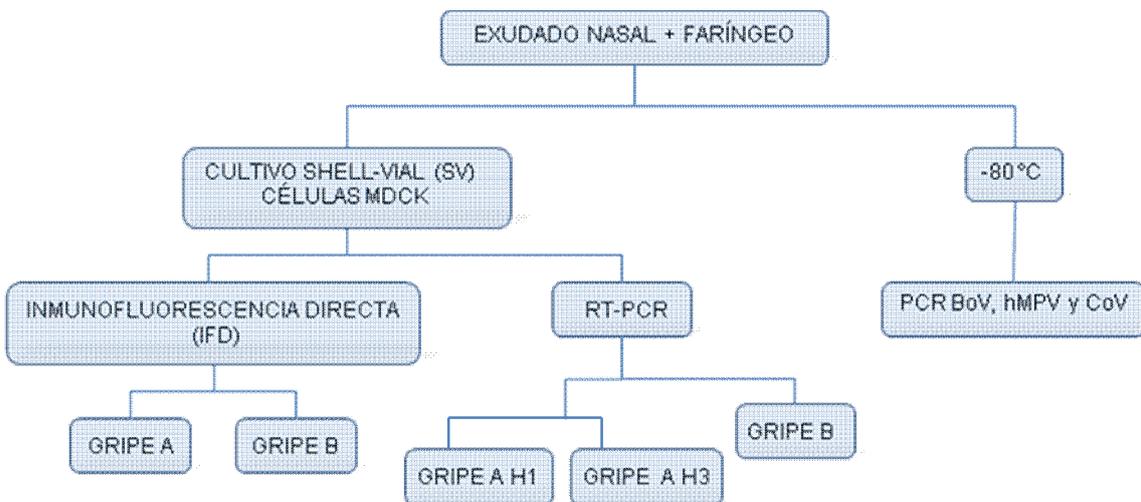


Figura III.6. Procesamiento de muestras extrahospitalarias

III.5. REGISTRO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se elaboró una base de datos en el programa MS Access XP con todos los casos incluidos en el estudio, donde se registraron las variables demográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas. En el caso de los pacientes hospitalarios en los que se detectó HBoV se analizaron sus historias clínicas y se registró si existían signos y síntomas de infección del tracto respiratorio inferior.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente con el programa SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

III.5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

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 los datos en función de la procedencia de las muestras (hospitalarias y extrahospitalarias).

III.5.2. ANÁLISIS BIVARIANTE PARA ESTUDIAR LAS POSIBLES RELACIONES ENTRE VARIABLES

La variable numérica "edad" se categorizó en 4 grupos para el análisis bivariante. Por tanto, todos los análisis se han hecho con variables cualitativas por lo que 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 (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 significativas cuando el valor que nos muestra está fuera del intervalo [-3, 3].

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

ANEXO I

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.

MEDIO DE TRANSPORTE DE VIRUS (MTV)

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

MEDIO DE INOCULACIÓN

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

MEM 0%

- MEM: 4,8 g
- 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 bidestilada c.s.p. 500 mL

MEM 1%

- MEM 0%: 500 mL
- Suero fetal bovino: 5 mL

MEM 5%

- MEM 0%: 500 mL
- Suero fetal bovino: 25 mL

MEM 10%

- MEM 0%: 500 mL
- Suero fetal bovino: 50 mL

MEM 20%

- MEM 0%: 500 mL
- Suero fetal bovino: 100 mL

MEZCLA ANTIBIÓTICA

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

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

SOLUCIÓN DE DISGREGACION DE CÉLULAS

- SOLUCIÓN EDTA
 - EDTA: 0,40 g
 - PBS pH=7.5 c.s.p.: 1000 mL
- SOLUCIÓN TRIPSINA
 - Tripsina: 2,5 g
 - PBS pH=7.5 c.s.p.1000 mL

Mezclar ambas soluciones y repartir en frascos de cristal a razón de 100 ml por frasco. Congelar a -20°C hasta su uso. Para usar descongelar, calentar a 37°C y FILTRAR por filtro de 0,22µm.

PBS (Phosphate Buffered Saline)

Es un tampón utilizado para lavar las preparaciones en las reacciones de inmunofluorescencia indirecta y como diluyente de muestras clínicas. Se reconstituye en 1 litro de agua destilada 1 frasco de polvo que contiene:

- Cloruro sódico: 7,650 g
- Fosfato disódico: 0,724 g
- Fosfato monopotásico: 0,210 g

TBE 1X

A partir de una dilución 1:10 en agua destilada de una solución de **TBE 10X**:

- TRIS base: 54g
- Ácido bórico: 27,5g
- EDTA: 9,3 g 10 mL
- Agua destilada c.s.p.: 500 mL

ANEXO II. OLIGONUCLEÓTIDOS (CEBADORES Y SONDAS) UTILIZADOS EN LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN MOLECULAR

Virus	Nombre	Tipo	Secuencia (5'3')	Gen	Referencia		
Gripe AH1	AH1 A	Cebador forward (1ª PCR)	CAG ATG CAG ACA CAA TAT GT	Hemaglutinina	Stockton y cols1998		
	AH1 FII	Cebador reverse (1ª PCR)	AAA CCG GCA ATG GCT CCA AA				
	AH1 B	Cebador forward (2ª PCR)	CTT AGT CCT GTA ACC ATC CT				
	AH1 EII	Cebador reverse (2ª PCR)	ATA GGC TAC CAT GCG AAC AA				
Gripe AH3	AH3 A	Cebador forward (1ª PCR)	CAG ATT GAA GTG ACT AAT GC				
	AH3 DII	Cebador reverse (1ª PCR)	GTT TCT CTG GTA CAT TCC GC				
	AH3 CII	Cebador forward (2ª PCR)	GCT TCC ATT TGG AGT GAT GC				
	AH3 B	Cebador reverse (2ª PCR)	AGC AAA GCT TTC AGC AAC TG				
Gripe B	BHA A	Cebador forward (1ª PCR)	GTG ACT GGT GTG ATA CCA CT				
	BHA DII	Cebador reverse (1ª PCR)	TGT TTT CAC CCA TAT TGG GC				
	BHA-B	Cebador forward (2ª PCR)	CAT TTT GCA AAT CTC AAA GC				
	BHA-CII	Cebador reverse (2ª PCR)	TGG AGG CAA TCT GCT TCA CC				
BoV	BoV-F	Cebador forward	AGA GGC TCG GGC TCA TAT CA			Región NP1 (81 pb)	Lu y cols 2006
	BoV-R	Cebador reverse	CAC TTG GTC TGA GGT CTT CGA A				
	BoV-PR	Sonda taqman	6-FAM-AGG AAC ACC CAA TCA RCC ACC TAT CGT CT-BHQ				
hMPV	hMPV-F	Cebador forward	CAT ATA AGC ATG CTA TAT TAA AAG AGT CTG			Gen N (170 pb)	Maertzdorf y cols 2004
	hMPV-R	Cebador reverse	CCT ATT TCT GCA GCA TAT TTG TAA TCA G				
	hMPV-PR	Sonda taqman	6-FAM-TGY AAT GAT GAG GGT GTC ACT GCG GTT G-TAMRA				
CoV	F1	Cebador forward	TGG TGG CTG GGA CGA TAT GT	Gen 1b de la polimerasa (85-100 pb)	Kuypers y cols 2007		
	F2	Cebador forward	TTT ATG GTG GTT GGA ATA ATA TGT TG				
	F3	Cebador forward	TGG CGG GTG GGA TAA TAT GT				
	R1	Cebador reverse	GGC ATA GCA CGA TCA CAC TTA GG				
	R2	Cebador reverse	GGC AAA GCT CTA TCA CAT TTG G				
	R3	Cebador reverse	GAG GGC ATA GCT CTA TCA CAC TTA GG				
	P1	Sonda taqman	6-FAM-ATA ATC CCA ACC CAT RAG-TAMRA				
	P2	Sonda taqman	6-FAM-ATA GTC CCA TCC CAT CAATAMRA				
CoV-HKU1	HKU1-F	Cebador forward	AAA GGA TGT TGA CAA CCC TGT T	Gen <i>pol</i> (444 pb)	Lau y cols 2006		
	HKU1-R	Cebador reverse	ATC ATC ATA CTA AAA TGC TTA CA				

6-FAM, fluoresceína (fluoróforo "reporter"); BHQ, "black hole quencher". BHQ y TAMRA actúan como "quencher" de fluorescencia emitida por 6-FAM

IV. RESULTADOS

IV.1. DATOS DE LAS MUESTRAS Y DE LOS PACIENTES

IV.1.1. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS

Durante las temporadas 2006-07 y 2007-08 se procesaron un total de 1.524 muestras, de las cuales 1.072 (70,3%) fueron muestras hospitalarias y 452 (29,7%) fueron extrahospitalarias (tabla IV.1).

Tabla IV.1. Procedencia de las muestras agrupadas por temporada [n(%)]

	Muestras hospitalarias	Muestras extrahospitalarias	Total
Temporada 2006-2007	466 (30,6)	248 (16,3)	714 (46,9)
Temporada 2007-2008	606 (39,8)	204 (13,4)	810 (53,1)
Total	1.072 (70,3)	452 (29,7)	1.524 (100)

% respecto al total de muestras recibidas

IV.1.2. TIPO DE MUESTRA

Se estudiaron 1.026 (67,3%) lavados nasofaríngeos, 444 (29,1%) exudados nasofaríngeos, 21 (1,4%) esputos, 18 (1,2%) LBA y 13 (0,9%) exudados faríngeos. La mayoría de las muestras procedentes del hospital fueron lavados nasofaríngeos (94,6%), y la mayoría de las que se recibieron del ámbito extrahospitalario fueron exudados nasofaríngeos (97,3%) (tabla IV.2).

Tabla IV.2. Tipo de muestra por procedencia [n(%)]

Tipo de muestra	Muestras hospitalarias	Muestras extrahospitalarias	Total
Lavado nasofaríngeo	1.015 (66,6)	11 (0,7)	1.026 (67,3)
Exudado nasofaríngeo	4 (0,3)	440 (28,9)	444 (29,1)
Esputo	21 (1,4)	0	21 (1,4)
LBA	18 (1,2)	0	18 (1,2)
Exudado faríngeo	12 (0,8)	1 (0,1)	13 (0,9)
Otros	2 (0,1)	0	2 (0,1)
Total	1.072 (70,3)	452 (29,7)	1.524 (100)

% respecto al total de muestras recibidas

Para facilitar el tratamiento estadístico de los datos, se reagruparon los tipos de muestra en función de su significación clínica (tabla IV.3).

Tabla IV.3. Grupos de muestras [n(%)]

	Muestras hospitalarias	Muestras extrahospitalarias	Total
Lavado nasofaríngeo	1.015 (66,6)	11 (0,7)	1.026 (67,3)
Exudado nasofaríngeo y faríngeo	16 (1)	441 (28,9)	457 (30)
BAL, esputo y otros	41 (2,7)	0	41 (2,7)
Total	1.072 (70,3)	452 (29,7)	1.524 (100)

% respecto al total de muestras recibidas

IV.1.3. DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL DE LAS MUESTRAS

Las muestras se recibieron a lo largo de las dos temporadas de forma irregular, como se muestra en la figura IV.1. Se recibieron más muestras durante los meses fríos del año que durante los más cálidos.

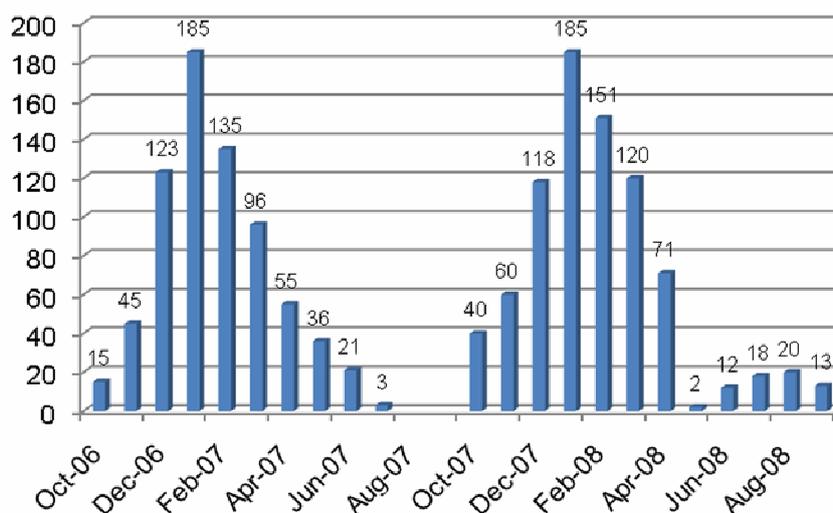


Figura IV.1. Distribución temporal de las muestras

Para facilitar el tratamiento estadístico de los datos, se recodificó la fecha de recepción de las muestras, definiendo tres grupos o estaciones: entre noviembre y enero, entre febrero y abril, y entre mayo y octubre, independientemente del año. El 88,2% de las muestras se recibieron durante los meses más fríos, entre noviembre y abril.

Tabla IV.4. Número de muestras recibidas agrupadas por meses

	Nº de muestras procesadas	%
Noviembre-Enero	716	47
Febrero-Abril	628	41,2
Mayo-Octubre	180	11,8
Total	1.524	100

V.1.4. DATOS DEMOGRÁFICOS

IV.1.4.1. SEXO DE LOS PACIENTES

De las 1.524 muestras que se incluyeron en este estudio, 821 (53,9%) pertenecían a hombres y 703 (46,1%) a mujeres.

Tabla IV.5. Muestras recibidas agrupadas según procedencia y sexo de los pacientes [n(%)]

	Muestras hospitalarias	Muestras extrahospitalarias	Total
Hombres	610 (40)	211 (13,9)	821 (53,9)
Mujeres	462 (30,3)	241 (15,8)	703 (46,1)
Total	1.072 (70,3)	452 (29,7)	1.524 (100)

% respecto al total de muestras recibidas

IV.1.4.2. EDAD DE LOS PACIENTES

La edad de los pacientes se conocía en 1.416 casos. En los otros 108 casos no se cumplimentó este campo en el volante de petición y/o no se pudo obtener la información de la historia clínica. Su valor estuvo comprendido entre 0 y 90 años, con una mediana de 1 año, un percentil 25 de 3 meses y un percentil 75 de 16 años; 1.047 pacientes pertenecían a la edad pediátrica (73,9%), entendiendo por edad pediátrica la que llega hasta los 14 años incluidos y 369 eran adultos (26,1%).

La edad de los pacientes hospitalarios estuvo comprendida entre 0 y 90 años, con la mediana en 6 meses, el percentil 25 en 2 meses y el percentil 75 en 2 años.

La edad de los pacientes extrahospitalarios estuvo comprendida entre 1 mes y 88 años, con la mediana en 13 años, el percentil 25 en 4 años y el percentil 75 en 36 años.

Se categorizó la edad en 4 grupos: menores de 1 año, entre 1 y 3 años, entre 4 y 14 años y mayores de 14 años. La tabla IV.6 muestra la distribución de los pacientes hospitalarios y extrahospitalarios por grupos de edad.

Tabla IV.6. Grupos de edad de los pacientes según su procedencia [n(%)]

	Pacientes hospitalarios	Pacientes extrahospitalarios	Total
Menores de 1 año	706 (73,1)	32 (7,1)	738 (52,1)
1-3 años	76 (7,9)	73 (16,2)	149 (10,5)
4-14 años	37 (3,8)	127 (28,2)	164 (11,6)
Mayores de 14 años	147 (15,2)	218 (48,4)	365 (25,8)
Total	966 (100)	450 (100)	1.416 (100)

% respecto al total de muestras recibidas de cada procedencia

IV.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO VIROLÓGICO

IV.2.1. FRECUENCIA DE LOS VIRUS DETECTADOS

Se detectaron un total de 825 virus en 725 (47,6%) muestras respiratorias. Los más frecuentes fueron VRS (32,5%), gripe (22,8%) y HBoV (22,2%) (figura IV.2 y tabla IV.7). El tipo y subtipo de virus de la gripe en las muestras positivas para éste se muestran en la tabla IV.8.

CoV sólo se investigó en 474 muestras, de las cuales, 330 eran del ámbito hospitalario y 144 eran extrahospitalarias.

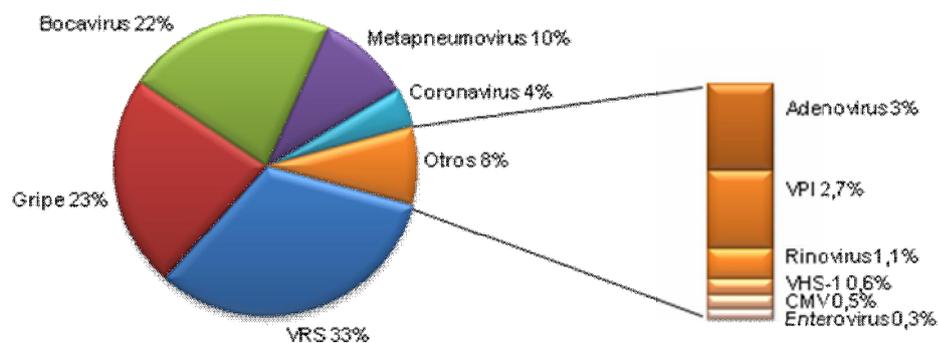


Figura IV.2. Frecuencia de los virus respiratorios detectados

Tabla IV.7. Frecuencia de los virus respiratorios detectados

Virus	% del total de virus detectados	% del total de muestras testadas	% del total de muestras positivas	
VRS	268	32,5	17,6	36,9
Gripe	188	22,8	12,3	25,9
HBoV	183	22,2	12	25,2
hMPV	82	9,9	5,4	11,3
ADV	25	3	1,6	3,4
VPI 1	5	0,6	0,3	0,7
VPI 2	3	0,3	0,2	0,4
VPI 3	15	1,8	1	2
Rinovirus	9	1,1	0,6	1,2
VHS-1	5	0,6	0,3	0,7
CMV	4	0,5	0,3	0,5
Enterovirus	3	0,3	0,2	0,4
CoV OC43	13	1,6	2,7	1,8
CoV 229E	5	0,6	1,1	0,7
CoV NL63	14	1,7	3	1,9
CoV HKU1	3	0,3	0,6	0,4
Total	825	100	-	-

Tabla IV.8. Tipo y subtipo de gripe en las 188 muestras positivas para este virus [n(%)]

Muestras positivas	
Gripe AH1	34 (18,1)
Gripe AH3	27 (14,3)
Gripe A no subtipable	43 (22,9)
Gripe B	84 (44,7)
Total	188 (100)

% respecto al total de muestras positivas para gripe

Las muestras de gripe A no subtipable corresponden a muestras hospitalarias, a las que sólo se les realizaba determinación del tipo de virus gripal por detección de antígeno mediante inmunocromatografía o IFD de la monocapa celular.

IV.2.2. CODETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS

En 725 de las 1.524 muestras analizadas, se detectó algún VR. En 630 de estas muestras, se encontró un solo virus, mientras que en las restantes 95 muestras (13,1% de muestras positivas) se encontraron al menos 2 virus.

HBoV fue el virus más frecuentemente implicado en estas codetecciones (78,9% de las mismas). Mayoritariamente, se identificó HBoV junto con VRS en 23 muestras (24,2%), con gripe en 23 (24,2%) y con hMPV en 15 (15,8%). Otras codetecciones con ADV, CoV, VPI, VHS-1 y CMV fueron menos frecuentes. En 4 muestras se encontraron tres virus (HBoV +gripe + CoV en 2 ocasiones, HBoV + hMPV + VPI 3 en otra, y HBoV + VRS + CoV en otra) (tabla IV.9).

Tabla IV.9. Muestras en las que se codetectaron HBoV y otros virus respiratorios

Nº de codetecciones y virus detectados	
Codetecciones con 2 virus	
23 HBoV + VRS	
23 HBoV + gripe	10 HBoV + gripe B
	5 HBoV + gripe A H3
	4 HBoV + gripe A H1
	4 HBoV + gripe A no subtipable
15 HBoV + hMPV	
4 HBoV + ADV	
3 HBoV + CoV	2 HBoV + CoV NL63
	1 HBoV + CoV HKU1
1 HBoV + VPI 2	
1 HBoV + VHS-1	
1 HBoV + CMV	
Codetecciones com más de 2 virus	
1 HBoV + gripe A H1 + CoV 229E	
1 HBoV + gripe B + CoV 229E	
1 HBoV + hMPV + VPI 3	
1 HBoV + VRS +CoV NL63	
VHS-1: virus herpes simple tipo 1; CMV: citomegalovirus	

En el restante 21,1% de las codetecciones estuvieron implicados otros virus distintos de HBoV (tabla IV.10). La tabla IV.11 muestra la frecuencia en que cada uno de los virus estudiados se codetectó con uno o más virus.

Tabla IV.10. Muestras en las que se codetectaron virus respiratorios diferentes de HBoV

Nº de codetecciones y virus detectados	
	3 VRS + CoV OC43
6 VRS + CoV	2 VRS + CoV NL63
	1 VRS + CoV 229E + CoV OC43
4 VRS + hMPV	
1 VRS + ADV	
1 VRS + VHS-1	
2 gripe A + CoV OC43	
2 gripe B + hMPV	
2 gripe B + CoV	1 gripe B + CoV OC43
	1 gripe B+ CoV NL63
1 gripe B + ADV	
1 gripe B + VPI 1	

Tabla IV.11. Frecuencia de codetección de cada uno de los virus respiratorios

Virus	Casos en codetección [n(%)]
VRS	36 (13,4)
Gripe	33 (17,5)
HBoV	75 (41)
hMPV	21 (25,6)
CoV	16 (45,7)
Otros	12 (17,4)

% respecto al total de cada uno de los virus detectados

IV.3. COMPARACIÓN DE LOS DATOS EPIDEMIOLÓGICOS CON LOS RESULTADOS DE LABORATORIO

Se analizaron los resultados del estudio virológico con los siguientes datos epidemiológicos: temporada en la que se recibieron las muestras, tipo de muestra, procedencia de las muestras, distribución estacional, sexo y edad de los pacientes. Además, en el caso de las muestras extrahospitalarias, también se relacionaron con la presencia de síntomas de infección del tracto respiratorio superior.

IV.3.1. RESULTADOS GENERALES

En 725 muestras se detectó al menos un VR, lo que representa un 47,6% de las muestras procesadas. Fueron positivas el 49,4% de las muestras hospitalarias y el 43,1% de las extrahospitalarias ($p= 0,025$).

Se observó una detección de virus respiratorios menor en la temporada 2006-07 que en la temporada 2007-08 ($p= 0.026$) (tabla IV.12).

Tabla IV.12. Muestras positivas por temporada

	n(%)
Temporada 2006-07	318 (44,5)
Temporada 2007-08	407 (50,2)
% respecto al total de muestras cada temporada	

Se detectaron VR mayoritariamente en lavado nasofaríngeo, seguido de exudados nasofaríngeo y faríngeo. La tasa de detección de virus en muestras representativas del tracto respiratorio inferior como LBA y esputo fue significativamente menor ($p= 0,005$) (tabla IV.13).

Tabla IV.13. Muestras positivas por tipo de muestra

	n(%)
Lavado nasofaríngeo	513 (50)
Exudado nasofaríngeo y faríngeo	200 (43,8)
LBA, esputo y otros	12 (29,3)
Total	725 (47,6)
% respecto al total de cada tipo de muestra	

La detección de VR fue significativamente más frecuente durante los meses de noviembre a enero, y menos frecuente en los meses de mayo a octubre ($p<0,001$) (tabla IV.14).

Tabla IV.14. Muestras positivas agrupadas por meses

	n(%)
Noviembre-Enero	377 (52,6)
Febrero-Abril	294 (46,8)
Mayo-Octubre	54 (30)
Total	725 (47,6)
% respecto al total de muestras de cada periodo	

No hubo diferencias significativas en la tasa global de detección de VR en función del sexo ($p=0,724$), pero sí con respecto a la edad. Del análisis de los residuos tipificados corregidos se desprende que sólo son comparables los grupos de edad de “menores de 1 año” y “mayores de 14 años”, y se evidenció una mayor frecuencia de VR en niños menores de 1 año ($p<0,001$) (tabla IV.15). Esto se debe probablemente al reducido tamaño muestral en estos grupos, y quizás podría evitarse agrupando todas las muestras de niños entre 1 y 14 años.

Tabla IV.15. Muestras positivas en función del sexo y la edad

		n(%)	p
Sexo	Hombres	394 (48)	0,724
	Mujeres	331 (47,1)	
Edad	Menores de 1 año	381 (51,6)	<0,001
	1-3 años	68 (45,6)	
	3-14 años	86 (52,4)	
	Mayores de 14 años	126 (34,5)	

Sexo: % respecto al total de muestras de hombres/mujeres

Edad: % respecto al total de muestras de cada grupo de edad

IV.3.2. RELACIÓN ENTRE LOS VIRUS RESPIRATORIOS DETECTADOS Y LA TEMPORADA

Las tasas de detección de los distintos VR en la temporada 2006-07 y 2007-08 no presentaron diferencias estadísticamente significativas, excepto en el caso de la gripe B y hMPV.

En la temporada 2006-07 hubo 15 muestras positivas para gripe B (1% del total de muestras procesadas), y en la temporada 2007-08 hubo 69 (4,5% del total de muestras procesadas) ($p<0,001$).

Durante la primera temporada se detectaron 28 hMPV y en la segunda 54 ($p=0,018$).

Aunque ADV, VPI, rinovirus, enterovirus, CMV y VHS-1 no presentaron diferencias significativas por separado, al considerarlos globalmente, fueron más frecuentes durante la segunda temporada 2007-08 (tabla IV.16).

Tabla IV.16. Virus respiratorios detectados en cada una de las dos temporadas [n(%)]

	Temporada 2006-2007	Temporada 2007-2008	p
VRS	131 (18,3)	137 (16,9)	0,463
Gripe	78 (10,9)	110 (13,6)	0,116
Gripe A	63 (8,8)	41 (20,2)	<0,001
Gripe B	15 (2,1)	69 (8,5)	
HBoV	84 (11,8)	99 (12,2)	0,784
hMPV	28 (3,9)	54 (6,7)	0,018
CoV	18 (2,5)	17 (2,1)	0,798
Otros virus	17 (2,4)	52 (6,4)	<0,001
Total	356 (49,8)	469 (57,9)	

% respecto al total de muestras recibidas durante cada temporada

IV.3.3. RELACIÓN ENTRE LOS VIRUS RESPIRATORIOS DETECTADOS Y LA PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS

Al analizar por separado los distintos VR, se encuentran diferencias significativas en la tasa de detección en función de la procedencia de las muestras. La tasa de detección de virus de la gripe fue mayor en las extrahospitalarias ($p < 0,001$), así como la de HBoV ($p = 0,028$); por el contrario, hMPV fue más frecuente en muestras hospitalarias ($p = 0,002$). Las tasas de detección de CoV en muestras hospitalarias y extrahospitalarias no presentaron diferencias estadísticamente significativas (tabla IV.17).

Tabla IV.17. Virus respiratorios detectados según la procedencia de las muestras [n(%)]

	Muestras hospitalarias	Muestras extrahospitalarias	p
VRS	268 (25)	-	ND
Gripe	64 (6)	124 (27,4)	<0,001
HBoV	116 (10,8)	67 (20,9)	0,028
hMPV	70 (6,5)	12 (2,6)	0,002
CoV	25 (2,3)	10 (2,2)	0,899
Otros virus	69 (6,4)	-	ND
Total	1.072(100)	452 (100)	

% respecto al total de muestras de cada procedencia

IV.3.4. RELACIÓN ENTRE LOS VIRUS RESPIRATORIOS DETECTADOS Y EL TIPO DE MUESTRA

Dado que la mayoría de los lavados nasofaríngeos procedían del hospital, y los exudados faríngeos y nasofaríngeos de atención primaria (ver tabla IV.3), en este epígrafe solo se evaluarán los virus que se investigaron en todos los tipos de muestra: gripe, HBoV, hMPV y CoV.

El virus de la gripe fue detectado más frecuentemente en los exudados nasofaríngeo y faríngeo ($p < 0,001$). hMPV y HBoV se detectaron con más frecuencia en lavados nasofaríngeos que en exudados ($p = 0,003$ y $p = 0,027$, respectivamente). CoV no presentó diferencias estadísticamente significativas en la tasa de detección en función del tipo de muestra analizado (tabla IV.18).

Tabla IV.18. Virus respiratorios detectados en cada tipo de muestra [n(%)]

	Lavado nasofaríngeo	Exudado nasofaríngeo y exudado faríngeo	LBA, esputo y otros	p
Gripe	60 (5,8)	124 (27,1)	4 (9,8)	<0,001
HBoV	110 (10,7)	70 (15,3)	3 (7,3)	0,027
hMPV	68 (6,6)	11 (2,4)	3 (7,3)	0,003
CoV	24 (2,3)	11 (2,4)	0	0,621
Total	1.026 (100)	457 (100)	41 (100)	

% respecto al total de muestras recibidas de cada tipo

IV.3.5. DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL DE VIRUS RESPIRATORIOS

Tanto VRS como gripe fueron más frecuentes durante los meses de noviembre a enero, aunque la diferencia fue estadísticamente significativa sólo en el caso del VRS. La tasa de detección de HBoV fue significativamente mayor durante los meses de noviembre, diciembre y enero ($p < 0,001$), y la de hMPV entre febrero y abril ($p < 0,001$). CoV también se detectó con más frecuencia entre noviembre y abril, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. El resto de virus fueron más frecuentes entre mayo y octubre ($p < 0,001$) (tabla IV.19, figura IV.3).

Tabla IV. 19. Distribución estacional de los virus respiratorios [n(%)]

	Noviembre-Enero	Febrero-Abril	Mayo-Octubre	p
VRS	183 (25,6)	82 (13,1)	3 (1,7)	<0,001
Gripe	96 (13,4)	79 (12,6)	13 (7,2)	0,076
HBoV	113 (15,8)	59 (9,4)	11 (6,1)	<0,001
hMPV	7 (1)	72 (11,5)	3 (1,7)	<0,001
CoV	20 (2,8)	12 (1,9)	3 (1,7)	0,120
Otros virus	19 (2,6)	28 (4,5)	22 (12,2)	<0,001
Total	716 (100)	628 (100)	180 (100)	

% respecto al total de muestras recibidas, agrupadas por grupos de meses

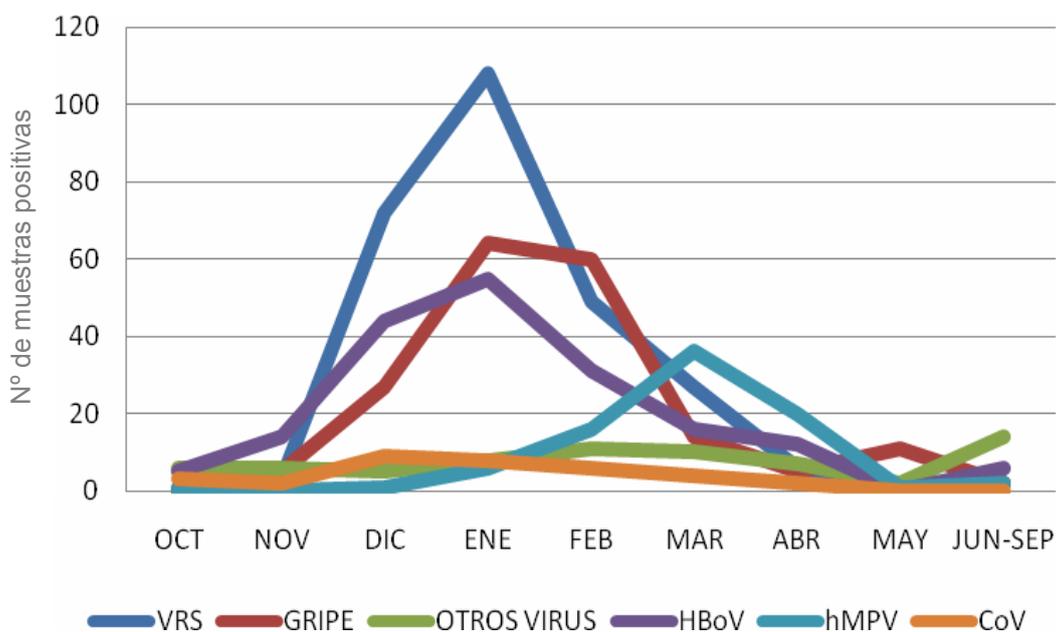


Figura IV.3. Distribución estacional de los virus respiratorios

IV.3.6. RELACIÓN ENTRE LOS VIRUS RESPIRATORIOS DETECTADOS Y EL SEXO DE LOS PACIENTES

En ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de detección de VR cuando se consideró el sexo de los pacientes (tabla IV.20).

Tabla IV.20. Virus respiratorios detectados en función del sexo [n(%)]

	Hombres	Mujeres	p
VRS	147 (17,9)	121 (17,2)	0,723
Gripe	97 (11,8)	91 (12,9)	0,504
HBoV	108 (13,1)	75 (10,7)	0,137
hMPV	39 (4,7)	43 (6,1)	0,239
CoV	16 (1,9)	19 (2,7)	0,507
Otros virus	43 (5,2)	26 (3,7)	0,150
Total	821 (100)	703 (100)	

% respecto al total de muestras recibidas, agrupadas por sexo

IV.3.7. RELACIÓN ENTRE LOS VIRUS RESPIRATORIOS DETECTADOS Y LA EDAD DE LOS PACIENTES

Las tasas de detección de VRS y hMPV fueron significativamente mayores en niños menores de 1 año ($p < 0,001$), mientras que la de gripe fue mayor en niños mayores y adultos ($p < 0,001$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de detección de HBoV, CoV, ni otros VR clásicos en los distintos grupos de edad (tabla IV.21).

Tabla IV.21. Número de virus respiratorios detectados en función de la edad de los pacientes

	Hasta 1 año	1-3 años	4-14 años	Más de 14 años	p
VRS	197 (26,7)	18 (12,1)	0	6 (1,6)	<0,001
Gripe	38 (5,1)	19 (12,7)	64 (39)	64 (17,5)	<0,001
HBoV	90 (20,7)	22 (14,8)	24 (14,6)	42 (11,5)	0,624
hMPV	52 (12,2)	11 (7,4)	4 (2,4)	6 (1,6)	<0,001
CoV	13 (1,8)	6 (4)	3 (18,3)	12 (3,3)	0,310
Otros virus	45 (6,1)	4 (2,7)	5 (3)	12 (3,3)	0,064
Total	738 (100)	149 (100)	164 (100)	365 (100)	

% respecto al total de muestras procesadas de cada grupo de edad

IV.4. PAPEL DE HBoV COMO PATÓGENO RESPIRATORIO

IV.4.1. RELACIÓN ENTRE LAS TASAS DE DETECCIÓN DE HBoV Y LA PRESENCIA DE SÍNTOMAS DE IRA DEL TRACTO SUPERIOR

Los datos clínicos registrados en los pacientes extrahospitalarios pertenecientes a la red centinela se utilizaron para determinar si había algún síntoma de IRA del tracto

respiratorio superior que se correlacionara con la detección de bocavirus en este grupo de pacientes. Para ello, se comparó la relación entre los síntomas y la detección de HBoV y gripe.

Ninguno de los síntomas clínicos consignados de IRA se relacionó de forma significativa con la detección de HBoV. En cambio, sí que se obtuvo significación estadística al considerar la detección del virus de la gripe y la presentación de fiebre ($p < 0,001$), tos ($p = 0,002$) y criterios clínicos de gripe típica ($p < 0,001$) (tabla IV.22).

Tabla IV.22. Relación entre síntomas clínicos de infección del tracto respiratorio superior y detección de bocavirus y gripe en pacientes extrahospitalarios [n(%)]

		HBoV			Gripe		
		Positivo (n=67)	Negativo (n=374)	p	Positivo (n=124)	Negativo (n=327)	p
Fiebre	Sí (n=387)	58 (15)	329 (85)	0,847	119 (30,7)	268 (69,3)	<0,001
	No (n=64)	9 (14,1)	55 (85,9)		5 (7,8)	59 (92,2)	
Tos	Sí (n=409)	59 (14,4)	350 (85,6)	0,423	121 (29,6)	288 (70,4)	0,002
	No (n=42)	8 (19)	34 (81)		3 (7,1)	39 (92,9)	
Rinorrea	Sí (n=370)	57 (15,4)	313 (84,6)	0,483	107 (28,9)	263 (71,1)	0,148
	No (n=81)	10 (12,3)	71 (87,7)		17 (21)	64 (79)	
Odinofagia	Sí (n=339)	51 (15)	288(85)	0,845	99 (29,2)	240 (70,8)	0,157
	No (n=112)	16 (14,3)	96 (85,7)		25 (22,3)	87 (77,7)	
Criterios clínicos de gripe típica	Sí (n=204)	31 (15,2)	173 (84,8)	0,854	81 (39,7)	123 (60,3)	<0,001
	No (n=247)	36 (14,6)	211 (85,4)		43 (17,4)	204 (82,6)	
Síntomas gastrointestinales	Sí (n=59)	8 (13,6)	51 (86,4)	0,764	21 (35,6)	38 (64,4)	0,135
	No (n=392)	59 (15,1)	333 (84,9%)		103 (26,3)	289 (73,7)	
Prescripción de antibióticos	Sí (n=71)	9 (12,7)	62 (87,3)	0,574	16 (22,5)	55 (77,5)	0,308
	No (n=380)	58 (15,3)	322 (84,7)		108 (28,4)	272 (71,6)	

% de positivos y negativos de cada virus respecto al total de pacientes con presencia o ausencia de cada síntoma

IV.4.2. DETECCIÓN DE HBoV EN MUESTRAS CON Y SIN OTRO VIRUS RESPIRATORIO

Ante la dificultad de contar con un grupo control de sujetos sanos para evaluar el papel de HBoV en la IRA, se decidió excluir la presencia de éste y dividir las muestras procesadas para este estudio en dos grupos: uno de muestras positivas para virus no-

HBoV (n=617) y otro de muestras negativas para virus no-HBoV (n=907). La tasa de detección de HBoV fue similar en ambos grupos (tabla IV.23).

Tabla IV.23. Detección de HBoV en muestras positivas y negativas para virus no-HBoV [n(%)]

	HBoV positivo	HBoV negativo	p
Muestras positivas para virus no-HBoV (n=617)	75 (12,2)	542 (87,8)	0,884
Muestras negativas para virus no-HBoV (n=907)	108 (11,9)	799 (88,1)	

% respecto del total de muestras positivas y negativas para virus no-HBoV

Cuando este mismo análisis se realizaba con los otros 3 VR más frecuentemente detectados, VRS, gripe y hMPV, se observó que para todos ellos, la detección fue significativamente mayor cuando no se detectaban otros VR (tablas IV.24, IV.25 y IV.26).

Tabla IV.24. Detección de VRS en muestras positivas y negativas para virus no-VRS [n(%)]

	VRS positivo	VRS negativo	p
Muestras positivas para virus no-VRS (n=493)	36 (7,3)	457 (92,7)	<0,001
Muestras negativas para virus no-VRS (n=1.031)	232 (22,5)	799 (77,5)	

% respecto del total de muestras positivas y negativas para virus no-VRS

Tabla IV.25. Detección de gripe en muestras positivas y negativas para virus no-gripe [n(%)]

	Gripe positivo	Gripe negativo	p
Muestras positivas para virus no-gripe (n=570)	33 (5,8)	537 (94,2)	<0,001
Muestras negativas para virus no-gripe (n=954)	155 (16,2)	799 (83,8)	

% respecto del total de muestras positivas y negativas para virus no-gripe

Tabla IV.26. Detección de hMPV en muestras positivas y negativas para virus no-hMPV [n(%)]

	hMPV positivo	hMPV negativo	p
Muestras positivas para virus no-hMPV (n=665)	22 (3,3)	643 (96,7)	0,002
Muestras negativas para virus no-hMPV (n=859)	60 (7)	799 (93)	

% respecto del total de muestras positivas y negativas para virus no-hMPV

IV.4.3. CARGA VIRAL DE HBoV

Finalmente, se evaluó si una carga viral elevada de HBoV se correlacionaba con un mayor poder patógeno del mismo. Dado que no disponíamos de una cepa titulada de HBoV, se realizó semicuantificación utilizando el parámetro del ciclo umbral de detección de fluorescencia ("crossing point", Cp) que proporciona el análisis de

cuantificación de la PCR-TR. Cp es una variable numérica inversamente proporcional a la cantidad de virus presente en la muestra.

Primeramente, para evaluar si Cp era un parámetro semicuantitativo útil, se realizó un ensayo de validación de la técnica de PCR-TR de HBoV para determinar el error intra e interensayo midiendo el CV del valor de Cp con una serie de replicados.

IV.4.3.1. ENSAYO DE VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL

La **variación intraensayo** se determinó mediante PCR en una única serie con 10 replicados de dos muestras, en las que los valores originales de Cp eran 34,06 y 26,22. El CV fue de 0,8% y 0,27%, respectivamente (tabla IV.27).

Tabla IV.27. Variación intraensayo de la PCR-TR de HBoV mediante cálculo de Cp

Nº de muestra	Cp	Media ± DE	CV (%)
1	34,19	34,3 ± 0,43	0,8%
1	34,44		
1	34,29		
1	34,04		
1	34,19		
1	34,57		
1	34,99		
1	34,74		
1	34,46		
2	26,00		
2	26,12		
2	26,07		
2	26,07		
2	25,98		
2	26,06		
2	26,15		
2	26,20		
2	26,16		
2	26,07		

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

La **variación interensayo** se determinó mediante PCR en series (y días) diferentes con 14 y 9 replicados de esas mismas muestras. El CV fue de 1,04% y 1,5%, respectivamente (tabla IV.28).

Tabla IV.28. Variación interensayo de la PCR-TR de HBoV mediante cálculo de Cp

Nº de replicado	Cp	Media ± DE	CV (%)
<u>Muestra 1</u>			
1	25,17	25,1 ± 2,7	1,04%
2	24,93		
3	26,98		
4	25,34		
5	25,31		
6	25,17		
7	25,12		
8	25,29		
9	24,70		
10	24,49		
11	24,84		
12	25,35		
13	24,93		
14	25,22		
<u>Muestra 2</u>			
	38,57	38,3 ± 0,6	1,5%
1	38,57		
2	37,14		
3	38,67		
4	39,03		
5	38,49		
6	37,97		
7	38,57		
8	37,74		
9	38,65		

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

IV.4.3.2. COMPARACIÓN DE DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS CON LA CARGA VIRAL DE HBoV

Se estableció como punto de corte un $Cp=28$ para definir dos grupos entre las muestras positivas para bocavirus, de modo que se consideró que las muestras con $Cp \leq 28$ tenían una “carga viral alta”, y que las muestras con $Cp > 28$ tenían una “carga viral baja”.

Se pudo comprobar que todas las muestras extrahospitalarias con HBoV positivo tuvieron un $Cp > 28$, mientras que 19 de las muestras hospitalarias (16,7%) presentaron un $Cp \leq 28$ ($p < 0,001$).

No se obtuvo un $Cp \leq 28$ en ninguna muestra diferente del lavado nasofaríngeo ($p = 0,001$).

No se observaron diferencias significativas en el Cp ni la carga viral de HBoV en función del período del año en que se detectó este virus ($p = 0,374$).

No hubo diferencias significativas en la carga viral de HBoV en función del sexo de los pacientes ($p = 0,698$).

El porcentaje de niños menores de 1 año con $Cp \leq 28$ (18,9%) fue significativamente mayor ($p=0,004$) que en otros grupos de edad (4,5% en el grupo de 1-3, 0% en el de 4-14 años, y 2,4% en el de mayores de 14 años) (tabla IV.29)

Tabla IV.29. Relación entre los datos epidemiológicos y clínicos y la carga viral estimada de HBoV por el valor de Cp

Datos		n	$Cp \leq 28$ [n(%)]	$Cp > 28$ [n(%)]	p
Procedencia de las muestras	Muestras hospitalarias	116	19 (16,4)	97 (83,6)	< 0,001
	Muestras extrahospitalarias	67	0	67 (100)	
Tipo de muestra	LNF	110	19 (17,3)	91 (82,7)	0,001
	ENF y EF	70	0	70 (100)	
	BAL, esputo y otros	3	0	3 (100)	
Período del año	Noviembre-Enero	113	11 (9,7)	102 (90,3)	0,374
	Febrero-Abril	59	8 (13,5)	51 (86,5)	
	Mayo-Octubre	11	0	11 (100)	
Sexo	Hombres	108	12 (11,1)	96 (88,9)	0,698
	Mujeres	75	7 (9,3)	68 (90,7)	
Grupos de edad	< 1 año	90	17 (18,9)	73 (81,1)	0,004
	1-3 años	22	1 (4,5)	21 (95,5)	
	4-14 años	24	0	24	
	> 14 años	42	1	41	
Afectación del TRI	Sí	58	7	51	0,210
	No	58	12	46	

LNF: lavado nasofaríngeo; ENF: exudado nasofaríngeo; EF: exudado faríngeo; LBA: lavado broncoalveolar;

TRI: tracto respiratorio inferior

IV.4.3.3. RELACIÓN ENTRE LA CARGA VIRAL DE HBoV Y LA CODETECCIÓN DE OTROS VIRUS RESPIRATORIOS

Aunque no se observaron diferencias significativas en los valores de Cp entre muestras en las que HBoV se detectó solo y muestras en las que hubo codetección de HBoV y otros VR, es de destacar que la tasa de muestras con carga viral elevada de HBoV fue mayor en aquellas en las que este virus se detectó solo (tabla IV.30).

Tabla IV.30. Relación entre la carga viral de HBoV y la codetección de otros virus respiratorios

	n	Cp ≤ 28 [n(%)]	Cp > 28 [n(%)]	p
HBoV	108	14 (13)	94 (87)	0,170
HBoV + algún otro virus	75	5 (6,7)	70 (93,3)	

% respecto al de muestras con HBoV o HBoV+ otro virus respiratorio

V. DISCUSIÓN

Las infecciones respiratorias constituyen las enfermedades infecciosas más frecuentes del ser humano. La mayoría de estos procesos son de etiología viral, se resuelven con tratamiento sintomático, y no es necesario el uso de antibióticos. Sin embargo, a veces pueden complicarse, dando lugar a cuadros de gravedad variable, y en ocasiones a la muerte, por lo que un diagnóstico y un seguimiento correctos son de vital importancia (**Neuzil y cols, 2003; Navarro-Marí y cols, 2003**).

Tradicionalmente, el diagnóstico de las IRA virales se basaba en el aislamiento e identificación del agente viral mediante cultivo celular e IF con anticuerpos monoclonales específicos frente a una serie limitada de VR (gripe, VRS, VPI, ADV). Sin embargo, usando estos métodos, una gran proporción de estas infecciones permanecían sin diagnosticar. Recientes avances en la biología molecular, y particularmente la introducción de la PCR, han mejorado enormemente la detección de estos patógenos y han aumentado la sensibilidad diagnóstica, además de permitir el descubrimiento de nuevos patógenos virales que no crecen o crecen pobremente en cultivo celular (**Sloots y cols, 2008; Gillim-Ross y Subbarao, 2006; Henrickson, 2004**): hMPV, CoV-SARS, CoV NL63, CoV HKU1, HBoV y poliomavirus humanos KIV y WUV.

Con este trabajo se pretendió conocer la incidencia de las IRA en dos grupos de población: en pacientes hospitalarios y pacientes que acudieron a centros de atención primaria pertenecientes a la Red de Vigilancia de gripe de Andalucía, durante el período comprendido entre octubre de 2006 y septiembre de 2008. También se pretendía analizar la influencia de algunas variables como la procedencia de las muestras, el tipo de muestra, la época del año, el sexo y la edad del paciente y la clínica, en los resultados obtenidos.

V.I. INCIDENCIA DE VIRUS RESPIRATORIOS Y RELACIÓN CON DATOS DEMOGRÁFICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS

Para ello, se analizaron un total de 1.524 muestras respiratorias, y se detectó algún VR en 725 de ellas, lo que supone un 47,6% del total de muestras. Esta tasa de detección es bastante elevada, aunque no llega al 70-75% que describen otros autores, aunque la mayoría de estos estudios se refieren exclusivamente a población pediátrica y la **metodología** empleada se basa fundamentalmente en TAAN. Así, Lambert y cols utilizan PCR y detectan algún VR en el 74% de las muestras analizadas (**Lambert y**

cols, 2007), Kusel y cols en el 69% (**Kusel y cols, 2006**), e Iwane y cols en el 60% (**Iwane y cols, 2004**). Arnold y cols describen infección viral en el 62% de las muestras haciendo PCR para la detección de ADV, hMPV y HBoV; y una detección de antígeno mediante IF para VRS, gripe A y B, VPI y ADV (**Arnold y cols, 2008**). Por otra parte, Tsai y cols hacen detección de antígeno por IF y cultivo viral, obteniendo algún VR solo en el 32% de los pacientes estudiados (**Tsai y cols, 2001**). Nuestra tasa de detección parece compatible con la metodología mixta utilizada en este trabajo, detección de antígeno y/o cultivo para detección de algunos virus (VRS, VPI, ADV y rinovirus) y PCR para otros (gripe, HBoV, hMPV y CoV). Destaca sobre todo la existencia en nuestra serie de tasas inferiores a las obtenidas por otros autores que emplean PCR para los virus que nosotros diagnosticamos mediante cultivo celular, debido probablemente por la menor sensibilidad del cultivo.

Además de la metodología empleada en el diagnóstico, es de gran importancia el **tipo de muestra** recogida para llevar a cabo una correcta detección de VR. La muestra debe contener abundantes células epiteliales para asegurar una elevada carga viral, y ello convierte al aspirado nasofaríngeo y/o el lavado nasal en las mejores muestras para detectar VR (**Navarro-Marí y Pérez-Ruiz, 2007**). Para este trabajo se procesaron 1.026 lavados nasofaríngeos y 457 exudados nasofaríngeos, y la tasa de detección de VR fue significativamente mayor en los lavados nasofaríngeos (50%) que en los exudados (43,8%). A pesar de la significación estadística, la diferencia en la tasa de detección de VR en los distintos tipos de muestra no es muy elevada, probablemente porque en la mayoría de los exudados nasofaríngeos se investigó gripe mediante cultivo en SV y PCR del sobrenadante y, como se ha demostrado anteriormente (**Pérez-Ruiz y cols, 2007**), esta metodología es la que obtiene mayor sensibilidad.

El tipo de muestra enviado estuvo muy condicionado por la **procedencia**, debido probablemente a la gravedad del cuadro clínico y a los medios disponibles en cada ámbito. De este modo, las muestras extrahospitalarias fueron en su mayoría exudados nasofaríngeos (97,3%), que es la muestra solicitada para la vigilancia centinela, mientras que del hospital llegaron sobre todo lavados nasofaríngeos (94,6%), pertenecientes en su mayor parte a pacientes pediátricos.

Más del 70% de las muestras procesadas eran de procedencia hospitalaria, lo que probablemente se relaciona con las diferencias en la praxis médica a nivel intra y

extrahospitalario, debido a la mayor accesibilidad a las pruebas de laboratorio en el ámbito hospitalario y la mayor tendencia al tratamiento empírico y sintomático en atención primaria.

Los **virus más frecuentemente detectados** fueron VRS (en el 17,6% de las muestras analizadas), gripe (12,3%), HBoV (12%) y hMPV (5,4%).

Aunque se pueden encontrar a lo largo de todo el año, las infecciones respiratorias agudas tienden a tener cierta **estacionalidad**, presentándose principalmente en las épocas frías en forma de brotes epidémicos de duración e intensidad variables (**Neuzil y cols, 2003; Navarro-Marí y cols, 2003**). En este estudio observamos que la mayor tasa de detección de VR se da en los meses de noviembre a enero de las temporadas evaluadas. Este periodo suele coincidir cada año con las epidemias de VRS y gripe. Durante las temporadas 2006-07 y 2007-08, la tasa máxima de detección de VRS apareció en la semana 47/06 y 49-52/07, y la tasa máxima de detección de gripe, en la semana 06/07 y 02/08 respectivamente (**Jiménez-Jorge y cols, 2007; Jiménez-Jorge y cols, 2008**). Por ello, probablemente esto ha contribuido a una mayor tasa de detección en ese periodo. Y como cabe esperar, en los periodos anuales más cálidos, obtuvimos la menor tasa de detección de VR.

Algunos autores han encontrado mayor frecuencia de infecciones virales en los hombres que en las mujeres (**Denny y Clyde, 1986; Tsai y cols, 2001**). En este estudio no se cumplió esta premisa, y no se detectó diferencia en las tasas de detección de los VR en función del **sexo** de los pacientes.

La distribución del número de muestras hospitalarias recibidas en función de la **edad** fue diferente de la de las muestras extrahospitalarias. Esto se explica fácilmente por la mayor gravedad de la infección respiratoria en niños pequeños, que les hace acudir al hospital, mientras que las infecciones respiratorias en pacientes de más edad suelen ser autotratadas por el propio paciente o atendidas por su médico de familia en el centro de salud (**Tregoning y Schwarze, 2010**). La mayoría de los adultos hospitalizados en nuestra serie eran inmunocomprometidos, principalmente receptores de trasplante (médula ósea y riñón).

El 57% de las muestras positivas para algún VR pertenecían a niños menores de 1 año y el 67,3% eran menores de 3 años. Nuestros resultados también avalan la importancia de la variable edad en las infecciones virales. En niños menores de 2 años,

las IRA representan una de las causas más frecuentes de consulta médica, tanto en atención primaria como en los servicios de urgencias hospitalarios, y también de hospitalización (**Arnold y cols, 2006**). La adquisición de estas infecciones se ve favorecida fundamentalmente por la inmadurez del sistema inmunitario, por lo que en la infancia las IRA suelen ser más frecuentes y más graves, lo que condiciona un mayor porcentaje de casos que requieren atención hospitalaria (**Tregoning y Schwarze, 2010**).

V.II. TIPO DE VIRUS RESPIRATORIOS DETECTADOS

El **VRS** fue el virus más frecuente en nuestra serie, así como en las de numerosos trabajos publicados (**Allander y cols, 2007b; Manning y cols, 2006; Villa y cols, 2008**). Se detectó VRS en el 17,6% de las muestras analizadas, y en su mayoría pertenecieron a niños hospitalizados (99,3%), en quienes este virus es el principal agente causal de bronquiolitis. La primoinfección por el VRS suele tener lugar a edades muy tempranas de la vida. Así, el 50% de los niños sufre esta infección en el primer año y el 65-98% de los niños que acuden a guarderías la padecen antes de cumplir los 3 años (**Darville et al, 1998**). Las infecciones repetidas a partir de los 2 años de edad suelen tener un curso más benigno, manifestándose en la mayor parte de los casos como una enfermedad de vías respiratorias altas o traqueobronquitis (**Darville y cols, 1998**). Estos resultados son similares a los encontrados en este estudio, en el que el 97,2% de las muestras en las que se detectó VRS pertenecieron a niños menores de 3 años, y el 89,1% a menores de 1 año.

En 188 muestras (12,3% de las muestras procesadas) se detectó **virus de la gripe**. De estos casos, 104 fueron gripe A (34 gripe A H1, 27 gripe A H3 y 43 casos gripe A no subtipable). Los casos de gripe B se distribuyeron de forma significativamente desigual en el tiempo según la temporada: 15 muestras positivas para gripe B en la temporada 2006-07 (1% del total de muestras procesadas) y 69 en la temporada 2007-08 (4,5% del total de muestras procesadas). Esto es reflejo de lo que ocurrió durante la vigilancia de gripe en Andalucía (**Jiménez-Jorge y cols, 2007; Jiménez-Jorge y cols, 2008**).

La mayor tasa de detección de gripe en pacientes extrahospitalarios probablemente se debe al diferente método diagnóstico usado en este grupo de

población. La RT-PCR del sobrenadante previamente se ha demostrado como el método de detección de gripe más sensible (**Pérez-Ruiz y cols, 2007**).

La detección de gripe fue más frecuente en exudado nasofaríngeo o nasal+faríngeo. El 66% de los casos de gripe se detectaron a partir de muestras de faringe y/o nasofaringe tomadas con escobillón. Aunque el lavado nasofaríngeo es mejor muestra para la detección de VR, en nuestra serie, este tipo de muestra (de procedencia hospitalaria) llevaba diferente procesamiento para la detección de gripe que las muestras de exudado; a diferencia de éstos, el lavado nasofaríngeo, que siempre era de procedencia hospitalaria, no era sometido a RT-PCR de gripe del sobrenadante del cultivo. Por tanto, la mayor tasa de detección de gripe en exudados nasofaríngeos parece asociada con la mayor sensibilidad de la técnica diagnóstica, con la procedencia de las muestras y con la mejor orientación diagnóstica de la vigilancia de la gripe, más que con la calidad de la muestra.

Ellis y Zambón evalúan las diferentes técnicas disponibles para diagnóstico de gripe, señalando la utilidad de la PCR para el manejo del paciente, gracias a su elevada sensibilidad y a la rapidez con la que se obtienen sus resultados (**Ellis y Zambón, 2002**). Otros autores han demostrado la mayor sensibilidad de la RT-PCR sobre el sobrenadante del SV, por encima de otros métodos de diagnóstico como la IF del SV o la RT-PCR directa del sobrenadante, y la han propuesto como mejor método diagnóstico, ya que además permite la recuperación de la cepa viral para su posterior caracterización (**Pérez-Ruiz y cols, 2007**).

Las tasas de detección de gripe fueron significativamente mayores en pacientes a partir de los 3 años de edad. A diferencia del VRS, los virus de la gripe pueden afectar a población perteneciente a todos los grupos de edad. El informe del sistema de Vigilancia de Gripe en España de la temporada 2007-08 concluye que la población menor de 15 años fue la más afectada, como también ocurrió en la temporada 2006-07, destacando además las elevadas tasas de incidencia registradas en el grupo de 15-64 años, con una pendiente de ascenso de la onda epidémica más acusada que en otras temporadas. Puede que la elevada tasa de detección de gripe en nuestra serie en pacientes mayores de 14 años esté relacionada con los datos registrados para la temporada 2007-08 (**Jiménez-Jorge y cols, 2008**).

Los otros VR clásicos, como **VPI, ADV y rinovirus** podrían estar infradiagnosticados en este trabajo (1,5%, 1,6% y 0,6% de las muestras testadas,

respectivamente), debido al método de diagnóstico mediante cultivo en SV o en tubo tradicional. Rinovirus es el agente causal más común de las infecciones respiratorias de vías altas tanto en niños como en adultos. Prácticamente todos los niños han experimentado al menos un catarro por rinovirus a los 2 años (**Blomqvist y cols, 2002; Calvo-Rey y cols, 2006; Allander y cols, 2007b**). Las tasas de detección de estos virus en pacientes hospitalizados es más baja que la que presentan otros estudios (**Calvo y cols, 2008**). La metodología podría haber contribuido a esta diferencia, ya que los estudios presentados recientemente usan técnicas moleculares para esto, que son más sensibles que el cultivo celular.

El tercer VR más detectado en esta serie fue **HBoV**. Nuestra tasa de prevalencia fue del 12%, en consonancia con las tasas presentadas en distintos estudios llevados a cabo en numerosos países, que informan de tasas entre el 1,5 al 11,3% (**Allander y cols, 2007b; Allander y cols, 2005; Manning y cols, 2006; Billaud y cols, 2003**).

hMPV, otro de los VR descrito recientemente, se detectó en el 5,4% de nuestras muestras. Cuando se analiza la tasa de detección de hMPV según la procedencia de las muestras, observamos que en pacientes hospitalarios es el doble de la que se obtiene en pacientes extrahospitalarios. Distintos estudios de seroprevalencia sugieren que la primera infección por hMPV ocurre en el 90% de los niños antes de los 5 años, y los cuadros más graves ocurren en menores de 2 años (**Van den Hoogen y cols, 2001; Ordás y cols, 2006; Heikkinen y cols, 2008; García-García y cols, 2007**), y tienen que ser hospitalizados con clínica de bronquiolitis o neumonía (**Boivin y cols, 2003; Van den Hoogen y cols, 2004; Ordás y cols, 2006**). Esto se corresponde bastante bien con nuestros resultados, según los cuales, el 86,3% de los pacientes con hMPV fueron menores de 3 años, y el 71,2% menores de 1 año, y solo en 3 adultos (1 de ellos hospitalizado y 2 extrahospitalarios) se detectó hMPV; el 85,4% de los pacientes en los que se detectó hMPV recibieron atención hospitalaria; y la muestra en la que se detectó hMPV con mayor frecuencia fue el lavado nasofaríngeo (82,9%). Aunque este virus se ha relacionado con infección respiratoria en adultos inmunocomprometidos (**Nichols y cols, 2008**), y la mayoría de nuestros adultos hospitalizados eran receptores de trasplante (médula ósea y riñón), en nuestro estudio se han detectado pocos casos.

La infección por VRS, gripe y hMPV suele presentarse en forma de epidemias anuales durante los meses de invierno y comienzo de la primavera, entre noviembre y

marzo, con máxima incidencia entre enero y marzo. La infección por hMPV humano (hMPV) es más frecuente al final del invierno y principio de la primavera, entre febrero y abril, cuando suele descender el número de casos de infección por VRS y gripe (**Brodzinski y cols 2009; Boivin y cols, 2003**), tal y como se presentaba en la tabla IV.18 y la figura IV.3 de los resultados.

La investigación de **CoV** se realizó sobre 474 muestras, obteniéndose una tasa de detección del 7,3%. Se detectó NL63 en 14 (3%) muestras, y HKU1 en 3 (0,5%). La tasa de detección de nuevos CoV varía según las series consultadas, en su mayor parte de niños con enfermedad del tracto respiratorio superior y/o inferior, situándose entre el 1,7-9,3% para CoV-NL63 (**Koetz y cols, 2006; Han y cols, 2007; Bastien y cols, 2005; Boivin y cols, 2005; Chiu y cols, 2005; Ebihara y cols, 2005b; Van der Hoek y cols, 2005; Vabret y cols, 2005**), y el 1-3% para CoV-HKU1 (**Sloots y cols, 2006; Esper y cols, 2006; Lau y cols, 2006**).

No se observaron diferencias significativas en la detección de CoV con respecto a la temporada analizada, ni entre muestras hospitalarias y extrahospitalarias, ni según el tipo de muestra. Se detectan durante todo el año, sin que se aprecie ningún patrón estacional. Tampoco se relacionaron con el sexo de los pacientes, ni con ningún grupo de edad.

Un hallazgo bastante común en las series publicadas de infecciones respiratorias víricas es la frecuencia con la que se observan las infecciones con dos o más virus, **coinfecciones o codetecciones**. Los datos publicados en la literatura, sobre infecciones mixtas son muy variables, y pueden ser reflejo de la utilización de técnicas más sensibles que detectan virus que afectan fundamentalmente a vías respiratorias altas, como HBoV y rinovirus. Así, en un trabajo realizado entre 1997 y 1999 en el que investigan seis virus clásicos y mediante técnicas de detección de antígeno y cultivo convencional solo se encuentran un 0,9% de infecciones mixtas (**Tsai y cols, 2001**). En cambio, trabajos en los que se investigan también los nuevos VR, con técnicas de PCR, se obtienen tasas mucho más altas. Por ejemplo, Jartti y cols encuentran un 19% de infecciones mixtas (**Jartti y cols, 2004**), Boivin y cols, un 14% (**Boivin y cols, 2003**) y Lambert y cols un 10%, aunque no analizan la presencia de HBoV (**Lambert y cols, 2007**). De ahí que parezca más correcto hablar de codetecciones en lugar de coinfecciones.

El papel de las codetecciones es difícil de establecer. Mientras algunos autores encuentran que confieren gravedad al cuadro, o al menos que influyen en el curso natural de las infecciones, otros creen que no aportan mayor gravedad (**Boivin y cols, 2003**), y otros presentan datos que sugieren que las infecciones de vías bajas más graves están normalmente producidas por un solo agente viral (**Weissbrich y cols, 2006**). Son muchos los trabajos que proponen la realización de estudios que incluyan grupos controles y/o cuantificación de la carga viral para descartar los casos de colonización asintomática del tracto respiratorio o de excreción prolongada de VR en pacientes ya recuperados de una infección previa.

El virus más frecuentemente implicado en codetecciones de este trabajo fue HBoV (4,9% del total de muestras procesadas), seguido de CoV (en el 1% de las muestras procesadas). Las combinaciones más frecuentes fueron de HBoV y VRS (28,2% del total de codetecciones), HBoV y gripe (27%), y HBoV y hMPV (17,6%). Otras codetecciones con ADV, VPI, VHS-1 y CMV fueron menos frecuentes. Aunque la mayoría de las codetecciones estaban formadas por la combinación de dos virus también se encontraron combinaciones de tres (HBoV + gripe + CoV en 2 ocasiones, HBoV + hMPV + VPI 3 en otra, HBoV + VRS + CoV en otra, y VRS + dos tipos distintos de CoV).

En aproximadamente la mitad de los casos de nuestro trabajo, CoV se detectó junto con otro VR. Por otra parte, diversos artículos apuntan el desconocido papel de CoV (**Smuts y Hardie, 2006; Sloots y cols, 2006**), debido a su prolongado período de excreción, por lo que estas codetecciones junto con alguno de los patógenos “no discutidos” (gripe, VRS, hMPV) podrían ser en realidad reflejo de una IRA por uno de estos VR unido a la excreción residual de una IRA pasada por CoV.

V.III. PAPEL DE HBoV COMO PATÓGENO RESPIRATORIO

En la literatura son bastante frecuentes las infecciones respiratorias con implicación de HBoV y algún otro VR. Se han descrito en el 5-83% de las IRA, según los estudios (**Fry y cols, 2007**). Además, se ha hablado de la posibilidad de persistencia o excreción viral prolongada de HBoV (**Manning y cols, 2006**), y de la existencia de virus que se transmiten por vía respiratoria y se detectan en muestras respiratorias, pero que no ocasionan síntomas respiratorios significativos. Por todo ello, se pone en duda el verdadero papel patógeno de HBoV en los casos de IRA en que se

detecta (**McIntosh, 2006; Martin y cols, 2009**), y se echan de menos más estudios que incluyan grupos control de individuos asintomáticos (**Allander y cols, 2007b; Fry y cols, 2007; Kesebir y cols, 2006; Maggi y cols, 2007; Manning y cols, 2007**) y estudios realizados en la comunidad.

Al igual que la mayoría de los autores (**Allander y cols, 2005; Smuts y cols, 2006; Kesebir y cols, 2006**), este trabajo reconoce una distribución estacional de HBoV similar al de VRS, con mayor tasa de detección durante los meses de invierno y primavera, y picos de incidencia en los meses de enero y febrero.

Aunque son pocos los estudios sistemáticos que incluyen pacientes adultos, éstos indican mayor prevalencia de HBoV en tracto respiratorio de niños (**Allander y cols, 2005; Bastien y cols, 2006; Fry y cols, 2007; Manning y cols, 2006**). Sin embargo, en este trabajo, no se encontraron diferencias en los distintos grupos de edad estudiados. No obstante, sí se observaron cargas virales más altas en la población pediátrica, especialmente en niños menores de 1 año. Estos resultados no son sorprendentes, ya que los niños tienen títulos más altos de excreción de VR.

La detección de HBoV se ha relacionado en distintos estudios más frecuentemente con tos, rinorrea y fiebre, además de cuadros con afectación del tracto respiratorio inferior, rash cutáneo, otitis (**Allander y cols, 2005; Ma y cols, 2006; Lindner y Modrow, 2008; Kahn, 2008**) y síntomas gastrointestinales (**Arnold y cols, 2006; Kesebir y cols, 2006; Monteny y cols, 2007; Vicente y cols, 2007; Lee y cols, 2007**). Sin embargo, en esta serie no se pudo reconocer una asociación clara entre la detección de HBoV y los síntomas de SG, en contraste con la gripe, que se asoció de forma significativa con fiebre, tos y clínica de gripe típica, al igual que Navarro-Marí y cols observaron en un estudio previo (**Navarro-Marí y cols, 2005**).

Tampoco se encontraron diferencias significativas en la tasa de detección de HBoV entre pacientes hospitalarios y extrahospitalarios, aunque estudios previos habían informado de más HBoV en casos hospitalarios con neumonía (**Brouard y cols, 2007; Chow y Esper, 2009**)

Ante la dificultad para estudiar lo que ocurría con HBoV en un grupo control de individuos sanos, se decidió comparar las tasas de detección de HBoV en el grupo de pacientes positivos para otros VR no-HBoV y el grupo de pacientes negativos para otros VR no-HBoV. Estas tasas de detección fueron similares. En contraste, se

obtuvieron diferencias significativas cuando el mismo análisis se hizo para VRS, gripe y hMPV. Como ocurre con otros VR, HBoV podría permanecer asintomático en tracto respiratorio durante un tiempo prolongado (**Chow y Esper, 2009**). Este es otro motivo por el cual un resultado positivo para HBoV probablemente no pueda dar la misma información que la detección de otros virus como VRS, gripe y hMPV, en términos de significación clínica.

También se pensó que la detección de HBoV podría tener significación clínica cuando se detectaba una carga viral alta, como se ha apuntado en estudios previos (**Kleines y cols, 2007; Fry y cols, 2007; Lin y cols, 2007**). Se estableció un punto de corte para el Cp con valor de 28, lo que correspondía aproximadamente a 10^4 copias/reacción, según lo descrito en el trabajo de Lu y cols (**Lu y cols, 2006**). Aunque se hicieron algunas modificaciones al método descrito por Lu y cols, dado que demostramos una buena reproducibilidad, asumimos que el punto de corte establecido claramente diferenciaba entre pacientes con carga viral de HBoV más alta y más baja. Ninguna muestra extrahospitalaria tuvo una carga de HBoV alta, en contraste con el 16,7% de las muestras hospitalarias. Pero, como todas las muestras con carga viral alta de HBoV fueron aspirados nasofaríngeos, y las muestras hospitalarias (aspirados nasofaríngeos) fueron diferentes de las obtenidas en pacientes extrahospitalarios (escobillones nasal y faríngeo), no se pudo evaluar este dato.

Las cargas virales más altas de HBoV no estuvieron estadísticamente asociadas con enfermedad del tracto respiratorio inferior. Sin embargo, sí es cierto que todos los pacientes con mayor carga viral de HBoV ($Cp \leq 28$) en los que se detectó HBoV como el único agente tuvieron enfermedad del tracto respiratorio inferior.

VI. CONCLUSIONES

1. VRS y gripe fueron los virus más frecuentemente detectados, seguidos de bocavirus y metapneumovirus.
2. Se detectan en nuestro medio los nuevos CoV NL63 y HKU1.
3. La mayor tasa de detección de virus respiratorios se obtuvo en lavado nasofaríngeo y en niños menores de 1 año.
4. La detección del virus de la gripe fue significativamente mayor en las muestras extrahospitalarias, pertenecientes a la vigilancia virológica de la gripe en Andalucía. Por el contrario, La detección de hMPV se produjo sobre todo en niños menores de 1 año que recibieron atención hospitalaria.
5. No se observaron diferencias significativas en la detección de HBoV y CoV con respecto a la temporada analizada o procedencia, sexo y edad de los pacientes, aunque una carga viral elevada de HBoV se asoció a niños menores de 1 año y lavado nasofaríngeo.
6. La tasa de detección de virus respiratorios está condicionada por la técnica empleada. El empleo de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos mejora de forma considerable el procedimiento diagnóstico. De ahí que podrían estar infradiagnosticados en este trabajo otros virus respiratorios, como VPI, ADV y rinovirus.
7. Aunque se producen a lo largo de todo el año, las infecciones respiratorias agudas tienden a distribuirse estacionalmente, de forma que coinciden los picos de máxima incidencia de VRS, gripe y HBoV, y más tarde se produce el de hMPV. Por el contrario, la detección de CoV no sigue ningún patrón estacional.
8. El uso de técnicas de biología molecular pone de manifiesto el gran número de codetecciones de virus respiratorios en muestras de pacientes con IRA. El virus más frecuentemente implicado en codetecciones de este trabajo fue HBoV, seguido de CoV.
9. Ninguno de los síntomas de IRA del tracto superior se relacionó con la detección de HBoV y sí con la detección de gripe, la cual se asoció con la presencia de fiebre, tos y criterios clínicos de gripe típica. Tampoco se pudo relacionar una

elevada carga viral de HBoV con afectación del tracto respiratorio inferior ni con la presencia de otro patógeno viral.

10. La tasa de detección de HBoV fue similar en el grupo de pacientes con muestras positivas para virus no-HBoV y en el grupo de muestras negativas para virus no-HBoV. En cambio, la detección de VRS, gripe y hMPV fue significativamente mayor cuando no se detectaban otros virus respiratorios.
11. El coste/beneficio de la investigación rutinaria de HBoV en pacientes con IRA ha de ser evaluado en cada laboratorio. Este análisis podría restringirse a casos concretos en los que la gravedad de la infección y/o la ausencia de otro patógeno respiratorio lo justificara.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abed Y, Wang D, Boivin G. *WU polyomavirus in children, Canada.* Emerg Infect Dis 2007; 12: 1939-41.

Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B. *Identification of a third human polyomavirus.* J Virol 2007a; 81: 4130-6.

Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, Vuorinen T, Waris M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, van den Hoogen BG, Hyypiä T, Ruuskanen O. *Human bocavirus and acute wheezing in children.* Clin Infect Dis 2007b; 44: 904-10.

Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. *Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples.* Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 12891-6.

Anderson LJ. Human Bocavirus: a new viral pathogen. Clin Infect Dis 2007; 44: 911–2.

Andréoletti L, Lesay M, Deschildre A, Lambert V, Dewilde A, Wattre P. *Differential detection of rhinoviruses and enteroviruses RNA sequences associated with classical immunofluorescence assay detection of respiratory virus antigens in nasopharyngeal swabs from infants with bronchiolitis.* J Med Virol 2000; 61: 341-6.

Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. *Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections.* J Med Virol 2006; 78: 1232-40.

Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. *Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital.* Clin Infect Dis 2006; 43: 283-8.

Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. *Undiagnosed respiratory viruses in children.* Pediatrics 2008; 121: e631-7.

Atmar RL. *Influenza Viruses.* In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. 9th edition. Washington DC, 2007. ASM PRESS, p: 1340-1351.

Barenfanger J, Drake C, Leon N, Mueller T, Troutt T. *Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study.* J Clin Microbiol 2000; 38: 2824-8.

Bastien N, Robinson JL, Tse A, Lee BE, Hart L, Li Y. *Human coronavirus NL-63 infections in children: a 1-year study.* J Clin Microbiol 2005; 43: 4567-73.

Beigel JH, Farrar J, Han AM, Hayden FG, Hyer R, de Jong MD, Lochindarat S, Tien NTK, Hien NT, Hien TT, Nicoll A, Penh P, Yuen KY. The Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. *Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans.* N Engl J Med 2005; 353: 1374-85.

Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, Jacob K, Bletchly C, Wangd D, Nissen MD, Sloots TP. *Presence of the newly discovered human polyomaviruses KI and WU in Australian patients with acute respiratory tract infection.* J Clin Virol 2008; 41: 63-8.

Billaud G, Peny S, Legay V, Lina B, Valette M. *Detection of rhinovirus and enterovirus in upper respiratory tract samples using a multiplex nested PCR.* J Virol Methods 2003; 108: 223-8.

Blomqvist S, Roivainen M, Puhakka T, Kleemola M, Hovi T. *Virological and serological analysis of rhinovirus infections during the first two years of life in a cohort of children.* J Med Virol 2002; 66: 263-8.

Bloom B y Cohen RA. *Summary health statistics for U.S. children. National health interview survey, 2006.* Vital Health Stat 2007; 10: 1-79.

Boivin G, Baz M, Côté S, Gilca R, Deffrasnes C, Leblanc E, Bergeron MG, Déry P, De Serres G. *Infections by human coronavirus-NL in hospitalized children.* Pediatr Infect Dis J 2005; 24: 1045-8.

Boivin G, De Serres G, Côté S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, Bergeron MG, Déry P. *Human Metapneumovirus infections in hospitalized children.* Emerg Infect Dis 2003; 6: 634-40.

Borek AP, Clemens SH, Gaskins VK, Aird DZ, Valsamakis A. *Respiratory syncytial virus detection by Remel Xpect, Binax Now RSV, direct immunofluorescent staining, and tissue culture.* J Clin Microbiol 2006; 3: 1105-7.

Brieu N, Gay B, Segondy M, Foulongne V. *Electron microscopy observation of human bocavirus (HBoV) in nasopharyngeal samples from HBoV-infected children.* J Clin Microbiol 2007; 45: 3419-20.

Brodzinski H, Ruddy RM. *Review of new and newly discovered respiratory tract viruses in children.* Pediatr Emerg Care 2009; 5: 352-63.

Brouard J, Vabret A, Nimal-Cuvillon D, Bach N, Bessière A, Arion A, Freymuth F. *Epidemiology of acute upper and lower respiratory tract infections in children.* Rev Prat. 2007; 57:1759-66.

Calicó Bosch I, Navas Elorza E. *Infecciones por Adenovirus.* En: Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed. Médica Panamericana. Madrid 2005; 775-781.

Calvo C, García-García ML, Blanco C, Pozo F, Flecha IC, Pérez-Breña P. *Role of rhinovirus in hospitalized infants with respiratory tract infections in Spain.* Pediatr Infect Dis J 2007; 26: 904-8.

Calvo C, García-García ML, Pozo F, Carvajal O, Pérez-Breña P, Casas I. *Clinical characteristics of Human Bocavirus infections compared with other respiratory viruses in spanish children.* Pediatr Infect Dis J 2008; 27: 677-80.

Carratalà-Fernández J, Verdaguer-Rius R. *Infecciones pleuropulmonares.* En: Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed Médica Panamericana. Madrid 2005: 1217-28.

Casas I, Pozo F. *Síndrome respiratorio agudo grave, gripe aviar e infección por metapneumovirus humano.* Enferm Infecc Microbiol Clin 2005 448:438-48

Chan, M. 20 June 2009, posting date. World now at the start of 2009 influenza pandemic. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_2009_611/en

Chiu SS, Chan KH, Chu KW, Kwan SW, Guan Y, Poon LL, Peiris JS. *Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China.* Clin Infect Dis. 2005; 40: 1721-9.

Choo YJ, Kim SJ. *Detection of human adenoviruses and enteroviruses in Korean oysters using cell culture, integrated cell culture-PCR, and direct PCR.* J Microbiol 2006; 2: 162-70.

Chow BDW, Esper FP. *The human bocaviruses: a review and discussion of their role in infection.* Clin Lab Med 2009; 29: 695-713.

Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Perez-Breña P. *Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays.* J Med Virol 2004; 72: 484-95.

Darville T, Yamauchi T. *Respiratory syncytial virus.* Pediatr Rev 1998; 2: 55-61.

Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki TM. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, *Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans.* N Engl J Med 2009; 360: 2605-15.

Denny FW, Clyde WA. *Acute lower respiratory tract infections in nonhospitalized children.* J Pediatr 1986; 108: 635-46.

Dolin R. *Influenza.* In: Harrison's. Principles of Internal Medicine. WilsonJD, Braunwald E et al. editors. 12th ed. Mc Graw-Hill. Inc. 1991: 695-700.

Dominguez SR, Anderson MS, Glodé MP, Robinson CC, KV Holmes. Blinded case-control study of the relationship between human coronavirus NL63 and Kawasaki

syndrome. J Infect Dis 2006; 194: 1697-701.

Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H. Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent-antibody test. J Clin Microbiol 2005a; 43: 1138-41.

Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H. *Detection of human coronavirus NL63 in young children with bronchiolitis.* J Med Virol 2005b; 75: 463-5.

Ellis JS, Zambon MC. *Molecular diagnosis of influenza.* Rev Med Virol 2002; 12: 375-89.

Endo R, Ishiguro N, Kikuta H, Teramoto S, Shirkoohi R, Ma X, Ebihara T, Ishiko H, Ariga T. *Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido Prefecture, Japan.* J Clin Microbiol 2007; 10: 3218-23.

Esper F, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. *Coronavirus HKU1 infection in the United States.* Emerg Infect Dis 2006; 12: 775-9.

Esper F, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. *Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children.* J Infect Dis 2005; 191: 492-8.

Fortuny Guash C, Pumarola Suñé T. *Infecciones por Enterovirus: virus Coxsackie, Echovirus y nuevos Enterovirus.* En: Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed Médica Panamericana. Madrid 2005: 731-7.

Fouchier RAM, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, Osterhaus ADME. *A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans.* Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 6212-6.

Fredricks DN, Relman DA. *Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates.* Clin Microbiol Rev. 1996; 9: 18-33.

Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, Anderson LJ, Erdman D, Olsen SJ. *Human Bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand.* J Infect Dis 2007; 195: 1038-45.

García-García ML, Calvo C, Casas I, Bracamonte T, Rellán A, Gozalo F, Tenorio T, Pérez-Breña P. *Human metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5.* Pediatr Pulmonol 2007; 42:458-64.

Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, Sessions WM, Xu X, Skepner E, Deyde V, Okomo-Adhiambo M, Gubareva L, Barnes J, Smith CB, Emery SL, Hillman MJ, Rivaller P, Smagala J, de Graaf M, Burke DF, Fouchier RA, Pappas C, Alpuche-Aranda CM, López-Gatell H, Olivera H, López I, Myers CA, Faix

D, Blair PJ, Yu C, Keene KM, Dotson PD Jr, Boxrud D, Sambol AR, Abid SH, St George K, Bannerman T, Moore AL, Stringer DJ, Blevins P, Demmler-Harrison GJ, Ginsberg M, Kriner P, Waterman S, Smole S, Guevara HF, Belongia EA, Clark PA, Beatrice ST, Donis R, Katz J, Finelli L, Bridges CB, Shaw M, Jernigan DB, Uyeki TM, Smith DJ, Klimov AI, Cox NJ. *Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans.* Science 2009; 325: 197-201.

Gaynor AM, Nissen MD, Wilely DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D. *Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections.* PLoS Pathog. 2007; 3: 0595-0604.

Gillim-Ross I, Subbarao K. *Emerging respiratory viruses: challenges and vaccine strategies.* Clin Microbiol Rev 2006; 4: 614-36.

Glezen WP, Couch RB. *Influenza viruses.* En: Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control. 4th ed. Evans and Kaslow editors. Pleum Medical. 1997: 473-505.

Gobernado-Serrano M, Menéndez-Villanueva R. *Infecciones bronquiales.* En: Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed Médica Panamericana. Madrid 2005: 1209-15.

Gonzales R, Malone DC, Maselli JH, Sande MA. *Excessive antibiotic use for acute respiratory infections in the United States.* Clin Infect Dis. 2001; 33: 757-62.

Greenough A. *Insights from the Sixth Global ExpertsqMeeting (GEM) on respiratory viruses. The year in review.* Paediatr Respirat Rev 2009; 10 Suppl 1: 2-5.

Han TH, Chung JY, Kim SW, Hwang ES. *Human Coronavirus-NL63 infections in Korean children, 2004-2006.* J Clin Virol 2007a; 38: 27-31.

Han TH, Chung JY, Koo JW, Kim SW, Hwang ES. *WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, South Korea.* Emerg Infect Dis 2007b; 13: 1766-8.

Heikkinen T, Österback R, Peltola V, Jartti T, Vainionpää R. *Human metapneumovirus infections in children.* Emerg Infect Dis 2008; 14: 101-6.

Henderson FW, Clyde WA Jr, Collier AM, Denny FW, Senior RJ, Sheaffer CI, Conley WG 3rd, Christian RM. *The etiologic and epidemiologic spectrum of bronchiolitis in pediatric practice.* J Pediatr. 1979; 95: 183-90.

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

Hodinka RL. *Human cytomegalovirus.* In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. 9th edition. Washington DC, 2007. ASM PRESS: 1549-63.

Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Población y área de influencia. Disponible en: http://www.hvn.es/comp_hospitalario/datos_generales/index.php (actualizada el 13-09-2010).

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology division, 2009. Disponible en: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>

Iwane MK, Edwards KM, Szilagyi PG, Walker FJ, Griffin MR, Weinberg GA, Coulen C, Poehling KA, Shone LP, Balter S, Hall CB, Erdman DD, Wooten K, Schwartz B, for the New Vaccine Surveillance Network. *Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and parainfluenza viruses among young children.* Pediatrics 2004; 113: 1758-64.

Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Osterback R, van den Hoogen B, Osterhaus AD, Ruuskanen O. *Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children.* Emerg Infect Dis 2004; 10: 1095-101.

Jerome KR, Morrow RA. *Herpes simplex viruses and Herpes B virus.* In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. 9th edition. Washington DC, 2007. ASM PRESS: 1523-36.

Jiménez-Jorge S, Larrauri-Cámara A, de Mateo-Ontañón S. En representación del Grupo de Vigilancia de la Gripe en España. Vigilancia de la Gripe en España. Resumen de la temporada 2006-2007. Disponible en:

http://vgripe.isciii.es/gripe/documentos/20062007/InformesAnuales/Informe_Temporada_06-07.pdf

Jiménez-Jorge S, de Mateo-Ontañón S, Larrauri-Cámara A. En representación del Grupo de Vigilancia de la Gripe en España. Vigilancia de la Gripe en España. Resumen de la temporada 2007-2008. Disponible en:

[http://www.isciii.es/htdocs/pdf/Vigilancia de la Gripe en Espana Informe de Temporada 2007-2008.pdf](http://www.isciii.es/htdocs/pdf/Vigilancia_de_la_Gripe_en_Espana_Informe_de_Temporada_2007-2008.pdf)

Jonathan N. *Diagnostic utility of BINAX NOW RSV . an evaluation of the diagnostic performance of BINAX NOW RSV in comparison with cell culture and direct immunofluorescence.* Ann Clin Microbiol Anti-microb 2006, 5:13

Jones MS, Kapoor A, Lukashov VV, Simmonds P, Hecht F, Delwart E. *New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome.* J Virol. 2005; 79: 8230-6.

Kahn J. *Human bocavirus: clinical significance and implications.* Curr Opin Pediatr 2008; 20:62-66.

Kahn JS, McIntosh K. *History and recent advances in coronavirus discovery.* Pediatr Infect Dis J 2005; 24: S223-7.

Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. *Human Bocavirus infection in young children in the United States: Molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus.* J Infect Dis 2006; 194: 1276-82.

Kleines M, Scheithauer S, Rackowitz A, Ritter K, Häusler M. *High prevalence of human bocavirus detected in young children with severe acute lower respiratory tract disease by use of a standard PCR protocol and a novel real-time PCR protocol.* J Clin Microbiol 2007; 3: 1032-4.

Koetz A, Nilsson P, Lindén M, van der Hoek L, Ripa T. *Detection of human coronavirus NL63, human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in children with respiratory tract infections in south-west Sweden.* Clin Microbiol Infect 2006; 12: 1089-96.

Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ,

Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ; SARS Working Group. *A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome.* N Engl J Med 2003; 348: 1953-66.

Kusel MMH, de Klerk NH, Holt PG, Keadze T, Johnston SL, Sly PD. *Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life. A birth cohort study.* Pediatr Infect Dis 2006; 25: 680-6.

Kuypers J, Martin ET, Heugel J, Wright N, Morrow R, Englund JA. *Clinical disease in children associated with newly described coronavirus subtypes.* Pediatrics, 2007; 119: e70-6.

Kuypers J, Wright N, Morrow R. *Evaluation of quantitative and type-specific real-time RT-PCR assays for detection of respiratory syncytial virus in respiratory specimens from children.* J Clin Virol 2004; 31: 123-9.

La Scola B, Marrie TJ, Auffray JP, Raoult D. *Mimivirus in pneumonia patients.* Emerg Infect Dis. 2005; 11: 449-52.

Lambert SB, Allen KM, Druce JD, Birch CJ, Mackay IM, Carlin JB, Carapetis JR, Sloots TP, Nissen MD, Nolan TM. *Community epidemiology of human metapneumovirus, human coronavirus NL63, and other respiratory viruses in healthy preschool-aged children using parent-collected specimens.* Pediatrics 2007; 120: e929-37.

Landry ML. *Rhinoviruses.* In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. 9th edition. Washington DC, 2007. ASM PRESS: 1405-13.

Lau SKP, Woo PCY, Tse H, Tsoi H, VCC. Cheng, Lee P, Tang BSF, C, Lee RA, L, Lau Y, Chan K, Yuen K. *Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong.* J Clin Microbiol 2006; 44: 2063-71.

Lee JI, Chung JY, Han TH, Song MO, Hwang ES. *Detection of human Bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis.* J Infect Dis 2007; 196: 994-7.

Leland DS. *Parainfluenza and Mumps Viruses.* In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. 9th edition. Washington DC, 2007. ASM PRESS, p: 1352-1360.

Lindner J, Modrow S. *Human Bocavirus. A novel parvovirus to infect humans.* Intervirology. 2008; 9:116-22.

Lin F, Zheng M, Li H, Zheng C, Li X, Rao G, Zheng M, Wu F, Zeng A. *WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, China.* J Clin Virol 2008; 42: 94-102.

Lin F, Zeng A, Yang N, Lin H, Yang E, Wang S, Pintel D, Qiu J. *Quantification of human bocavirus in lower respiratory tract infections in China.* Infect Agent Cancer 2007; 2: 3.

Linde A, Falk KI. *Epstein-Barr virus.* In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. 9th edition. Washington DC, 2007. ASM PRESS: 1564-73.

Louie JK, Hacker JK, Gonzales R, Mark J, Maselli JH, Yagi S, Drew WL. *Characterization of viral agents causing acute respiratory infection in a San Francisco University Medical Center Clinic during the influenza season.* Clin Infect Dis 2005; 41: 822-8.

Lu X, Chittaganpitch M, Olsen SJ, Mackay IM, Sloots TP, Fry AM, Erdman DD. *Real-time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens.* J Clin Microbiol 2006; 44: 3231-35.

Ma X, Endo R, Ishiguro N, Ebihara T, Ishiko H, Ariga T, Kikuta H. *Detection of Human Bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections.* J Clin Microbiol 2006; 3: 1132-4.

Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB, Quinto JD, Chu M, de Graaf M, van den Hoogen BD, Spaete R, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. *Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages.* J Clin Microbiol 2004; 42: 981-6.

Maggi F, Andreoli E, Pifferi M, Meschi S, Rocchi J, Bendinelli M. *Human bocavirus in Italian patients with respiratory diseases.* J Clin Virol 2007; 38: 321-5.

Mahony JB. *Coronaviruses.* In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. 9th edition. Washington DC, 2007. ASM PRESS: 1414-23.

Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter GH, Hallaman N, Templeton K, Simmonds P. *Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses.* J Infect Dis 2006; 194:1283-90.

Manning A, Willey SJ, Bell JE, Simmonds P. *Comparison of tissue distribution, persistence, and molecular epidemiology of parvovirus B19 and novel human parvoviruses PARV4 and human bocavirus.* J Infect Dis. 2007; 195: 1345-52.

Marcos Maeso MA, de Benito Hernández MN. *Infecciones por Rinovirus y Coronavirus. Síndrome respiratorio agudo grave.* En: Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. Ed Médica Panamericana. Madrid 2005; 873-885.

Martin ET, Taylor J, Kuypers J, Magaret A, Wald A, Zerr D, Englund JA. *Detection of Bocavirus in saliva of children with and without respiratory illness.* J Clin Microbiol 2009; 12: 4131-2.

McErlean P, Shackelton LA, Lambert SB, Nissen MD, Sloots TP, Mackaya IM. *Characterisation of a newly identified human rhinovirus, HRV-QPM, discovered in infants with bronchiolitis.* J Clin Virol 2007; 39: 67-75.

McIntosh K. *Human Bocavirus: developing evidence for pathogenicity.* J Infect Dis 2006; 194: 1197-9.

Melón-García S, Santamaría-Jauregui JM. *Infecciones por los virus del herpes simple tipos 1 y 2.* En: Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Ed Médica Panamericana. Madrid 2005: 731-7.

Moës E, Vijgen L, Keyaerts E, Zlateva K, Li S, Maes P, Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L, Van Ranst M. *A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium.* BMC Infect Dis 2005; 5:6.

Monteny M, Niesters HG, Moll HA, Berger MY. *Human bocavirus in febrile children, The Netherlands.* Emerg Infect Dis 2007; 13: 180-2.

Monto AS. *Occurrence of respiratory virus: time, place and person.* Pediatr Infect Dis J 2004; 1: S58-64.

Murphy BR, Webster RG. *Orthomyxoviruses.* In: Fields Virology. Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al, editors. 3^a ed. Philadelphia, 1996: Lippincott-Raven Publ, p: 1397-445.

Navarro-Marí JM, Mayoral-Cortés JM, Pérez-Ruiz M, Rodríguez-Baño J, Carratalá J, Gallardo-García V. *Infección en humanos por virus de la gripe A (H1N1): revisión a 30 de octubre de 2009.* Enferm Infecc Microbiol Clin 2010 ; 28: 446-52.

Navarro-Marí JM, Palacios-del-Valle E, Pérez-Ruiz M, de la Rosa M. *The impact of influenza viruses on hospitalizations in infants younger than two years old during epidemics of respiratory syncytial virus infection.* Clin Microbiol Infect 2003; 9: 959-63.

Navarro-Marí JM, Pérez-Ruiz M. *Virus respiratorios: viejos y nuevos virus. Revisión de métodos diagnósticos.* Enferm Infecc Microbiol Clin 2007; 25 Supl 3: 60-65.

Navarro-Marí JM, Pérez-Ruiz M, Cantudo-Muñoz P, Petit-Gancedo C, Jiménez-Valera M, Rosa-Fraile M; *Influenza Surveillance Network in Andalusia, Spain. Influenza-like illness criteria were poorly related to laboratory-confirmed influenza in a sentinel surveillance study.* J Clin Epidemiol. 2005; 58: 275-9.

Navarro-Marí JM, Sanbonmatsu-Gámez S, Pérez-Ruiz M, de la Rosa-Fraile 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; 7: 2346-7.

Neske F, Blessing K, Tollmann F, Schubert J, Rethwilm A, Kreth HW, Weissbrich B. *Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis.* J Clin Microbiol 2007; 7: 2116-22.

Neuzil KM, Maynard C, Griffin MR, Heagerty P. *Winter respiratory viruses and health care use: a population-based study in the Northwest United States.* Clin Infect Dis 2003; 37: 201-7.

Neuzil KM, Mellen BG, Wright PF, Mitchel EF, 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, Tollefson SJ, Wright PF. *Burden of interpandemic influenza in children younger than 5 years: a 25-year prospective study.* J Infect Dis 2002; 185: 147-52.

Nichols WG, Peck Campbell AJ, Boeckh M. *Respiratory viruses other than influenza virus: impact and therapeutic advances.* Clin Microbiol Rev 2008; 21: 274-90.

Nuibó Bosch J. *Infecciones por virus parainfluenza.* En: Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed Médica Panamericana. Madrid 2005; 841-5.

Ohm-Smith MA, Nassos PS, Haller BL. *Evaluation of the Binax NOW, BD Directigen, and BD EZ assays for detection of respiratory syncytial virus.* J Clin Microbiol 2004; 42: 2996-9.

Ordás J, Boga JA, Álvarez-Argüelles M, Villa L, Rodríguez-Dehli C, de Oña M, Rodríguez J, Melón S. *Role of metapneumovirus in viral respiratory infections in young children.* J Clin Microbiol 2006; 44: 2739-42.

Ortiz de Lejarazu L, Rodríguez-Torres A. *Gripe.* En: Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed. Médica Panamericana. Madrid 2005: 855-71.

Pallans MA, Ross RP. *Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses.* En: Knipe DM, Howley PM (eds.). En: Fields Virology, 4^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001; 723-776.

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

Pérez-Ruiz M, Yeste R, Ruiz-Pérez MJ, Ruiz-Bravo A, de la Rosa-Fraile M, Navarro-Marí JM. *Testing of Diagnostic Methods for Detection of Influenza Virus for Optimal Performance in the Context of an Influenza Surveillance Network.* J Clin Microbiol. 2007; 9: 3109-10.

Pérez-Sáenz JL, Cisneros-Herreros JM. *Infecciones por citomegalovirus.* En: Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed Médica Panamericana. Madrid 2005: 747-7.

Pérez-Trallero E, Vicente-Anza D. *Infecciones de las vías respiratorias superiores.* En: Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed Médica Panamericana. Madrid 2005: 1201-8.

Pyrk K, Berkhout B, van der Hoek L. *The novel human coronaviruses NL63 and HKU1.* J Virol 2007; 81: 3051-7.

Rabella-García N, Blanes-Juliá M. *Infecciones por Virus Respiratorio Sincitial y Metapneumovirus.* En: Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed Médica Panamericana. Madrid 2005: 847-53.

Rawlinson WD, Waliuzzaman Z, Carter IW, Belessis YC, Gilbert KM, Morton JR. *Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection.* J Infect Dis 2003; 187: 1314-18.

Ren L, Gonzalez R, Xie Z, Zhang J, Liu C, Li J, Li Y, Wang Z, Kong X, Yao Y, Hu Y, Qian S, Geng R, Yang Y, Vernet G, Paranhos-Baccalà G, Jin Q, Shen K, Wang J. *WU and KI polyomavirus present in the respiratory tract of children, but not in immunocompetent adults.* J Clin Microbiol 2008; 43: 330-3.

Robinson C, Echevarria M. *Adenoviruses.* In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. 9th edition. Washington DC, 2007. ASM PRESS, p: 1589-600.

Romero JR. *Enteroviruses and Parechoviruses.* In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. 9th edition. Washington DC, 2007. ASM PRESS: 1392-404.

Rovida F, Percivalle E, Zavattoni M, Torsellini M, Sarasini A, Campanini G, Paolucci S, Baldanti F, Revello MG, Gerna G. (2005), *Monoclonal antibodies versus reverse transcription-PCR for detection of respiratory viruses in a patient population with respiratory tract infections admitted to hospital.* J Med Virol 2005, 75: 336-47.

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

Schildgen O, Geikowski T, Glatzel T, Simon A, Wilkesmann A, Roggendorf M, Viazov S, Matz B. *New variant of the human metapneumovirus (hMPV) associated with an acute and severe exacerbation of asthma bronchiale.* J Clin Virol 2004; 31: 283-8.

Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, Arden KE, Nissen MD, Mackay IM. *Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children.* J Clin Virol 2006; 35: 99-102.

Sloots TP, Whiley DM, Lambert SB, Nissen MD. *Emerging respiratory agents: New viruses for old diseases?* J Clin Virol 2008; 42: 233-43.

Smit M, Beynon KA, Murdoch DR, Jennings LC. *Comparison of the NOW Influenza A & 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 Infect Dis. 2007; 57: 67-70.

Smuts H, Hardie D. *Human bocavirus in hospitalized children, South Africa.* Emerg Infect Dis 2006; 12: 1457-8.

Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. *Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses.* J Clin. Microbiol 1998; 36: 2990-5.

Sullender WM. *Respiratory syncytial virus genetic and diversity.* Clin Microbiol Rev 2000; 1: 1-15.

Tang Y, Crowe JE Jr. *Respiratory syncytial virus and human metapneumovirus.* In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. 9th edition. Washington DC, 2007. ASM PRESS, p: 1361-77.

Tsai H, Kuo P, Liu C, Wang J. *Respiratory viral infections among pediatric inpatients and outpatients in Taiwan from 1997 to 1999.* J Clin Microbiol 2001; 39: 111-8.

Townsend MB, Dawson ED, Mehlmann M, Smagala JA, Dankbar DM, Moore CL, Smith CB, Cox NJ, Kuchta RD, Rowlen KL. *Experimental Evaluation of the FluChip*

Diagnostic Microarray for Influenza Virus Surveillance. J Clin Microbiol 2006; 44: 2863-71.

Treanor JJ. *Orthomyxoviridae. Influenza Virus.* En: Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell, Douglas and Bennett. Vol 2. Mandell GL, Bennett JE and Dolin R editors. 5th ed. Churchill Livingstone. 2000: 1823-45.

Tregoning JS, Schwarze J. *Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology.* Clin Microbiol Rev 2010; 23: 74-98.

Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, Yee WK, Wang T, Chan-Yeung M, Lam WK, Seto WH, Yam LY, Cheung TM, Wong PC, Lam B, Ip MS, Chan J, Yuen KY, Lai KN. *A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong.* N Engl J Med 2003; 348: 1977-85.

Vabret A, Mourez T, Dina J, van der Hoek L, Gouarin S, Petitjean J, Brouard J, Freymuth F. *Human coronavirus NL63, France.* Emerg Infect Dis 2005; 11: 1225-9.

Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. *A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease.* Nat Med. 2001; 7: 719-24.

Van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. *Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection.* Pediatr Infect Dis J 2004; 23: S25-32.

Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B. *Identification of a new human coronavirus.* Nat Med. 2004; 10: 368-73.

Van der Hoek L, Sure K, Ihorst G, Stang A, Pyrc K, Jebbink MK, Berkhout B, Überla K. *Croup Is Associated with the Novel Coronavirus NL63.* PLoS Med 2005; 2: e240.

Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Trallero E. *Human metapneumovirus and community-acquired respiratory illness in children.* Emerg Infect Dis. 2003; 5: 602-3.

Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Yarza EG, Pérez-Trallero E. *Human bocavirus, a respiratory and enteric virus.* Emerg Infect Dis 2007; 13: 636-7.

Villa L, Melón S, Suárez S, Alvarez-Argüelles ME, González D, Morilla A, Boga JA, Rodríguez J, de Oña M. *Detection of human bocavirus in Asturias, Northern Spain.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27: 237-9.

Weissbrich B, Neske F, Schubert J, Tollmann F, Blath K, Blessing K, Kreth HW. *Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections.* BMC Infect Dis 2006, 6: 109

WONCA. 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

World Health Organization. 20 July 2009, posting date. *Influenza-like illness in the United States and Mexico: global alert and response (GAR).* World Health Organization, Geneva, Switzerland. Disponible en:

http://www.who.int/csr/don/2009_04_24/en/index.html

Woo PC, Lau SK, Huang Y, Tsoi HW, Chan KH, Yuen KY. *Phylogenetic and recombination analysis of coronavirus HKU1, a novel coronavirus from patients with pneumonia.* Arch Virol. 2005; 150: 2299-311.

Yuan X, Jin Y, Xie Z, Gao H, Xu Z, Zheng L, Zhang R, Song J, Hou Y, Duan Z. *Prevalence of Human KI and WU Polyomaviruses in children with acute respiratory tract infection in China.* J Clin Microbiol 2008; 10: 3522-5.

Yun BY, Kim MR, Park JY, Choi EH, Lee HJ, Yun CK. *Viral etiology and epidemiology of acute lower respiratory tract infections in Korean children.* Pediatr Infect Dis J 1995;14: 1054-9.