

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA,
MICROBIOLOGÍA Y MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD
PÚBLICA, MEDICINA LEGAL Y FORENSE**



TESIS DOCTORAL

**DETECCIÓN DE GRIPE Y DE OTROS VIRUS
RESPIRATORIOS DURANTE UN PERIODO PANDÉMICO
Y POSTPANDÉMICO DE NUEVA VARIANTE DE GRIPE.**

SILVIA ROJO RELLO
VALLADOLID 2013



José María Eiros Bouza, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina de Valladolid

y

Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo, Profesor Titular de Microbiología de La Facultad de Medicina de Valladolid

CERTIFICAN:

Que han dirigido el trabajo titulado **“DETECCIÓN DE GRIPE Y DE OTROS VIRUS RESPIRATORIOS DURANTE UN PERIODO PANDÉMICO Y POSTPANDÉMICO DE NUEVA VARIANTE DE GRIPE**, realizado por Doña Silvia Rojo Rello y que, hayándose concluído, lo consideran apto para su pública defensa como tesis doctoral.

Para que conste donde convenga, firman en Valladolid a 5 de Junio de 2013

Dr. José María Eiros Bouza

Dr. Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo

A Ana



AGRADECIMIENTOS



En primer lugar, me gustaría empezar mencionando al Dr. José María Eiros Bouza, Catedrático de Microbiología por la Universidad de Valladolid, uno de los directores de esta tesis; y agradecerle profundamente el tesón, la paciencia, la ilusión y el ánimo que me ha transmitido y sigue transmitiéndome cada día en cada proyecto que intento realizar. Este momento no hubiera llegado sin él. A parte de su sabiduría, tiene un don para saber enseñar y dejando de lado el aspecto académico, lo que más le agradezco es su apoyo; gracias por ser un amigo.

Gracias al Dr. Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo, compañero, amigo y también director de esta tesis doctoral, por empujarme a iniciar este proyecto cuando tan sólo pensábamos en dar los resultados de los pacientes por la presión asistencial a la que estábamos sometidos; y por hacerme saber que motivar a una persona cuesta toda una vida y desmotivarla, tan sólo unos segundos.

A todo el Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid por acompañarme en el día a día... y es que, con tantas horas que pasamos en el laboratorio, nos convertimos todos en una gran familia. Gracias a Carmen García, Paz Sánchez, Rosa Arnáiz, Esperanza Pérez y Pepe de la Higuera por estar “al pie del cañón” de la Virología siempre y por hacer la rutina más fácil y llevadera. Gracias a Ana Isabel Prieto y Rosa Olivera por resolverme todos “esos” problemas informáticos que tanto me entorpecen y escucharme cuando lo necesitaba. Gracias a Ana Montoya por comprenderme, aguantarme y, sobre todo, por darme ese cariño haciéndome todo más fácil. Especial mención debo hacer al personal técnico que desempeñó en un inicio las técnicas moleculares de virus respiratorios, Olga Moreno, Patri Oliveros, Isa González y Mari Prieto, las “chicas de la Gripe” y la posterior incorporación de Jacqueline Paz e Irene Rodríguez. Juntas pasamos más tiempo que en casa. Muchas gracias al resto de facultativos del Servicio por la buena relación que nos



Agradecimientos

une y por todo lo que me han enseñado. A mis compañeros residentes coetáneos y actuales y al resto del personal técnico, administrativo y de enfermería y a Carmen la celadora. No me olvido de nadie. Gracias también a Maria, Elvira, Isabel y Maisa de Centro Nacional de Gripe por ese “feeling” que tenemos. Quisiera nombrar en este apartado a Alberto Pérez Rubio por su apoyo desde la distancia.

Por supuesto, no sería justo no dar las gracias a la Unidad de investigación en Infección e Inmunidad, llamada ahora Unidad de Investigación Biomédica; gracias, Jesús Bermejo por poner tanta ilusión en todo, a Raquel Almansa por su tranquilidad, a Lucía Rico y a Verónica Iglesias y también a David Varillas que se inició con ellos. A Ivan Sanz también le agradezco la compañía actual y en la última etapa.

Gracias a MariFe Muñoz, su ayuda con el programa estadístico ha sido crucial en este trabajo.

Gracias, una vez más a mi familia: a mis abuelos Juanita y Daniel que, como ya dijo mi hermano en su tesis, “fueron los incansables mecenas de mi vida”, gracias por hacerme saber que siempre estaban orgullosos de mi hiciera lo que hiciera, sé que les hubiera gustado ver este trabajo. A mis padres por el “soporte constante”, por tanto trabajo, incluso hasta altas horas de la noche, por ayudarnos a mí y a mi hermano, por intentar darnos un futuro mejor. Ahí siguen. Gracias a mi hermano Luis, él pone la alegría y la ilusión y sabe que es especial.

A mi marido Fernando, le agradezco todos sus detalles, sus gestos, su comprensión, su compañía, sus demostraciones de amor y, sobre todo, hacerme sentir la mujer más feliz y más afortunada del mundo. A mi hija Ana, porque el mirarla me da fuerzas para seguir adelante y sentir que todo merece la pena. Ellos dos hacen que mi vida tenga sentido. Muchas gracias a todos.



ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	9
1.- VIRUS DE LA GRIPE Y VIRUS GRIPAL A H1N1 2009 _____	11
A. Estructura y clasificación _____	11
B. Dotación antigénica y Variaciones _____	14
C. Ecología y Epidemiología _____	16
D. Diagnóstico Viroológico de la Gripe _____	22
E. Recuerdo histórico y pandemias precedentes _____	37
2.- OTRAS VIRIASIS RESPIRATORIAS _____	46
A. Introducción _____	46
B. Impacto clínico _____	46
C. Estrategias de diagnóstico virológico _____	50
2.1. RINOVIRUS _____	52
2.2. METAPNEUMOVIRUS _____	54
2.3. CORONAVIRUS _____	56
2.4. VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL _____	59
2.5. VIRUS PARAINFLUENZA _____	63
2.6. BOCAVIRUS _____	65
2.7. ADENOVIRUS _____	67
OBJETIVOS.....	71
MATERIAL Y MÉTODOS	75
1. Muestras procesadas _____	77
2. Técnicas utilizadas _____	89
3. Descripción de las técnicas _____	90
3.1 Xtag Respiratory Viral Panel Fast _____	90
3.2. Real Time-PCR Detection of Influenza A H1N1 Swine _____	103



Indice

3.3. RT PCR para Gripe A H1N1 2009 aprobada por CDC _____	112
3.4. Array Virus Influenza A (Clondiag®) _____	115
4. Análisis estadístico realizado _____	126
RESULTADOS..	127
I. Estudio descriptivo de la serie analizada _____	129
II. Resultados del diagnóstico de Gripe y Virus Respiratorios mediante técnicas de detección de Virus Respiratorios _____	139
1. Detección de Virus de la Gripe _____	146
2. Detección de otros Virus Respiratorios _____	154
3. Detección de coinfecciones _____	156
III. Estudio comparativo entre virus de la Gripe y otros virus Respiratorios _____	160
IV. Perfil de los cuadros en los que se ha documentado virus gripales atendidos en el Hospital Clínico de Valladolid _____	171
V. Resultados del Control de Calidad de la OMS _____	173
VI. Utilización de Oseltamivir en el tratamiento de la Gripe AH1N1pdm 2009 en pacientes del Hospital Clínico Universitario _____	179
DISCUSIÓN	181
CONCLUSIONES	203
BIBLIOGRAFÍA	209



INTRODUCCIÓN



1.- VIRUS DE LA GRIPE Y VIRUS GRIPAL A H1N1 2009

A. ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

Los virus de la gripe se descubrieron y aislaron por primera vez en 1930 en el cerdo y posteriormente en 1933 en el ser humano. Se incluyen en la familia *Orthomyxoviridae*, que en la actualidad agrupa cinco géneros. Todos ellos son virus con ARN monocatenario, de tamaño medio, simetría helicoidal y provistos de una membrana de envoltura. La denominación de “myxovirus” se relaciona con su afinidad por la mucina, mucoproteína existente en el moco de diversas secreciones, en algunos receptores epiteliales, en la membrana de los hematíes y en el suero.

Los virus gripales A y B (virus influenza A y B) constituyen los géneros más importantes. El virus gripal C constituye un tercer género, con escaso interés en patología humana, que difiere en determinadas características de los géneros anteriores. El cuarto género es de descripción más reciente, se ha denominado “Virus Togoto”, con un interés también reducido en el ámbito clínico. El quinto género está integrado por los “Isavirus”, de interés veterinario^{1,2}.

Se ha especulado que los virus gripales que primero franquearon la barrera de especie desde su reservorio animal al hombre fueron los C y los B, mientras que los del tipo A serían los últimos en haber accedido a la población humana. Este hecho puede ayudar a explicar en parte la mayor estabilidad evolutiva genética y antigénica del virus gripal B respecto al A y las notables diferencias biológicas y patogénicas del virus C respecto al resto³.

En la Tabla 1 se exponen las características más relevantes de los virus gripales A y B. Los viriones poseen una forma esférica o filamentosa y en su



interior albergan un nucleocápside que contiene ocho fragmentos de ARN monocatenario, una nucleoproteína y el complejo ARN-polimerasa (PB1, PB2 y PA). En el exterior de este nucleocápside y por debajo de la membrana de envoltura se sitúan la proteína matriz (M1), que confiere estabilidad a la partícula vírica y la proteína M2.

Tabla 1. Principales características de los virus gripales A y B

CARACTERÍSTICAS	DESCRIPCIÓN
Tipos	Dos. Definidos por la nucleoproteína: virus gripal A y virus gripal B
Subtipos	Diversos en el virus gripal A. definidos por las glucoproteínas de superficie
Acido nucleico	ARN monocatenario de polaridad negativa
Simetría	Helicoidal
Envoltura	Lipídica con proyecciones glucoproteicas
Forma del virión	Esférica o filamentosa
Diámetro del virión	80-120 nm
Genoma	8 segmentos de ARN
Proyecciones glucoproteicas	Hemaglutinina (H) y Neuraminidasa (N)

En la parte más externa se sitúa la membrana de envoltura, que procede de la membrana citoplasmática de la célula huésped y es de naturaleza lipídica. En ella asientan glucoproteínas de origen vírico, dispuesta a modo de proyecciones denominadas hemaglutinina y neuraminidasa.

El componente glucoproteico más importante es la hemaglutinina (H), que constituye en torno al 25% de las proteínas víricas. Cada virión presenta



alrededor de un millar de proyecciones, dispuesta a modo de espículas superficiales,

formadas cada una por un trímero de tres subunidades idénticas, que en conjunto poseen un peso molecular de 250 kD. Entre sus funciones biológicas cabe destacar que es responsable tanto de la fijación del virus a los receptores mucoproteicos de las células del epitelio respiratorio (que contienen ácido N-acetil-neuramínico) como de la fusión entre la envoltura vírica y la membrana celular⁴.

La neuraminidasa⁵ (N) representa alrededor del 5% de las proteínas totales del virión, el cual presenta del orden de 200 moléculas de la misma. Estas están constituidas por cuatro subunidades idénticas que forman un tetrámero de 240 kD. Su actividad funcional se caracteriza por ser una N-acetilneuraminilhidrolasa (sialidasa), provocando la liberación del ácido N-acetilneuramínico, constituyente de todas las mucinas. Por ello colabora con la H en los procesos de fusión y penetración celular así como en la liberación de nuevos viriones, difusión de los mismos y apoptosis celular. Sobre ella actúan los modernos inhibidores entre los que se encuentran Oseltamivir y Zanamivir^{6,7}.

Los virus gripales se clasifican por sus antígenos profundos, fundamentalmente la nucleoproteína, en dos tipos antigénicos, A y B. El tipo A se subdivide en subtipos por sus antígenos superficiales (H y N), y cada subtipo incluye un número ilimitado de variantes definidas por las características propias de los antígenos superficiales de una cepa determinada. La HA ejerce las funciones más importantes para su infectividad, proporcionando además la especificidad para receptores, las condiciones para su escisión proteolítica en HA1 y HA2, necesaria para la fusión de membranas, paso previo a la infección celular. Por ello es extremadamente importante identificar los cambios mínimos



de aminoácidos necesarios que permitan anticipar si un virus gripal aviar puede replicarse y transmitirse eficientemente en el hombre ^{8,9}.

B. DOTACIÓN ANTIGÉNICA Y VARIACIONES

Los virus gripales poseen, como se ha avanzado, dos clases de antígenos. En primer término en el centro del virión se encuentran los denominados antígenos “internos”, que son la nucleoproteína y la proteína M1, ambos específicos de tipo. En segundo lugar y situados externamente, están los antígenos “superficiales”, que son la Hemaglutinina y la Neuraminidasa, ambos específicos de subtipo. Los diferentes subtipos se denominan con la letra inicial H ó N seguida de un número arábigo convencional. En el virus gripal A se han descrito dieciseis subtipos de H y nueve de N, pero sólo una pequeña proporción se implican en la gripe humana⁸. Tal y como se representa en la Figura 1 en las aves se han descrito la totalidad de subtipos y en cerdos algunos de ellos.

La marcada capacidad de estos virus para sufrir variaciones en sus antígenos les otorga una especial trascendencia desde el punto de vista epidemiológico, fundamentalmente cuando éstas afectan a los antígenos superficiales. En este sentido se pueden establecer dos grandes grupos de variaciones: menores y mayores ^{10,11}.

Las variaciones menores o deslizamientos antigénicos (“antigenic drift”)^{12,13} que afectan sobre todo a la H y suponen la aparición de una nueva cepa o variante frente a la cual la población tiene sólo una inmunidad parcial por exposiciones anteriores a las cepas originarias. Con el cambio gradual de los antígenos superficiales surge una serie de nuevas variantes, cada una diferente de su predecesora y más alejada del subtipo inicial, pero conservándose éste.

Los casos de gripe que se presentan en las estaciones frías y primavera, en forma esporádica o en brotes epidémicos más o menos extensos, están producidos por las variantes menores.

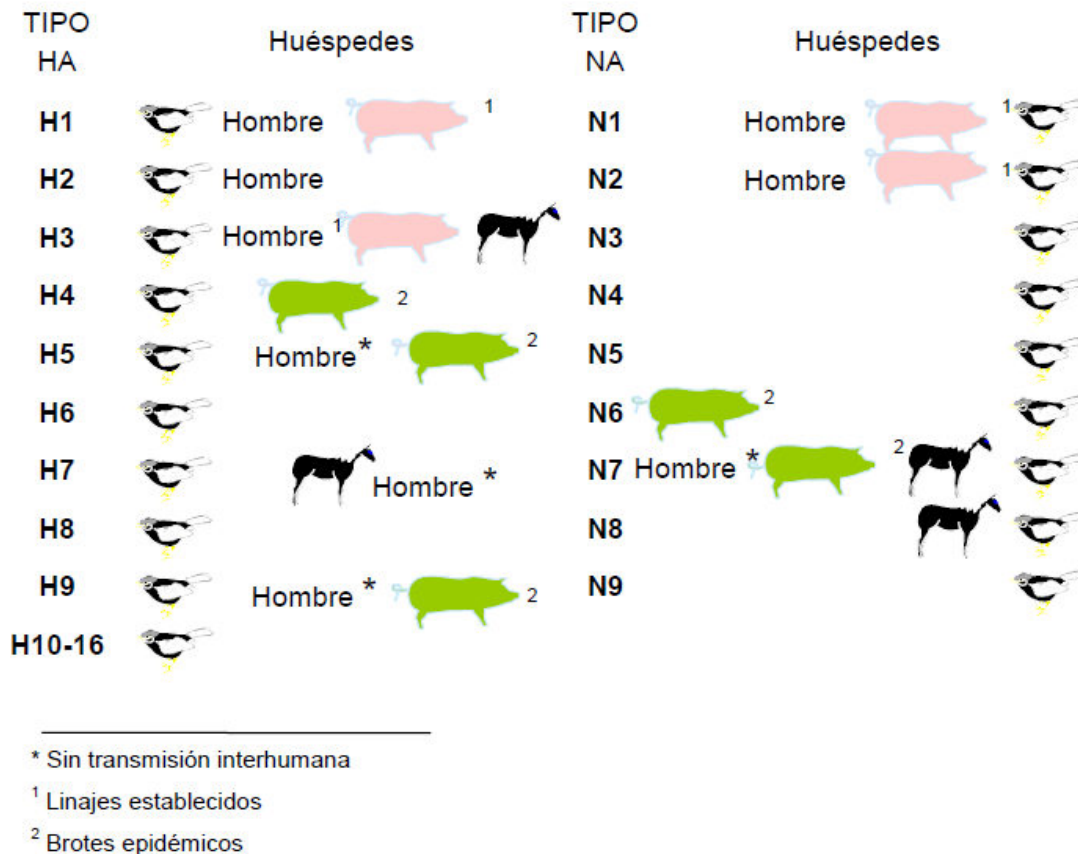


Figura 1. Distribución por especies de los tipos de Hemaglutina y Neuraminidasa

Las variantes mayores o sustituciones antigénicas (“antigenic shift”)^{12,14} implican el cambio total del antígeno H, del antígeno N o de ambos. Suponen la aparición de un subtipo diferente del difundido hasta entonces en la población, frente al cual ésta carece totalmente de experiencia inmunológica y, por consiguiente, de inmunidad. Las pandemias gripales ocurren generalmente como consecuencia de la aparición de un nuevo subtipo del virus gripal A por una variación mayor. La periodicidad con la que ocurren las pandemias es



desconocida¹⁵. Entre los mecanismos propuestos para su aparición; se cita el salto de barrera genética desde el reservorio aviar postulado como responsable de la llamada pandemia de “gripe española” de 1918 u otro animal, como en la actual situación del virus gripal A H1N1, de origen porcino, aislado por primera vez en México y EEUU en abril de 2009¹⁶.

C. ECOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

El hecho de franquear la barrera de especie desde ese reservorio no es un evento sencillo para los virus gripales. El salto de barrera de especie a la especie humana implica la propagación de persona a persona de manera eficaz y continua, lo cual precisa diversos cambios en el virus que le permitan adaptarse al nuevo huésped y continuar en él¹⁷⁻¹⁹.

La epidemiología moderna de los virus gripales asienta sobre tres pilares: el reservorio aviar de los virus gripales, la transmisión interespecie en animales y humanos, y por último; la variabilidad de los virus originada por los mecanismos de mutación y reordenamiento genético²⁰.

Para entender las claves de la ecología de los virus de la gripe se debe tener en cuenta la gama de hospedadores naturales para los virus gripales. El género *Influenzavirus A* que comprende todos los virus gripales A; sean subtipos o variantes menores humanas o animales, es el de huéspedes más numerosos. Los virus gripales A son capaces de infectar diferentes especies animales^{21,22}. El estudio de su ecología resulta fundamental para el conocimiento de la historia natural de la gripe A.

La denominación de los virus aislados se establece consignando las características que se citan en la Tabla 2.



Tabla 2. Características sobre las que se asienta la denominación de los virus gripales humanos

Características
Tipo antigénico: A o B
Origen geográfico
Número de la cepa en el laboratorio de origen
Año de aislamiento
Fórmula de sus antígenos superficiales: subtipo H y subtipo N*

*En el caso del virus B no existe este dato

Los virus gripales A se encuentran ampliamente difundidos en la naturaleza en diferentes especies animales. El estudio de su ecología resulta de interés para el conocimiento de la historia natural de la gripe A. Diversos mamíferos sufren epizootias relevantes, en particular los cerdos (origen del actual virus gripal A H1N1 con potencial pandémico), caballos y mamíferos marinos (focas, ballenas), y de forma esporádica cánidos, felinos, bóvidos y primates; también se han descrito casos en murciélagos, visones y renos, verosímilmente al entrar en el ciclo ecológico de las aves salvajes^{23,24}.

Las aves salvajes, y en particular los patos y otras especies migratorias afines, constituyen el reservorio central de la gripe A. Pero más que un reservorio en el sentido epidemiológico clásico representan un depósito natural de un amplio “pool” de genes; un reservorio genético en el que existen frecuentes ocasiones para la recombinación genética, la diseminación por vía fecal y la difusión de los virus por todo el mundo.

Las aves domésticas constituyen un reservorio secundario relacionado con el anterior. Entre los mamíferos, el ganado porcino ocupa un lugar destacado por la



posibilidad de persistencia de determinados subtipos y por constituir un probable eslabón para la infección humana.

La transmisión “interespecie” de los virus gripales A es un hecho comprobado, pero la especificidad de especie es importante. Son pocos los casos de infección humana aislada con un virus de origen animal bien documentado, que no progrese en la transmisión interhumana.

La fuente de infección, casi en exclusividad, para el ser humano es el hombre enfermo o portador de formas paucisintomáticas.

La transmisión ocurre fundamentalmente por mecanismo aéreo directo, como resulta obligado por la fragilidad del virus en el medio externo²⁵. Los fenómenos de agregación, más frecuentes en los meses fríos y en las instituciones cerradas, favorecen la difusión de los virus gripales, cuya transmisibilidad es una de las más importantes entre todas las infecciones humanas. Los fómites recientemente contaminados pueden ser vehículos de la infección.

Toda la población es susceptible de padecer gripe; la única limitación se debe a la existencia de inmunidad por contactos previos con virus idénticos o antigénicamente próximos o mediante prácticas de inmunización activa.

La gripe se presenta en forma de brotes epidémicos más o menos importantes, habitualmente todos los años y durante los meses fríos, como consecuencia de las variaciones menores de los virus A y B. Las epidemias progresan en la población a través de los grupos familiares y en las instituciones cerradas (tales como guarderías, colegios o residencias de ancianos) y pueden afectar a la mayoría de las personas.

La gripe A puede ocasionar pandemias como consecuencia de la aparición de variantes mayores frente a las que la población carece absolutamente de



inmunidad. Se presentan varias ondas epidémicas, que no ocurren necesariamente en los meses fríos, y afectan en pocos meses a todo el mundo.

Desde el punto de vista de la salud pública su importancia reside tanto en la elevada morbilidad que origina en las poblaciones, como en la mortalidad que puede ocasionar, tanto de forma directa como por agravamiento de otras enfermedades de base, sobre todo de naturaleza crónica cardiorrespiratoria en grupos denominados de riesgo^{26,27}.

De manera complementaria origina importantes costes sociales y sanitarios, derivados del absentismo laboral y escolar que provoca y merced a los gastos que ocasiona su asistencia.

Cabe apuntar en el ámbito de la epidemiología que el protagonismo que ha alcanzado el virus de la gripe A se remonta hasta donde conocemos hasta finales de 1997, fecha en la que tuvo lugar en Hong Kong (China) un brote de gripe aviar ocasionado por este agente. Además de los millones de aves afectadas se registraron al menos 18 casos en humanos, seis de ellos mortales. Con posterioridad se han documentado otros episodios por virus gripal A aviar del subtipo H9N2 en China; por H7N7 en Holanda en 2003 con un caso mortal y en 2004 en Canadá por H7N3, hechos que ilustran el vínculo existente entre virus gripales humanos y animales. Este riesgo se ha visto confirmado por el brote actual del subtipo A H5N1 en Asia con casi cinco centenares de casos, más de la mitad mortales; hasta el momento actual. La endemia asiática del subtipo H5N1, la existencia de infecciones silenciosas o asintomáticas en aves domésticas, la infección de otros mamíferos y la posible transmisión de persona a persona son acontecimientos epidémicos que justifican la preocupación expresada por los expertos y por la Organización Mundial de la Salud (OMS) por este subtipo aviar^{28,29}.



Desde abril de 2009 se ha señalado el protagonismo del virus de la gripe A H1N1, representado en la figura 2, de origen porcino aunque con algún componente aviar, que ha ocasionado varios miles de casos en humanos en los cinco continentes y que se transmite eficientemente entre personas.

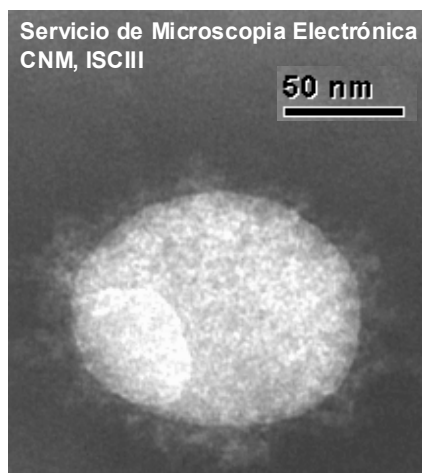


Figura 2. Microfotografía tomada mediante Microscopía Electrónica de un cultivo de virus pandémico (H1N1) 2009 a partir de una muestra respiratoria de un paciente positivo. Fuente: CNM, Instituto de Salud Carlos III

El origen del virus pandémico (H1N1) 2009 ha sido una de las principales líneas de investigación de los laboratorios de virología desde el comienzo de la pandemia. Los virus que han circulado en el cerdo se dividen en dos tipos: 1). Virus de la gripe clásica porcina, muy similares genética y antigénicamente al virus H1N1 de 1918 que circuló en el ser humano y 2). Virus porcino Eurasiático que circuló en cerdo desde 1979³⁰.

El virus pandémico A H1N1 2009 presenta segmentos genómicos de ambos tipos de virus de cerdo: la NA, que corresponde al subtipo N1, y el segmento que

codifica la proteína matriz pertenecen a virus del linaje porcino Eurasiático, mientras que la HA, que corresponde al subtipo H1, y otros segmentos internos, NP y NS, se incluyen en el linaje de la gripe porcina clásica. El complejo de la polimerasa presenta dos segmentos o subunidades, PB2 y PA, que proceden de virus porcinos que han sido el resultado de una triple reorganización y originariamente eran de origen aviar. Finalmente, la tercera subunidad de la polimerasa PB1 es codificada por un segmento viral porcino resultado de la triple reorganización cuyo origen eran virus humanos³¹. En la figura 3 se representa esquemáticamente el origen y procedencia de cada elemento viral.

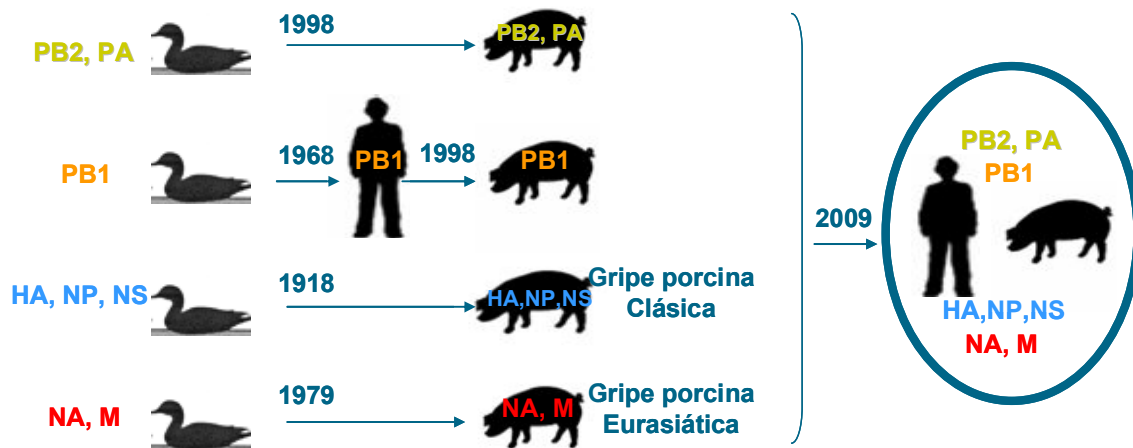


Figura 3. Origen y características de los diferentes segmentos genómicos del virus pandémico (H1N1) 2009. Fuente: Garten et al. 2009³¹.



D. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO DE LA GRIPE

Para el diagnóstico de la gripe resulta fundamental su documentación virológica, que representa una ayuda primordial en el manejo del paciente y en el control de los brotes epidémicos anuales³². Desde un punto de vista teórico este diagnóstico puede adoptar una doble estrategia. De una parte la que se fundamenta en métodos directos, como son los capaces de recuperar el virus mediante su aislamiento en cultivo celular y aquellos que permiten detectar la presencia del virus en las secreciones respiratorias del paciente (detección de antígenos y de ácidos nucleicos). De otra parte se sitúa la estrategia de diagnóstico indirecto que valora la inducción de una respuesta inmunitaria de tipo humoral a través de la detección de anticuerpos específicos en suero.

Tanto la detección de antígenos como de ácidos nucleicos permiten la realización de un diagnóstico de laboratorio rápido y ayudan a la toma de decisiones terapéuticas. Por el contrario, el aislamiento en cultivo celular es un diagnóstico lento y tardío en la historia natural de la infección gripal, pero de extraordinaria importancia en la caracterización de los virus de la gripe ya que permite realizar estudios epidemiológicos, antigénicos y filogenéticos con objeto de controlar y actualizar continuamente los datos de la circulación de estos virus, sobre los que se basan las recomendaciones anuales de composición de la vacuna de la gripe^{33,34}. En la actualidad, el interés de la serología reside principalmente en la realización de estudios poblacionales de cobertura vacunal.

La condición fundamental a la hora de valorar las muestras obtenidas a partir del tracto respiratorio es que éstas deben contener el mayor número posible de células epiteliales, que son en las que fundamentalmente se replica el virus. En este sentido resultan apropiadas para la investigación de virus gripales las muestras respiratorias tales como los frotis de faringe o nasofaríngeos y los



lavados o aspirados nasales o bronquiales³⁵. Estas muestras deben ser tomadas durante los primeros días de la enfermedad. De manera concomitante se puede intentar documentar la presencia de virus gripales en un amplio abanico de muestras clínicas, tanto del tracto respiratorio: frotis faríngeo y nasofaríngeo, lavado nasofaríngeo (lactantes/niños), lavado broncoalveolar, aspirado transtraqueal, traqueobronquial, biopsia/necropsia pulmonar; como en otras muestras: exudado ótico, líquido pleural/pericárdico, heces, exudado conjuntival.

La realización del transporte de las muestras debe realizarse a 4°C (o en su defecto congeladas a -70°C-80°C) con objeto de asegurar la infectividad de las partículas víricas. La recuperación de los virus gripales a partir de la muestra se favorece utilizando un medio de transporte adecuado, que consiste en una solución salina a pH neutro con estabilizadores de proteínas, como el suero de albúmina bovina, y antibióticos para reducir el crecimiento de bacterias que integran la microbiota acompañante.

- Aislamiento mediante cultivo

Desde el punto de vista genérico los virus de la gripe son capaces de replicarse en diferentes líneas celulares primarias, diploides o continuas, aunque la susceptibilidad a la infección es baja en la mayoría de ellas. La línea celular más comúnmente utilizada son las células Madin Darby de Riñón de Perro (MDCK). Las líneas celulares inoculadas con las muestras respiratorias de los pacientes se incuban a 33-35°C en presencia de tripsina para asegurar la activación proteolítica de los virus. La caracterización del virus aislado se efectúa por inmunofluorescencia mediante la utilización de anticuerpos monoclonales.

Entre las limitaciones del aislamiento de los virus de la gripe cabe apuntar el tiempo que se requiere para su crecimiento e identificación en cultivo celular (4-7



días) aunque existen varios métodos capaces de detectar la presencia de los virus de la gripe de modo más precoz.

- Detección de antígenos víricos

Los métodos basados en la detección de los antígenos víricos presentan como matiz adicional su independencia de la infectividad del virus, aunque la calidad de la muestra sí es muy importante, ya que debe estar en condiciones óptimas después de la recogida y el transporte hasta el laboratorio. Entre sus ventajas destaca el hecho de que permite una rápida obtención de resultados, generalmente en unas pocas horas después de la recepción de la muestra. Como limitación destacable cabe apuntar que los resultados a menudo son difíciles de interpretar, la especificidad dependerá de la experiencia del personal que los realice y la sensibilidad suele ser baja. Los métodos de inmunofluorescencia y EIA (enzimo-inmuno análisis) se emplean habitualmente para la detección de los antígenos virales directamente en la muestra clínica o bien en las células del cultivo en las que previamente se ha inoculado la muestra³⁶.

En principio los antígenos virales utilizados generalmente para el diagnóstico son las moléculas que se sitúan en la superficie del virus, la hemaglutinina y la neuraminidasa, y que también pueden encontrarse frecuentemente en la superficie de las células infectadas³⁷. No obstante, puesto que estas moléculas están sometidas a una continua variación evolutiva, también es posible emplear otras proteínas menos accesibles del virus, como la nucleoproteína, y por ello menos variables. Un aspecto adicional es que con objeto de realizar vigilancia y estudios epidemiológicos, es importante realizar el subtipado de los virus de la gripe A. La diferenciación del virus de la gripe A del tipo B es tan importante como la diferenciación de los subtipos H1 y H3 dentro de los virus de la gripe A. Por ello, también se comercializan actualmente anticuerpos monoclonales que permiten distinguir específicamente el subtipo H1 del H3.



Se han comercializado también técnicas de inmunocromatografía capilar y de enzimoanálisis de membrana que posibilitan detectar la presencia de virus gripales o sus antígenos en pocos minutos y de lectura visual sin la necesidad de instrumental. Estos ensayos ofrecen resultados rápidos y pueden ayudar al clínico en el tratamiento individual de los pacientes. No obstante, su utilidad se ve limitada debido a su elevado coste y baja sensibilidad y especificidad. Por su amplia implantación en la asistencia urgente y en el ámbito pediátrico se recoge en la Tabla 3 diferentes pruebas de detección rápida disponibles en el momento actual aludiendo a sus características operacionales intrínsecas³⁸. Cabe apuntar que en el caso de la nueva variante pandémica del virus de la Gripe A H1N1 2009 la sensibilidad de estas pruebas oscila entre el 29 y el 65%, si bien la especificidad es aceptable. Un resultado negativo no excluye la obligación de emplear otras técnicas de diagnóstico³⁵.



Tabla 3. Distintas pruebas de detección rápida de antígenos disponibles para virus gripales.

Denominación	Compañía	Virus	Muestras	Sensibilidad	Especificidad
Directigen Flu A®	Becton-Dickinson	A	Aspirado y lavado nasal, torunda nasofaríngea	67-96%	88-100%
Directigen Flu A+B®	Becton-Dickinson	A y B	Aspirado y lavado nasal, torunda nasofaríngea	A: 96% B: 88%	A: 99,6% B: 96,8%
FLU OIA®	Biostar	A y B	Aspirado nasal, esputo torunda nasofaríngea	62-88%	52-80%
FLU OIA A/B®	Biostar	A y B	Aspirado nasal, esputo torunda nasofaríngea	80-95%	60-70%
XPECT FLU A&B®	Remel	A y B	Lavado nasal, torunda Nasofaríngea	A:89-100% B:93-100%	A: 100% B: 100%



NOW Influenza A&B®	Binax	A y B	Lavado nasal, torunda Nasofaríngea	A: 100% B:92-100%	A: 92-93% B: 94-99%
QuickVue Influenza Test®	Quidel	A y B	Aspirado y lavado nasal, torunda nasofaríngea	73-81%	96-99%
QuickVue Influenza A+B® Test	Quidel	A y B	Aspirado y lavado nasal, torunda nasofaríngea	A: 72-77% B: 73-82%	A: 96-99% B: 96-99%
SAS FluAlert®	SA Scientific	A y B	Aspirado y lavado Nasofaríngeo	65-84%	95-99%
ZstatFlu®	Zyme Tx	A y B	Torunda nasofaríngea	65-96%	77-98%
Clearview Exact Influenza A&B®	Inverness	A y B	Lavado nasal, torunda nasofaríngea	A: 81,7% B: 88,6 %	A: 98,5% B: 97,4%

- Detección de Acidos Nucleicos

Las técnicas moleculares de diagnóstico que permiten la detección de ácidos nucleicos están basadas en la búsqueda y el reconocimiento del genoma vírico en la muestra clínica o en el cultivo viral. El empleo de estos métodos se está incrementando rápidamente, habiendo transformado el diagnóstico de otras entidades infecciosas de etiología vírica³⁹. Si bien el papel de estos métodos en la rutina diagnóstica de la infección respiratoria y en la detección y caracterización de



virus gripales en particular, es aún limitado y de reciente incorporación. En la Tabla 4 están resumidos algunos de los métodos moleculares que pueden ser utilizados en la detección y/o caracterización de virus gripales.

- Técnicas de amplificación genómica basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tanto en su vertiente clásica o PCR a tiempo final como la PCR a tiempo real. En ambas la reacción de amplificación tiene que ir precedida de una transcripción reversa para transformar en ADN cualquiera de los 8 segmentos de ARN que contiene el genoma de los virus de la gripe A y B o de los 7 segmentos del genoma del virus de la gripe C⁴⁰.

Habitualmente estas técnicas de PCR se encuentran diseñadas en genes muy conservados como los que codifican para la proteína matriz (M), la nucleoproteína (NP) o el segmento génico NS, que nos van a permitir diferenciar entre los tres géneros: Influenzavirus A, B o C. Otros genes diana considerados de interés en el conocimiento de la infección por virus gripales, y en concreto en la detección de Influenzavirus A, son la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), los cuales nos van a permitir conocer el subtipo del virus gripal.

Los subtipos más importantes desde el punto de vista clínico-epidemiológico son H3N2 y H1N1, por ser los virus de carácter epidémico que circulan en el ser humano durante las temporadas de gripe. Desde 1997, año en que se produjo el salto interespecífico del virus del subtipo H5N1 con elevada mortalidad⁴¹, y más recientemente desde abril de 2009 con la aparición del virus de la gripe A H1N1 2009 su detección supone un gran interés, por tratarse de un virus pandémico con repercusión a nivel mundial⁴².

Uno de los principales inconvenientes de la PCR convencional o a tiempo final es que se trata de un método cualitativo, que muchas veces requiere la aplicación



de una PCR secuencial (PCR anidada o nested-PCR) para obtener una sensibilidad similar a la que se alcanza utilizando una PCR a tiempo real, lo que comporta mas carga de trabajo, un incremento del tiempo necesario hasta la obtención de los resultados y un mayor riesgo de contaminaciones.

La utilización de métodos de PCR a tiempo real permiten la cuantificación, además de reducir el riesgo de contaminaciones y el tiempo requerido en la emisión de los resultados, eliminando la necesidad de un análisis posterior de los amplicones obtenidos. Si a esto se añade la posible utilización de una PCR múltiple que además de detectar los tres géneros de virus gripales con interés humano permitan el subtipado de los virus gripales A y/o la detección simultánea de otros patógenos implicados en la infección respiratoria, el valor de esta metodología se ve incrementado notablemente^{43,44}.

En aras a garantizar la necesidad de efectuar un diagnóstico rápido están disponibles diversos ensayos comerciales de PCR a tiempo real; algunos permiten sólo detectar *Influenzavirus* A y B, mientras que otros posibilitan diagnosticar la infección por subtipos específicos como el aludido H5N1 y el A H1N1 2009 (Tabla 5). La FDA ha aprobado un ensayo de PCR a tiempo real para la identificación del sublinaje asiático de virus gripales A del subtipo H5 desarrollado en los CDC y desde la pasada primavera se alientan los correspondientes a la nueva variante del subtipo H1N1⁴⁵. La OMS también ha publicado procedimientos para la detección de estos dos subtipos en humanos utilizando RT-PCR convencional y PCR a tiempo real.



- Técnicas de hibridación

Se trata de técnicas que permiten el procesamiento de una elevada cantidad de muestras por cada ensayo y entre ellas cabe destacar las basadas en PCR acoplada a enzimoimmunoanálisis (PCR-EIA) y los *microarrays* o biochips que posibilitan el análisis simultáneo de varios genes pertenecientes a un mismo organismo⁴⁶.

La modalidad de PCR-EIA consiste en una amplificación cuyos productos se detectan mediante sondas en solución marcadas. La unión de la sonda se detecta mediante un enzimoimmunoanálisis cuyo anticuerpo es reactivo frente al marcador. En la actualidad existe una técnica comercial basada en la PCR-EIA: Hexaplex® (Prodesse, Inc., Milwaukee, Wis.) capaz de diferenciar gripe A y B además de detectar virus parainfluenza 1, 2, 3 y virus respiratorio sincitial⁴⁷.

Los *microarrays* o biochips son técnicas para el tipado y subtipado de virus gripales que utilizan la hibridación con sondas, en este caso inmovilizadas en una superficie, y que se incuban con el material genético a analizar marcado⁴⁸. Destaca el Mchip que es un *microarray* de baja densidad (15 oligonucleótidos marcados) dirigidos frente al gen que codifica para la proteína M de los virus gripales A, que al coevolucionar con los antígenos de superficie (HA y NA) permite obtener información sobre el subtipo y el FluChip compuesto por 55 sondas capaces de detectar virus gripales B y diferenciar todos los subtipos de *Influenzavirus A*⁴⁹. Cabe citar que también están disponibles métodos comerciales para la aplicación exclusiva en el tipado y subtipado de virus gripales.

- Caracterización genética de los virus gripales.

La dotación genómica fragmentada de los virus gripales está compuesta de ARN monocatenario de polaridad negativa. La replicación y transcripción de estos



segmentos a cargo de la ARN polimerasa ocasiona errores por carecer de actividad reparadora, originando mutaciones que se conocen como variaciones menores, deriva genética o drift. La frecuencia con la que ocurren espontáneamente estas mutaciones es más elevada para las proteínas de superficie, hemaglutinina y neuraminidasa, que son los principales determinantes antigénicos, siendo las tasas de mutación menores para el resto de segmentos génicos.

Otra particularidad genética que presentan los virus gripales A es su capacidad de recombinación que puede tener lugar entre los segmentos génicos de virus de distintos orígenes (mamíferos, aves) ⁵⁰. Si en este reordenamiento están implicados los segmentos que codifican para las glucoproteínas de superficie, puede originarse un nuevo subtipo de virus que nunca haya circulado entre la población humana, dando lugar a un virus con potencial pandémico tal y como ya ha ocurrido⁴². Estos fenómenos de cambio e intercambio genético son los que determinan la alta variabilidad de los virus gripales y la importancia y necesidad de realizar una caracterización genética en el contexto de la vigilancia de la infección gripal.

La amplificación de los ácidos nucleicos por PCR puede llevarse a cabo directamente en las muestras respiratorias proporcionando un método diagnóstico que puede acoplarse a técnicas de tipado rápido y caracterización, como la determinación del polimorfismo del virus en función de los fragmentos obtenidos tras la digestión del mismo con enzimas de restricción (RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*) y especialmente, la secuenciación de fragmentos de los genes.

En los últimos años la caracterización genética de los virus gripales ha experimentado un gran avance gracias al desarrollo de técnicas rápidas de PCR y



Introducción

a la introducción de secuenciadores automáticos que permiten la caracterización genética de los linajes de virus circulantes, mejorando el seguimiento de la evolución de los virus de la gripe y la calidad de los datos de vigilancia de la circulación de los mismos⁵¹. Esta se centra en el estudio de los virus gripales A y B debido a que la gripe C apenas sufren cambios genéticos, en general carecen de estacionalidad y habitualmente producen casos esporádicos⁵².



Tabla 4. Diversas características de los métodos moleculares disponibles para la detección de virus gripales.

Método	Ventajas	Desventajas
PCR simple	Sensible y específico. Permite análisis posteriores del producto amplificado	Una diana por ensayo
PCR múltiple	Sensible y específico. Permite detectar más de una diana por ensayo. Permite análisis posteriores	Los métodos no comerciales requieren una optimización exhaustiva para asegurar la ausencia de falsos negativos y la competición entre iniciadores
PCR-EIA	Sensible y específico. Elevado rendimiento. Puede ser múltiple	No permite el análisis posterior de los productos. Requiere evaluación y validación minuciosa antes de la rutinización
PCR a tiempo real	Sensible y específico. Rápido. Permite cuantificar. Puede ser múltiple	Requiere equipamiento específico. No siempre es posible el análisis del producto. La capacidad de analizar varios genes o patógenos en formato múltiple está limitada por las características del termociclador
NASBA	Sensible y específico. Permite cuantificar	Utiliza tres enzimas. Procedimiento largo y costoso. No siempre es posible el análisis del producto
<i>Microarrays</i>	Sensible y específico Detección de muchas dianas en un solo ensayo	Requiere equipamiento específico y amplio desarrollo No permite el análisis posterior de los productos

Tabla 5. Diferentes métodos comerciales para la detección de virus gripales mediante amplificación genómica a tiempo real

Ensayo	Proveedor	Termociclador	Dianas	Características
Artus® Influenza RT-PCR Kit	Qiagen, Bonsai	Lightcycler®	<i>Influenzavirus</i> A+B	Detecta ambos pero no permite diferenciar entre virus gripales A y B
Artus® Influenza/H1 RG/LC RT-PCR Kit	Qiagen, Bonsai	Lightcycler®	<i>Influenzavirus</i> A+B y H1N1 nv	Detecta ambos y permite diferenciar entre virus gripales A y B así como subtipar
LightMix for Influenza A H1N1 virus detection (TIB Molbiol)	Roche	Lightcycler®	<i>Influenzavirus</i> A H5N1	Debemos transformar el ARN viral en ADNc en un ensayo independiente.
LightMix® for the detection of Avian Influenza A Virus (Subtype Asia) H5 (TIB Molbiol)	Roche	Lightcycler®	H5	Debemos transformar el ARN viral en ADNc en un ensayo independiente
Flu A/B Analyte Specific Reagent (Cepheid)	IZASA	SmartCycler®	<i>Influenzavirus</i> A y B	Diferencia entre ambos tipos de virus
TaqMan® Influenza A/H1N1 Detection Kit	Applied Biosystems	ABI PRISM®	<i>Influenzavirus</i> A	Detección de <i>Influenzavirus</i> A y H1N1 subtipados pero en ensayos separados



- Detección de la Respuesta Inmunitaria Humoral Específica

La documentación indirecta de la infección por los virus de la gripe se realiza mediante ensayos serológicos, en los cuáles se detecta la presencia de anticuerpos frente al antígeno hemaglutinina del virus gripal en el suero de un paciente. Esta aproximación al diagnóstico de la gripe, raramente se utiliza en la práctica clínica habitual, aunque puede ser una herramienta básica en la vigilancia epidemiológica de la circulación de los virus gripales⁵³. No obstante, un análisis retrospectivo puede establecer un diagnóstico clínico en ausencia de aislamiento de virus a partir de la muestra o de detección de sus antígenos o ácidos nucleicos.

Entre las limitaciones para efectuar un diagnóstico serológico eficiente se cita la necesidad de evaluar muestras de sueros en pares. Esto se requiere debido a que la infección por los virus de la gripe es frecuentemente una reinfección. Así, debe constatar un incremento significativo del título de anticuerpos entre dos muestras consecutivas separadas entre dos y cuatro semanas⁵⁴. Los ensayos más frecuentemente utilizados son la reacción de fijación del complemento, la inhibición de la hemaglutinación y la neutralización. No obstante, los dos últimos constituyen la base del análisis de la respuesta serológica frente a la infección gripal y permiten determinar la concentración de anticuerpos frente a los antígenos específicos de subtipo y de variante.

La reacción de fijación del complemento se utiliza para la determinación de anticuerpos frente a la nucleoproteína de los virus de la gripe, que es altamente conservada, a diferencia de la hemaglutinina, se emplea básicamente para diferenciar en el suero de pacientes la presencia de anticuerpos dirigidos frente a los virus de la gripe tipos A y B. Estos ensayos tienen un valor importante en el caso de la circulación de nuevas variantes antigénicas, frente a las cuáles no haya disponibilidad de anticuerpos monoclonales frente a la hemaglutinina, altamente variable en función de la deriva genética de los virus gripales. También tiene utilidad en el caso de transmisión de los subtipos del virus de la gripe A entre distintas especies⁵⁵. No obstante, el aumento en el título de



la fijación del complemento después de una infección gripal es lento y el ensayo por sí solo tiene una sensibilidad relativamente baja. Por otro lado, este ensayo solamente mide las clases de anticuerpos que están implicadas en la fijación del complemento.

La inhibición de la hemaglutinación se emplea habitualmente para el diagnóstico y tipado de los virus de la gripe A y B y para el subtipado de los virus de la gripe A (H1 y H3). El título de anticuerpos presentes en una muestra de suero, calculado mediante esta técnica, se relaciona de manera fidedigna con la protección o susceptibilidad del paciente frente a la infección gripal⁵⁶. Por ello se utiliza ampliamente para medir la respuesta del paciente a la administración de la vacuna de la gripe. Sin embargo, la realización e interpretación de esta técnica es compleja y, frecuentemente, subjetiva, por lo que precisa para su realización de personal cualificado. Es por ello muy habitual que esta técnica carezca de reproducibilidad cuando es realizada por distintos laboratorios. Por otro lado, aunque su ventaja más evidente es su elevada especificidad, se contrarresta por la baja sensibilidad.

El fundamento básico del ensayo de neutralización del suero es la inhibición de la replicación viral mediante anticuerpos específicos. Los títulos de anticuerpos neutralizantes presentes en el suero del paciente, obtenidos mediante esta técnica, se correlacionan perfectamente con los obtenidos en los ensayos de inhibición de hemaglutinación. El mayor inconveniente que presenta esta técnica es que los anticuerpos monoclonales utilizados tienen que ser validados a menudo con objeto de comprobar que son capaces de reaccionar frente a las nuevas variantes de virus de la gripe.



E. RECUERDO HISTÓRICO Y PANDEMIAS PRECEDENTES

Antes de la aparición del SIDA, la gripe se calificó como la última gran peste de la humanidad⁵⁷. A este calificativo contribuyeron, sobre todo, los devastadores efectos de la pandemia de 1918, punto de referencia obligado en toda reflexión sobre esta enfermedad.

Hasta los primeros aislamientos del virus gripal, logrados a partir de 1930, es imposible reconstruir la historia de la gripe con precisión. Sin embargo son abundantes las descripciones clínicas y epidemiológicas que permiten identificar la enfermedad mucho antes del siglo XX.

La gripe es sin duda una infección humana muy antigua. El término influenza es la forma italiana del latín influenza, y se utilizó en el siglo XV para designar epidemias atribuidas a influencias de las estrellas y planetas o de poderes ocultos. Los autores ingleses aceptaron el término italiano (influenza) en el siglo XVIII. En esta época, los autores franceses prefirieron el nombre en castellano, con clara referencia al componente catarral de la enfermedad.

Probablemente, la primera epidemia que puede atribuirse al virus gripal de forma inequívoca es la que ocurrió en Europa durante los años 1173 y 1174. Previamente existen numerosas referencias sugestivas, incluso en escritos de Hipócrates relativos a una epidemia en el año 412 a. de JC. Pero no puede excluirse la confusión con otros procesos febriles.

Existen claras descripciones que permiten suponer que en Europa se produjeron por lo menos 38 epidemias importantes entre los siglos XII y XVIII; una en el XII, ninguna en el XIII, tres en el XIV, cuatro en el XV, siete en el XVI ocho en el XVII y quince en el siglo XVIII.

Es evidente que estas cifras están influidas por la progresiva mejora de los datos disponibles.



En el siglo XIX, los datos clínicos y epidemiológicos son ya muy completos y aseguran que la gripe mostró una importante actividad epidémica en 16 ocasiones entre 1800 y 1875. En 1889 ocurrió una gran pandemia que afectó a todo el mundo y que merece un comentario diferenciado, tanto por su importancia como por haber podido ser estudiada retrospectivamente a la luz de los conocimientos científicos sobre el virus gripal.

La infección gripal deja una huella duradera de su estimulación del sistema inmunitario, y el estudio de la presencia de anticuerpos frente a los antígenos superficiales del virus en individuos de diferentes edades permite reconocer los caracteres de los virus que los infectaron en el pasado.

A partir de 1957 se profundizó en el estudio de los sueros obtenidos de personas nacidas desde 1880. Los resultados, contrastados con los informes históricos, han desarrollado una nueva rama de la seroepidemiología, denominada seroarqueología, gracias a la cual se conoce con razonable seguridad la constitución antigénica de los virus gripales difundidos en la población humana entre 1889 y 1933⁵⁸, fecha de aislamiento del primer virus gripal humano.

Pandemia de 1889-1891. En la primavera de 1889 se inició una gran pandemia gripal detectada en Siberia, que en los meses siguientes afectó a toda Rusia. Entre noviembre de 1889 y enero de 1890 la epidemia difundió a Europa, América y el resto del mundo, sin que prácticamente ningún país quedara indemne. Como ocurre en todos los casos de gripe pandémica, se presentaron varias ondas en los años sucesivos, cuya situación cronológica varió de unos países a otros. En conjunto, la pandemia de 1889-1891 destacó más por su enorme difusión y elevada morbilidad que por su letalidad, aunque ésta no fue desdeñable entre las personas de mayor edad.

A la luz de las investigaciones seroepidemiológicas, es razonable pensar que la pandemia de 1889 estuvo originada por la aparición de una nueva



variante de virus gripal A, que presentó por primera vez en los tiempos abordables científicamente la hemaglutinina H2. Desde 1893 a 1898 la actividad gripal en la población humana fue reducida, con escasa repercusión sobre la mortalidad, y probablemente estuvo ocasionada por la misma variante antigénica responsable de la epidemia de 1889. Sin tenerse noticia de una presentación pandémica, durante los años 1899 y 1900 aumentaron considerablemente los casos de gripe en Europa y América, con un nuevo e importante aumento de la mortalidad por esta rúbrica y repercusión en las tasas de mortalidad general. Los estudios serológicos sugieren claramente que el virus responsable difería del causante de la epidemia de 1889 en la hemaglutinina y probablemente también en su neuraminidasa. Su fórmula antigénica debió corresponder al subtipo H3N8. Entre 1900 y 1917 la mortalidad por gripe fue escasa e intermitente, sin episodios destacables.

Pandemia de 1918-1919. En 1918 y 1919 la población mundial experimentó el más grave conflicto epidémico de que se tiene constancia histórica. Esta afirmación se fundamenta en la extensión geográfica de esta gripe pandémica, que abarcó prácticamente a todos los países del globo, en su morbilidad, puesto que enfermó más del 50% de la población mundial, y en su elevada tasa de mortalidad, que en promedio fue del 3%, con más de 20 millones de defunciones.

El origen de la pandemia sigue siendo incierto. Sin embargo, en la época fue conocida, y aún se la conoce así, como gripe española a pesar de que la mayoría de los informes señalan los primeros casos en otras localizaciones. El tema suscitó una apasionada polémica en la bibliografía médica de entonces que aún prosigue. Según Kaplan y Webster⁵⁹, “España obtuvo esta dudosa distinción como consecuencia de la práctica de la censura impuesta por las tropas aliadas y alemanas, y el escaso deseo de las autoridades de reconocer una incapacidad tan amplia entre sus tropas”. Según algunos autores, la epidemia en China precedió a la europea y se desarrolló independientemente, sugiriéndose la hipótesis de que la enfermedad llegara a Francia con la



importación de 200.000 trabajadores chinos para trabajar en la retaguardia de los ejércitos aliados. Esta teoría es congruente con la suposición de que diversas cepas pandémicas se han originado en China. Otra hipótesis sitúa el origen de la pandemia en Estados Unidos. Los registros del ejército norteamericano sitúan exactamente los primeros casos de gripe entre las tropas acampadas en Fort Riley en Kansas en marzo de 1918⁶⁰. Sin embargo, no se ha podido demostrar que desde allí difundiera al resto del mundo.

La pandemia se desarrolló en tres oleadas. La primera se produjo en la primavera de 1918 y fue comparativamente benigna, sin que se le prestara especial atención. La segunda onda comenzó en otoño; fue auténticamente “asesina”, con una morbilidad elevadísima y una mortalidad que en algunas zonas llegó al 10% de los afectados; alcanzó su máximo en octubre y finalizó en diciembre. La tercera onda, más inconstante según las áreas, se produjo entre febrero y mayo de 1919.

Una característica singular y no explicada de la pandemia de 1918, fue la especialmente alta letalidad en el grupo de edad de 20 a 40 años, en el que se concentraron casi la mitad de las defunciones.

Aunque en todo el mundo la epidemia revistió caracteres dramáticos, algunos datos resultan especialmente significativos. En Estados Unidos⁵⁹ el número de defunciones fue superior a 500.000; la gripe ocasionó 43.000 muertos entre sus tropas, el 80% del número total de norteamericanos muertos en la Gran Guerra; algunas zonas de Alaska vieron reducida su población a la mitad. En los países menos desarrollados, donde la obtención de datos fiables es más difícil, las consecuencias pudieron ser aún más catastróficas; así, según algunos autores, en la península Indostánica el número de muertos pudo ser de 20 millones, similar al considerado como balance a nivel mundial.

En España la epidemia cursó también en tres ondas, siendo especialmente grave la segunda en los meses de septiembre, octubre y noviembre de 1918. Se caracterizó por su elevada morbilidad y mortalidad, especialmente en los



sectores jóvenes de la población, y por la presencia de neumonías y bronconeumonías fulminantes, con sobreinfección frecuente por *Haemophilus influenzae*. Oficialmente el número de defunciones en España alcanzó la cifra de 140.000.

Las investigaciones tendentes a dilucidar las características del virus causal de la pandemia de 1918-19 y las razones de su gran virulencia han sido innumerables. El estudio antigénico y genético de las cepas de virus humanos y animales aisladas desde 1930 y el estudio de los sueros de personas nacidas antes de 1918 permiten afirmar que el virus de aquella pandemia presentó un gran salto antigénico con una H y una N no existentes en las cepas que difundieron en los 30 años anteriores. Su composición antigénica debió de ser muy similar a la de un virus Hsw1N1 responsable de la gripe porcina⁶⁰. La presentación de epidemias porcinas más o menos simultáneamente en diversas zonas geográficas confirma esta suposición. Los motivos de la gran agresividad del virus de 1918 siguen sin conocerse. No es razón suficiente la inexistencia en aquella época de antibióticos para combatir las sobreinfecciones bacterianas. En la década de los cincuenta se practicó la exhumación de los cuerpos de fallecidos durante la pandemia enterrados en el helado suelo de Alaska intentando el aislamiento del virus causal con resultado negativo⁶⁰. Las investigaciones sobre las características del virus gripal de 1918 se vieron, al fin, coronadas por el éxito en 1997. Investigadores del Armed Forces Institute of Pathology en Washington⁶¹ estudiaron por ampliación genómica (reacción en cadena de la polimerasa-retrotranscriptasa, RT-PCR) muestras fijadas en formol y conservadas en aquel centro de tejidos pulmonares de soldados fallecidos durante la pandemia; en una muestra con manifestaciones histopatológicas de neumonía vírica de uno de los soldados identificaron hasta 9 secuencias de 5 segmentos del virus gripal A causal (H, N, NP, M1 y M2). Los genes identificados corresponden, como se sospechaba, a un nuevo virus H1N1 de origen porcino.



Pandemia de 1947. Prevalencia de subtipo H1N1. El virus A aislado en 1933 circuló entre la población humana produciendo brotes epidémicos de moderada importancia hasta 1947. Dicho virus, de constitución H1N1, estaba relacionado antigénicamente con el virus precedente y, en la nomenclatura hoy abandonada, se le denominó subtipo A0.

En 1946 se aisló en Australia una cepa de virus A con un acusado deslizamiento antigénico en su hemaglutinina. Una cepa similar ocasionó en 1947 una extensa epidemia que afectó a Europa en 1948. En los años siguientes se alternaron periodos de escasa actividad gripal con epidemias de moderada morbilidad y mortalidad que afectaron extensas partes del mundo, especialmente en los años 1950, 1952-1953 y 1955-1956. Los estudios virológicos permitieron comprobar que todos los virus causales estaban relacionados antigénicamente y se los denominó subtipo A1; las cepas aisladas en los sucesivos brotes presentaban variaciones menores, confirmándose el concepto de deslizamiento antigénico.

Pandemia de gripe asiática de 1957. Prevalencia del subtipo H2N2. En 1957 apareció bruscamente un nuevo virus gripal dotado de una amplia capacidad de difusión que produjo cuadros gripales que, por el inequívoco origen de la pandemia, se denominaron popular y genéricamente gripe asiática. El virus no parecía tener relación antigénica alguna con los virus precedentes, por lo que se lo bautizó como subtipo A2. Hoy se lo conoce como subtipo H2N2.

La epidemia se inició en febrero de 1957 en la provincia china de Kwichow, y en 10 meses se difundió prácticamente a todo el mundo⁵⁷⁻⁵⁹. Cursó en general dos ondas; la segunda afectó a Asia a finales de 1957 y a Europa y América en el primer trimestre de 1958. La morbilidad de la gripe asiática fue muy elevada, pero su letalidad fue afortunadamente baja, estimándose no superior al 0,1%. Resultaron afectados sobre todo los niños y jóvenes, disminuyendo la mortalidad con la edad. En España la primera onda epidémica confirmada se difundió durante los meses de septiembre, octubre y noviembre



de 1957, declarándose oficialmente 6.751.200 casos. A pesar de su escasa letalidad, se señaló un evidente incremento de la mortalidad general en relación con las medias del quinquenio anterior. La distribución etaria de la morbilidad y el hallazgo de anticuerpos en los sueros de personas de más de 71 años obtenidos antes de la epidemia permiten suponer que virus similares al asiático circularon en la población humana a finales del siglo pasado, presumiblemente antes de la pandemia de 1889.

Desde 1958 a 1968 la gripe volvió a mostrar su actividad en brotes estacionales o polianuales moderados ocasionados por el mismo virus H2N2 que, por lo menos, presentó dos variantes menores en 1962 y 1967.

Pandemia de gripe Hong Kong de 1968. Aparición del subtipo H3N2. En el mes de julio de 1968 se aisló en Hong Kong, en el curso de una epidemia que afectó a más de medio millón de personas, un virus gripal con una importante variación en la hemaglutinina⁶², el virus Hong Kong/68 (H3N2). Dicho virus fue el causante en los meses posteriores de la última gran pandemia registrada en el mundo.

La gripe Hong Kong tuvo su origen en la República Popular China, desde donde se extendió rápidamente. En octubre resultaron afectados los Estados Unidos. La difusión en Europa se produjo, con variaciones según los países, entre enero y mayo de 1969. Esta primera onda tuvo una morbilidad escasa y no repercutió en la mortalidad general, excepto en Estados Unidos, donde la morbilidad fue elevada y las tasas de mortalidad registraron incrementos semejantes a los observados en la gripe asiática. La segunda onda se inició probablemente en España en el mes de octubre y se difundió al resto de Europa a partir de noviembre. La morbilidad fue muy elevada, estimándose que afectó en algunas zonas a más del 20% de la población, y en todos los países se registró un importante incremento de la mortalidad. El exceso de mortalidad general durante los meses de noviembre y diciembre de 1969 alcanzó en Barcelona cifras del 40%, y la hipermortalidad por neumonía y gripe cifras del



25%⁵¹. Aunque la enfermedad afectó a todos los grupos de edad, la incidencia fue más acusada entre los adultos jóvenes.

Estudios en sueros pares de enfermos de gripe por cepas anteriores H2N2⁶⁴ confirmaron la gran variación de la hemaglutinina del virus Hong Kong, no relacionada con la del virus asiático. El análisis antigénico y genético demuestra que esta hemaglutinina H3 es semejante a una existente en virus equinos y aviares⁶². Los estudios serológicos retrospectivos, por otra parte, indican que esta hemaglutinina formaba parte de virus circulantes en la población humana antes de 1918.

Desde 1972 hasta 1977 la gripe A estuvo ocasionada exclusivamente por virus del subtipo H3N2 semejantes al Hong Kong, aunque en dicho periodo se observaron diversas variantes menores.

Reaparición del subtipo H1N1 en 1977. En enero de 1976 se produjo una epidemia de gripe entre los reclutas del campamento militar de Fort Dix en New Jersey, causada por un virus H1N1 similar a las cepas porcinas Hsw1N1⁶⁶. Teniendo en cuenta que una cepa H1N1 de origen porcino fue la causante de la pandemia de 1918, y recordando el episodio de Fort Riley que precedió a aquella pandemia, se comprende la alarma de los servicios de salud pública norteamericanos y el febril interés de todos los laboratorios colaboradores de la OMS⁶⁶. Sin embargo, el episodio de Fort Dix fue autolimitado y no difundió a la población general. Se cree que fue efectivamente producido por un virus porcino y se desconoce el porqué de su escasa transmisibilidad.

A partir de 1977 una serie de brotes epidémicos, hoy en día observados en todas partes del mundo, están causados por otro virus del subtipo H1N1 prácticamente idéntico a las cepas de 1950. La primera epidemia se registró de nuevo en China⁶⁷ en mayo de 1977, de donde difundió a la Unión Soviética durante los meses de noviembre y diciembre⁶⁸. Todos los brotes epidémicos ocasionados por estos virus H1N1 presentan unas características hasta ahora constantes y peculiares: a) difusión lenta, b) morbilidad escasa, c) los casos cursan generalmente en forma moderada y con frecuencia inaparente y d)



todos los casos se dan entre adultos jóvenes, menores de 25 años, siendo raros los casos en edades superiores. Estas constataciones confirman la similitud entre los actuales virus H1N1, de los que ya se han registrado diversas variantes menores, y los que difundieron en los años cincuenta. Por otra parte, resulta evidente que las infecciones en aquellos años confirieron una inmunidad duradera, responsable de la distribución por edades de los casos actuales.

En este momento, la epidemiología de la gripe A presenta unas características diferentes a las que presentaba antes de 1977. En efecto, antes de dicha fecha, la aparición de un nuevo subtipo desplazaba y sustituía rápidamente a las cepas anteriores. Y no sólo un nuevo subtipo: la aparición de una variante menor, aunque más lentamente, también sustituía a las prevalentes con anterioridad. Ahora se presentan simultánea o sucesivamente brotes epidémicos producidos por los subtipos H3N2 y H1N1, y en los ocasionados por un solo subtipo no es infrecuente la coexistencia de diversas variantes. Por supuesto, a las epidemias causadas por los dos subtipos A se añaden los brotes epidémicos producidos por el virus B.



2.- OTRAS VIRIASIS RESPIRATORIAS

A. INTRODUCCIÓN

La infección respiratoria aguda es la patología más frecuente a lo largo de la vida ⁶⁹⁻⁷³. En nuestro país, las enfermedades infecciosas son el motivo de más del 60% de las consultas en pediatría extrahospitalaria. De ellas, un 70% corresponden a una infección respiratoria, cuyo origen es vírico en más de la mitad de los casos. La mayoría sólo afectan al tracto respiratorio superior y pueden ser consideradas leves, de curso benigno y autolimitado (catarro común, rinitis y faringoamigdalitis). Alrededor del 5% pueden implicar al tracto respiratorio inferior (bronquitis, bronquiolitis y neumonía), constituyendo infecciones potencialmente más graves que, en muchos casos, requieren el ingreso hospitalario. En edad adulta las infecciones respiratorias de origen viral son una causa importante de morbilidad, sin embargo los cuadros clínicos que precisan de atención médica prácticamente se limitan a pacientes ancianos e inmunodeprimidos o con una patología pulmonar subyacente.

B. IMPACTO CLÍNICO

Además de los virus de la gripe A, B y C, se han identificado más de dos centenares de virus, distribuidos en seis familias (Tabla 6), implicados en la patogénesis de la infección del tracto respiratorio.

**Tabla 6.** Virus asociados con síndromes respiratorios en el ser humano

Familia	Género	Virus	Tipos y subtipos	
Orthomyxoviridae	<i>Influenzavirus A</i>	Virus de la gripe A	H1N1	
			H3N2	
			H5N1	
			H7N7	
			H7N3	
			H9N2	
	<i>Influenzavirus B</i>	Virus de la gripe B		
	<i>Influenzavirus C</i>	Virus de la gripe C		
Paramyxoviridae	Respirovirus	Virus parainfluenza 1		
		Virus parainfluenza 3		
	Rubulavirus	Virus parainfluenza 2		
		Virus parainfluenza 4	VPI-4 ^a	
			VPI-4B	
		Metapneumovirus	Metapneumovirus humano	
	Pneumovirus	Virus respiratorio sincitial	VRS-A	
			VRS-B	
<i>Picornaviridae</i>	Enterovirus			
	Rhinovirus			
<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus	Coronavirus 229E		
		Coronavirus OC43		
		Coronavirus SARS		
		Coronavirus NL63		
		Coronavirus HKU1		
<i>Adenoviridae</i>	Mastadenovirus	Adenovirus		
<i>Parvoviridae</i>	Bocavirus	Bocavirus humano		



Como característica general de estas infecciones, cada uno de los virus puede ser el agente etiológico de más de un síndrome diferente (Tablas 7 y 8). Sin embargo, cada uno de ellos está más asociado con un tipo particular de enfermedad, dependiendo en muchos casos de las condiciones ambientales, area geográfica, estacionalidad y de la edad del paciente.

Las focalidades infecciosas que se consideran con un criterio didáctico son: resfriado común, faringitis aguda, laringitis aguda, laringotraqueobronquitis aguda, otitis media aguda, sinusitis, epiglotitis, bronquitis aguda, exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiolitis y neumonía; que en función de los agentes etiológicos potencialmente implicados y categorizados según se trate de adultos o niños se reflejan en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7. Etiología vírica de los síndromes respiratorios en adultos.

Virus	Catarro común	Faringitis	Traqueobronquitis	Neumonía
Virus respiratorio sincitial	+	+	+	-
Virus parainfluenza 1	+	+	+	-
Virus parainfluenza 2	+	+	+	-
Virus parainfluenza 3	+	+	+	-
Virus parainfluenza 4	+	+	+	-
Metapneumovirus	+	+	+	-
Virus de la Gripe A	+	2+	3+	2+
Virus de la Gripe B	+	2+	2+	+
Rinovirus	4+	2+	+	+
Coronavirus	+	+	+	+
Enterovirus	+	+	+	+
Adenovirus	+	+	+	+

Símbolos de frecuencia relativa: + (caso aislado), 2+ (pequeña proporción de casos), 3+ (proporción considerable de casos), 4+ (mayoría de casos).

**Tabla 8.** Etiología vírica de los síndromes respiratorios en niños.

Virus	Catarro común	Laringotraqueo-			
		Faringitis	bronquitis (crup)	Neumonía	Bronquiolitis
Virus respiratorio sincitial	3+	2+	2+	4+	4+
Virus parainfluenza1	3+	2+	4+	2+	2+
Virus parainfluenza2	2+	+	+	+	+
Virus parainfluenza3	3+	2+	2+	3+	3+
Virus parainfluenza4	2+	+	+	+	+
Metapneumovirus humano	2+	2+	+	+	3+
Virus de la gripe A	2+	2+	2+	3+	3+
Virus de la gripe B	2+	2+	+	+	+
Rinovirus	2+	2+	+	+	+
Coronavirus	+	+	+	+	+
Enterovirus	+	+	+	+	+
Adenovirus	3+	2+	+	+	+
Bocavirus humano	2+	2+	+	2+	3+

+ (caso aislado), 2+ (pequeña proporción de casos), 3+ (proporción considerable de casos), 4+ (mayoría de casos).



C. ESTRATEGIAS DE DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

El diagnóstico virológico de la infección respiratoria depende en gran medida de la calidad de la muestra obtenida, del transporte de la misma al laboratorio y de las condiciones de conservación o almacenamiento hasta que es procesada. La muestra de elección para detectar virus respiratorios es el aspirado nasofaríngeo, preferiblemente obtenido en los tres primeros días después del inicio de los síntomas, dado que contiene abundantes células epiteliales y secreciones infectadas. Otras muestras respiratorias del tracto respiratorio superior que también son adecuadas, pero en las que cabe esperar un menor rendimiento, son los exudados nasales o faríngeos y los lavados nasales. En el caso de que el punto de recogida de las muestras respiratorias y el laboratorio encargado del procesamiento de las mismas no estén próximos, éstas se enviarán refrigeradas y en medio de transporte de virus. Hay que tener en cuenta que los mejores rendimientos se obtienen si las muestras son procesadas 2-3 horas después de ser obtenidas para la detección de antígenos virales mediante ensayos de inmunofluorescencia y antes de 48 horas para aislamiento de virus en cultivo celular. En el caso de que las muestras no puedan ser procesadas en el periodo de tiempo señalado deberán conservarse a -80° C.

Desde un punto de vista teórico este diagnóstico puede adoptar una doble estrategia⁶⁹. De una parte la que se fundamenta en métodos directos, como son los capaces de recuperar el virus mediante su aislamiento en cultivo celular y aquellos que permiten detectar la presencia del virus en las secreciones respiratorias del paciente (detección de antígenos y de genoma). Para la detección de este último la reacción en cadena de la polimerasa⁷⁰ (PCR) es la técnica más empleada tanto en su vertiente clásica o PCR a tiempo final como la PCR a tiempo real. Estos métodos de PCR a tiempo real permiten la cuantificación, además de reducir el riesgo de contaminaciones y el tiempo requerido en la emisión de los resultados. Si a esto se añade la posible



utilización de una PCR múltiple que además de detectar diferentes géneros de virus respiratorios con interés humano permitan el subtipado de los mismos, el valor de esta metodología se ve incrementado notablemente. De manera complementaria se han implantado metodologías basadas en PCR acoplada a enzimoimmunoanálisis (PCR-EIA) y los *microarrays* o biochips que posibilitan el análisis simultáneo de varios genes pertenecientes a un mismo agente. De la combinación de ambas metodologías ha surgido una tecnología denominada XMAP®, fundamentada en una PCR múltiple que origina productos de amplificación marcados con biotina que posteriormente son detectados mediante microesferas, en este caso marcadas con estreptavidina, y analizados con un instrumento Luminex (Luminex Corporation) cuya tecnología está basada en los principios de la citometría de flujo.

De otra parte se sitúa la estrategia de diagnóstico indirecto que valora la inducción de una respuesta inmunitaria de tipo humoral a través de la detección de anticuerpos específicos en suero.

El elevado número de virus que pueden estar involucrados en la patología respiratoria, y su enorme heterogeneidad, hace del diagnóstico etiológico una labor ardua y condicionada a la utilización de técnicas de amplio espectro. Los métodos de detección directos, que permiten el aislamiento del virus en cultivos celulares o determinar la presencia de alguno de sus componentes directamente en las muestras respiratorias, ya sean antígenos o genes, son los más extendidos en los laboratorios de microbiología clínica. Los métodos indirectos, basados en la determinación de anticuerpos específicos presentan menor utilidad en el diagnóstico convencional y están siendo relegados como herramientas de estudio epidemiológico.



2.1-RINOVIRUS

Etiología y Epidemiología

La familia *Picornaviridae* está integrada por un grupo de virus que presentan interés desde el punto de vista clínico tanto en sanidad humana como veterinaria. Taxonómicamente se diferencian nueve géneros de los cuales se han identificado cinco como productores de infección en el hombre: *Rinovirus*, *Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus* y *Parechovirus*. Los Rinovirus humanos (RVH) y en menor medida los Enterovirus, han sido ampliamente vinculados a la producción de infección respiratoria.

Morfológicamente son virus esféricos, pequeños (20-30 nm) cuyo genoma está constituido por una molécula de ARN de polaridad positiva con cápside de simetría icosaédrica y carentes de membrana de envoltura. Existen cuatro proteínas principales del cápside: VP1, VP2, VP3 (externas) y VP4 (interna). En la superficie viral existen zonas más prominentes (activadoras de la respuesta inmune) y zonas deprimidas o cañones (zonas de interacción con el receptor).

La alta incidencia de la infección por Rinovirus se encuentra relacionada con la existencia de un gran número de serotipos, ya que se considera que este género está compuesto por más de un centenar de serotipos que se agrupan en dos especies definidas antigénicamente: RVH-A y RVH-B constituidas por 74 y 25 serotipos diferentes respectivamente. El serotipo RVH87 ha sido genéticamente relacionado y clasificado como enterovirus.

Los RVH causan entre un tercio y la mitad de todas las infecciones agudas del tracto respiratorio. Son más comunes en climas templados y durante los meses más fríos del año. La infección se disemina de persona a persona por contacto directo, a través de secreciones respiratorias y a través del contacto con objetos ambientales o superficies contaminadas.



Patogenia y Clínica

La enfermedad típica que produce la infección por rinovirus es el resfriado común y se caracteriza clínicamente por la presencia de estornudos, obstrucción y secreción nasal, dolor faríngeo y otros síntomas como cefalea, tos y malestar general; con un curso generalmente autolimitado. En algunos casos pueden estar involucrados en otitis media aguda, sinusitis e infección del tracto respiratorio inferior^{59,74}, ocasionando neumonía⁶⁰ en inmunodeprimidos. Se han implicado en la génesis de las exacerbaciones de los pacientes asmáticos⁷⁵ y de los bronquíticos crónicos.

Diagnóstico

La detección de rinovirus se ha basado tradicionalmente en el aislamiento del virus en cultivo celular, que está considerado como la técnica de referencia, pero su identificación resulta larga y laboriosa. Por su accesibilidad se han implantado las técnicas de detección molecular basadas en PCR múltiple y en microarrays, que permiten la obtención de resultados en pocas horas.

La detección de Ac posee escasa utilidad en el diagnóstico de las infecciones por rinovirus, debido a la gran cantidad de serotipos que existen y la imposibilidad de emplear un antígeno común.

Tratamiento y Profilaxis

La actitud terapéutica se basa en el empleo de antihistamínicos, antiinflamatorios no esteroideos y la administración nasal de suero salino fisiológico, los cuales mejoran los síntomas pero no reducen la duración de la enfermedad.

La interrupción de la cadena de transmisión, a través del lavado de las manos y la desinfección de los fómites potencialmente contaminados, representa una medida eficiente en la prevención



2.2.- METAPNEUMOVIRUS

Etiología y Epidemiología

El metapneumovirus humano (MPVH) se incluye en el Orden *Mononegavirales*, Familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*, género *Metapneumovirus*. Las características morfológicas del virión coinciden con aquellas definidas, en los paramyxovirus: partículas pleomórficas de tamaño entre 150 a 600 nm, con una envuelta que presenta proyecciones cortas o espículas de 13-17 nm.

Su genoma está constituido por una molécula de ARN de polaridad negativa de unos 13400 nucleótidos. Los dos géneros de la subfamilia *Pneumovirinae* (*Metapneumovirus* y *Pneumovirus*) se diferencian en que el género metapneumovirus carece de proteínas no estructurales NS1 y NS2 y en el orden de los genes. Se han definido dos genotipos A y B que a su vez se subdividen en cuatro subgenotipos (A1, A2 y B1, B2), en función de las secuencias de los genes que codifican para las proteínas F (Fusión) y G (glicoproteína de anclaje al receptor celular).

La aparición de casos es estacional en los países con clima templado y se ha concretado desde el invierno a la primavera. En nuestro país el pico de detección llega a ser máximo en los meses de febrero a abril y la mayoría de las series incluyen a pacientes pediátricos hospitalizados con bronquiolitis⁷⁶ o asma.

Patogenia y Clínica

En general, los mecanismos patogénicos y las manifestaciones de los infectados por MPVH se asemejan a la infección respiratoria⁷⁷ del tracto inferior asociada al Virus Respiratorio Sincitial (VRS). Oscila desde una infección de afectación media hasta tos severa, bronquiolitis y neumonía, frecuentemente acompañado de fiebre muy alta, mialgia y vómitos.



El cuadro es más grave en los niños menores de 2 años, donde exige a menudo hospitalización, presentando una sintomatología mucho más leve en niños mayores y adultos. Se ha demostrado que la coinfección entre el VRS y el MPVH supone un aumento de la gravedad del cuadro respiratorio de los niños infectados⁷⁸.

Diagnóstico

Si bien se puede aislar mediante cultivo de muestras respiratorias en líneas celulares, se han impuesto las tecnologías fundamentadas en una PCR⁵⁸ múltiple que origina productos de amplificación marcados con biotina y detectados mediante microesferas, con estreptavidina, y analizados con un instrumento Luminex (Luminex Corporation); cuya principio está basada en los principios de la citometría de flujo. El planteamiento es similar al de un *microarray* pero con la ventaja de utilizar sondas impresas sobre partículas en suspensión en lugar de fijas sobre una superficie con objeto de aumentar la sensibilidad. En la práctica se emplean paneles capaces de detectar casi dos decenas de virus respiratorios diferentes.

Tratamiento y Profilaxis.

Aunque el tratamiento es básicamente sintomático, se han iniciado estudios para producir anticuerpos monoclonales y policlonales que puedan neutralizar al MPVH al ser administrados en pacientes con infección activa.

Además de las medidas de profilaxis de exposición (lavado de manos, minimizar el contacto con secreciones respiratorias) están en desarrollo vacunas quiméricas que pretenden inmunizar de modo concomitante frente a MPVH y VRS.



2.3.- CORONAVIRUS

Etiología y Epidemiología

Los Coronavirus (familia *Coronaviridae*, género *Coronavirus*) son un grupo de virus envueltos, redondeados o pleomórficos. La membrana de envoltura presenta unas espículas características que constituye uno de los elementos distintivos de la morfología del virión cuando se observan al microscopio electrónico, con aspecto de corona, de donde reciben su nombre. Además de la proteína de la espícula, S, responsable de la unión con el receptor celular y de la fusión de las membranas vírica y celular, en la envuelta de todos los coronavirus pueden distinguirse al menos dos proteínas más, denominadas M y E. En el interior del virión, el nucleocápside, con simetría helicoidal, está constituido por la proteína N formando un complejo con una única molécula de ARN de polaridad positiva. El genoma completo posee un tamaño de unos 30.000 nucleótidos. La estructura genómica es idéntica en todos los coronavirus, reservando los dos tercios más próximos al extremo 5' para el síntesis de las proteínas necesarias para la replicación del ARN, y el tercio restante para la síntesis de las proteínas estructurales en el orden S-E-M-N, y otras proteínas que, como en el caso de la hemaglutinín-esterasa, son específicas de grupo y sólo están presentes en algunos coronavirus.

Los coronavirus son un grupo heterogéneo de virus que pueden infectar un número diverso de mamíferos, entre los que se encuentra el ser humano, y aves. Se pueden diferenciar tres grupos atendiendo a sus propiedades antigénicas, a la posición y variedad de sus genes y al tipo de hospedador que infectan. Así, los grupos 1 y 2 están constituidos por coronavirus que infectan mamíferos, en tanto que el grupo 3 sólo está integrado por coronavirus de aves.

Desde mediados de los años sesenta del pasado siglo los coronavirus humanos, CoVH-229E (grupo 1) y CoVH-OC43 (grupo 2), se han asociado con el resfriado común, y se consideraban patógenos respiratorios relativamente benignos. Sin embargo esta concepción cambió en 2003, cuando se identificó un nuevo coronavirus como responsable del síndrome respiratorio agudo grave



(CoVH-SARG), que ocasionaba brotes de neumonía atípica con una letalidad próxima al 10%. Presentó elevada transmisibilidad en centros sanitarios y afectó casi a una treintena de países, extinguiéndose en el plazo de breves meses. Aunque el CoVH-SARG no circula actualmente entre seres humanos, la elevada morbilidad y mortalidad asociada con el brote de SARG ha reavivado el interés por los miembros de esta familia y ha permitido la identificación de otros dos nuevos coronavirus asociados con patología respiratoria. El coronavirus NL63 (CoVH-NL63), incluido en el grupo 1, y el coronavirus HKU1, perteneciente al grupo 2. Desde su descubrimiento, ambos virus se han asociado con casos de infección respiratoria, evidenciando una distribución universal de los mismos. Dependiendo de las series publicadas, ambos se detectan en el 1-10% de los pacientes con infección respiratoria aguda, siendo relativamente común la co-detección junto con otros virus respiratorios y alcanzando máxima actividad en nuestra latitud en invierno y primavera, con ondas polianuales.

Patogenia y Clínica

Las infecciones se producen en todas las edades, pero son más frecuentes en niños⁷⁹, ejercen tropismo por las células epiteliales ciliadas de la nasofaringe (si bien pueden infectar las células epiteliales del aparato digestivo). El cuadro clínico que ocasionan parece estar más relacionado con la liberación de mediadores de la inflamación que con la lesión celular y consiste esencialmente en congestión nasal, rinorrea, odinofagia y tos seca de una semana de duración. La sintomatología sistémica, malestar general, cefalea, fiebre o febrícula, es menos frecuente.

También pueden producir infecciones del aparato respiratorio inferior⁵⁹, especialmente en pacientes con enfermedades de base o inmunodeprimidos.

Pueden presentarse complicaciones en pacientes ancianos o con patología respiratoria subyacente así como en niños de corta edad. Los coronavirus se



han relacionado con cuadros de gastroenteritis⁸⁰ y no son abordados, obviamente, en este apartado.

La asistencia a pacientes con CoVH-SARG permitió documentar un cuadro pseudogripal de inicio, con posterior compromiso respiratorio que en los casos graves evolucionaron al distrés y diarrea líquida abundante.

Diagnóstico

En las infecciones por CoVH-SARG las radiografías y el TAC de tórax permitan objetivar consolidaciones focales, uni o bilaterales que en estadios avanzados evolucionaban a signos de fibrosis, cambios quísticos, neumomediastino o neumotórax.

Desde el punto de vista virológico el abordaje práctico de las infecciones por coronavirus se enfoca tal y como se ha expuesto en el apartado general mediante técnicas de detección genómica basadas en PCR⁵⁸ a tiempo real y “biochips” que aumentan la sensibilidad.

La detección de Ac posee valor en la realización de estudios epidemiológicos para documentar la infección pasada.

Tratamiento y Profilaxis

Carecemos de antivíricos eficientes frente a las infecciones habituales por coronavirus; por tanto, su tratamiento es de tipo sintomático. En los pacientes con CoVH-SARG se han empleado antivíricos como Ribavirina y Lopinavir e inmunomoduladores como BetaInterferón y alfaTNF con resultados variables.

Las medidas de profilaxis se asimilan a lo descrito para los Rinovirus.



2.4.- VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL

Etiología y Epidemiología

El virus respiratorio sincital (VRS) pertenece al género *Pneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae*. La morfología de los viriones de VRS coincide con aquella que define a los Paramyxovirus: son esféricos, filamentosos o pleomórficos y poseen una membrana de envoltura donde pueden distinguirse unas espículas correspondientes a glicoproteínas. El genoma, de alrededor de 15000 nucleótidos, consta de una única molécula de ARN monocatenario de polaridad negativa que se asocia con proteínas de origen vírico constituyendo el nucleocápside, que presenta simetría helicoidal. Un armazón proteico, denominado matriz, separa al nucleocápside de la envuelta exterior.

Su genoma codifica para diez proteínas, tres de ellas no estructurales (NS1, NS2 y M2). De las siete proteínas estructurales restantes, tres forman parte del complejo del nucleocápside, la nucleoproteína N, la fosfoproteína P y polimerasa L, y cuatro se localizan en la envuelta, dos de las cuales, la proteína de fusión (F) y la que está implicada en el reconocimiento del receptor celular (G), una es la proteína que conforma el armazón de la matriz (M), y por último una proteína pequeña e hidrófoba (SH) de función desconocida. Atendiendo a variaciones antigénicas y genéticas los diferentes aislados de VRS pueden diferenciarse en dos grupos denominados VRS-A y VRS-B.

Representa la principal causa de enfermedad respiratoria del tracto inferior^{59,81} en niños de corta edad. En los países de nuestro entorno, en los que su epidemiología es relativamente homogénea, el VRS es responsable del 42-45% de las hospitalizaciones por esta causa en menores de dos años⁸². Los ancianos y adultos inmunodeprimidos también se reconocen como pacientes en los que se observan complicaciones debidas a infección por VRS, en muchas ocasiones adquiridas de manera nosocomial.



En países con un clima templado la infección por VRS ocurre fundamentalmente en los meses de otoño-invierno y comienzos de la primavera en ondas que se repiten anualmente⁸³. Durante un mismo brote circulan de manera simultánea cepas de ambos grupos, pero las proporciones de VRS-A y VRS-B varían.

Patogenia y Clínica

La afectación por VRS se circunscribe a las vías aéreas y las enfermedades de base tales como bronconeumopatías, cardiopatías congénitas y la inmunodepresión agravan la infección. La inmunidad tras una infección es transitoria e incompleta y al cabo de varias reinfecciones el cuadro clínico se suaviza como sucede en los niños mayores y en los adultos.

En los niños pequeños las infecciones primarias suelen afectar a las vías respiratorias bajas, en forma de bronquiolitis o broncoalveolitis (50% de los casos) y con menor frecuencia como neumonía, traqueobronquitis o laringotraqueítis. Tras unos días de rinitis, aparece tos seca y dificultad respiratoria progresiva con fiebre, taquipnea y retracción de los músculos intercostales (tiraje intercostal y subcostal). En los lactantes de pocas semanas de vida, sobre todo en los pretérmino, la sintomatología respiratoria a veces está ausente o es mínima y predominan manifestaciones como letargia, irritabilidad, rechazo de las tomas e incluso episodios de apnea. En la exploración física se advierten sibilancias de predominio espiratorio, con o sin crepitantes finos diseminados, y espiración alargada; según la intensidad del cuadro, puede haber taquicardia y palidez. No es infrecuente que haya hipoxemia, aunque es raro que se aprecie cianosis. La mayoría de lactantes previamente sanos siguen un curso relativamente leve y autolimitado en unas 2 semanas y las sobreinfecciones bacterianas son muy poco frecuentes. La enfermedad puede ser grave en prematuros, niños con cardiopatías



congénitas, hipertensión pulmonar; o displasia broncopulmonar; así como en inmunodeprimidos⁸⁴.

Las reinfecciones de los niños mayores y adultos son más y cursan como catarro común o rinofaringitis, a veces con otitis media, traqueobronquitis o bronquitis. Por otra parte, no es raro que provoque exacerbaciones asmáticas o de otras enfermedades pulmonares crónicas. Los niños que han padecido una bronquiolitis presentan mayor tendencia a sufrir episodios de tipo asmático recurrentes. La radiografía de tórax muchas veces es normal, o pone de manifiesto hiperinsuflación pulmonar, atelectasias subsegmentarias o infiltrados intersticiales dispersos; en las neumonías hay condensación pulmonar, en especial del lóbulo superior o medio derechos.

Diagnóstico

Se emplean para él todas las modalidades de diagnóstico virológico directo. Es posible efectuar el aislamiento del virus en cultivos celulares convencionales a partir de las secreciones respiratorias; se objetiva mediante la aparición del característico efecto citopático con formación de sincitios en el plazo de 5 a 7 días. Para el diagnóstico rápido se utilizan las técnicas de inmunofluorescencia, inmunocromatografía o de enzimoimmunoanálisis con anticuerpos monoclonales específicos, que permiten identificar el antígeno vírico en las secreciones nasofaríngeas con una sensibilidad próxima al 90%. Se han implantado también sistemas de detección del material genético mediante amplificación por PCR en sus versiones a tiempo final y tiempo real y por microarrays; cuyos resultados pueden obtenerse rápidamente y que posibilitan determinar simultáneamente la presencia de otros virus respiratorios en una misma muestra.



Tratamiento y Profilaxis

Además de las medidas de soporte como oxígeno y/o ventilación asistida, es posible la administración de ribavirina nebulizada, si bien su actividad es reducida.

En el contexto de brotes en las unidades neonatales se deben adoptar medidas de aislamiento de contacto y respiratorias. Se han desarrollado inmunoglobulinas hiperinmunes y anticuerpos monoclonales que, administrados mensualmente a niños de alto riesgo, disminuyen la incidencia y la gravedad de estas infecciones. En nuestro medio se dispone de Palivizumab, que se administra por vía intramuscular durante los meses de incidencia del VRS, y cuyas indicaciones abarcan a lactantes y niños menores de 2 años afectos de neumopatía crónica significativa, lactantes nacidos a las 32 semanas de gestación o menos y lactantes nacidos entre las 32 y las 35 semanas de gestación con otros factores asociados de riesgo. Se ha desarrollado además Metavizumab que está siendo evaluado y hasta el momento no se dispone de vacuna.



2.5.- VIRUS PARAINFLUENZA

Etiología y Epidemiología

Actualmente se reconocen cinco virus parainfluenza diferentes, los virus parainfluenza 1 y 3 (VPI-1 y VPI-3) encuadrados en el género *Respirovirus*, y los virus parainfluenza 2, 4A y 4B (VPI-2, VPI-4A y VPI-4B), pertenecientes al género *Rubulavirus*, ambos en la familia *Paramyxoviridae*. Comparten con todos los miembros de esta familia las características morfológicas descritas anteriormente. Sin embargo, presentan aspectos diferenciales, como el hecho de que reconozcan el ácido siálico de algunas de las células epiteliales para iniciar el proceso de infección del mismo modo que los virus de la gripe. La proteína implicada en este reconocimiento se denomina hemaglutinina-neuraminidasa (NH), y se asocia con la proteína de fusión F para mediar la entrada del virus en la célula infectada. En cuanto al resto de proteínas, también se reconocen las tres que forman el complejo del nucleocápside (N, P y L), y la proteína matriz M. El número de proteínas no estructurales es variable dependiendo del tipo de virus parainfluenza, pero codifican al menos una proteína de este tipo.

La distribución de las infecciones por virus parainfluenza es universal, y pueden tener carácter epidémico o esporádico.

Patogenia y Clínica

El espectro de cuadros respiratorios en los que están implicados los virus parainfluenza es muy similar a aquellos descritos para VRS y en ocasiones para el virus de la gripe⁸⁵, sin embargo, el número de pacientes que requieren hospitalización es significativamente menor. El VPI-3 infecta más frecuentemente a niños menores de 2 años de edad, ocasionando cuadros respiratorios de vías altas como rinitis y faringitis, no obstante la fiebre, la bronquiolitis⁵⁹ y la neumonía⁶⁰ son manifestaciones que pueden observarse en pacientes de hasta seis meses de vida, aunque con menor frecuencia que



aquellas debidas a infección por VRS. En niños mayores, con una edad comprendida entre 2 y 6 años, la laringotraqueobronquitis aguda es la manifestación más característica de la infección por virus parainfluenza, particularmente VPI-1. Las manifestaciones clínicas observadas en niños mayores de seis años y adultos se limitan exclusivamente a las vías altas. En ancianos las infecciones respiratorias por virus parainfluenza son bastante menos graves que las causadas por VRS.

Diagnóstico

El diagnóstico específico se puede hacer mediante el aislamiento del virus en cultivo de las secreciones rinofaríngeas, a través de la identificación de antígenos víricos en las mismas por técnicas de inmunofluorescencia y mediante los métodos de detección molecular⁵⁸ similares a lo comentado para VRS.

Tratamiento y Profilaxis

La terapia sintomática engloba la humidificación con nebulizador y en casos leves con la mera exposición al aire fresco. Si se documenta dificultad respiratoria se deben administrar glucocorticoides nebulizados y/o por vía oral o intramuscular; si el cuadro clínico adquiere mayor intensidad, se debe asociar una dosis de adrenalina nebulizada, para acelerar la resolución de la inflamación laríngea.

La profilaxis radica en evitar el contacto con secreciones respiratorias y un minucioso lavado de manos. Los pacientes hospitalizados deben ser sometidos a «aislamiento de contacto» y respiratorio.



2.6.- BOCAVIRUS

Etiología y Epidemiología

Los Bocavirus Humanos (BoVH) pertenecen al género *Bocavirus*, encuadrado en la familia *Parvoviridae* y como todos los parvovirus, son virus esféricos de pequeño tamaño con simetría icosaédrica, carentes de membrana envoltura, y con un genoma constituido por una única molécula de ADN monocatenario de 4-6 kb con tres genotipos.

En nuestro país, los BoVH circulan a lo largo de toda la temporada, como ocurre con rinovirus o adenovirus, con picos de detección en los meses de fríos de finales de otoño e invierno.

Patogenia y Clínica

Han sido identificados por primera vez en muestras de aspirado nasofaríngeo procedentes de niños con infección respiratoria y con posterioridad se han implicado en cuadros de bronquiolitis⁵⁹ y sibilancias recurrentes en niños de corta edad siendo capaces de inducir infección sistémica. Por otro lado, también podrían ser responsables de un pequeño porcentaje de gastroenteritis.

Diagnóstico

El diagnóstico etiológico se realiza con técnicas de detección molecular en las muestras de secreción respiratoria mediante métodos de amplificación molecular del tipo de PCR^{58,86} a tiempo real y microarrays.



Tratamiento y Profilaxis

Al igual que en el apartado precedente el tratamiento es sintomático. Las medidas profilácticas es evitar el contacto con las secreciones respiratorias de los pacientes, insistiendo en el lavado de manos del personal sanitario después de atender los niños afectos de infecciones respiratorias.



2.7.- ADENOVIRUS

Etiología y Epidemiología

Taxonómicamente se clasifican en la familia *Adenoviridae*, que incluye dos géneros: *Mastadenovirus* y *Aviadenovirus*, agrupando el primero a los virus causantes de infecciones en mamíferos, y el segundo, a aquellos que causan infección en aves.

Los ADV humanos (ADVH) son viriones de 70 a 110 nm, con un cápside icosaédrico, sin membrana de envoltura y con un genoma lineal de ADN de cadena doble⁸⁷. Se clasifican en 6 especies (A-F) en función de sus propiedades físicas, químicas, y biológicas y se han descrito casi sesenta serotipos diferentes. Poseen determinantes antigénicos comunes y específicos de especie, afectando a pacientes de todas las edades, con máxima incidencia entre los 6 y los 12 meses. Pueden ocasionar otras focalidades como gastroenteritis aguda y cistitis hemorrágica.

Las infecciones respiratorias predominan al final del invierno, en primavera y a comienzos del verano. Algunos serotipos (3, 4, 7, 14, 21) ocasionan epidemias. Se producen brotes de infecciones respiratorias o conjuntivitis en hospitales y otras instituciones cerradas. La contagiosidad es máxima en los primeros días de una enfermedad aguda.

Patogenia y Clínica

Los ADVH están asociados a un amplio rango de cuadros clínicos y ocasionan otras focalidades infecciosas como cistitis hemorrágicas, gastroenteritis, hepatitis o infección diseminada grave en pacientes inmunodeprimidos.



La infección primaria suele ocurrir en los primeros años de vida en forma de infección respiratoria aguda de vías altas, aunque a veces es asintomática. Los procesos en los que con más frecuencia se identifican adenovirus son las rinofaringitis, las faringoamigdalitis y las otitis medias, generalmente acompañadas de fiebre más o menos elevada de varios días de duración. Las infecciones respiratorias agudas pueden implicar a un sólo serotipo como causante de cuadros clínicos diferentes y viceversa. Se presentan en brotes epidémicos y en casos esporádicos. Las patologías respiratorias más frecuentes relacionadas con los serotipos, así como el grupo de edad al que afectan son: Infecciones respiratorias de vías altas (serotipos 1,2,3,6,7) Fiebre y Faringoconjuntivitis (3,7,8), Neumonía (3,4,7) y Neumonía diseminada en inmunodeprimidos (31,34,35,39).

Diagnóstico

El diagnóstico etiológico se establece por el aislamiento del virus en cultivos celulares de muestras clínicas acordes con la focalidad. Por medio de anticuerpos monoclonales específicos se puede demostrar la presencia de antígenos de adenovirus en las citadas muestras de forma rápida, aunque este método es poco sensible.

Los métodos de detección genómica de las modalidades ya descritas ofertan resultados en un período corto de tiempo. Se han descrito sistemas basados en la secuenciación de productos de amplificación por PCR⁵⁸ diseñados en el exón, que es una de la proteínas de la envuelta del virus, que permiten efectuar una tipificación concordante con los lugares antigénicos virales reconocidos por los anticuerpos neutralizantes.

Las técnicas de detección de Ac séricos permiten hacer un diagnóstico retrospectivo cuando se produce una seroconversión.



Tratamiento y Profilaxis

El tratamiento convencional es sintomático, si bien en pacientes graves e inmunodeprimidos se puede considerar la posibilidad de administrar el cidofovir. En los pacientes hospitalizados con infección respiratoria se deben implantar medidas de aislamiento respiratorio y de contacto y están en estudio diferentes vacunas.



OBJETIVOS



El trabajo de la presente tesis consta de varios objetivos que se enumeran a continuación:

1.- Analizar mediante un estudio descriptivo las variables demográficas de la población sujeta a estudio dentro de la Comunidad autónoma de Castilla y León.

2.- Analizar de manera exhaustiva los resultados obtenidos de gripe y otros virus respiratorios mediante técnicas de detección de virus causantes de patología respiratoria.

3.- Exponer la temporalidad mensual y estacional tanto de la Gripe pandémica, estacional y de los otros virus respiratorios que se detectan.

4.- Describir las coinfecciones tanto dobles como triples que se presentan en el estudio.

5.- Comparar las diferentes variables asociadas en función de la detección de virus gripal o de otro virus respiratorio.

6.- Exponer el perfil analizado de los pacientes con Gripe u otro virus respiratorio procedentes del hospital Clínico Universitario de Valladolid.

7.- Realizar una descripción de los paneles de control de calidad enviados por la OMS durante el periodo de estudio en los que se realizó tipado y subtipado mediante técnicas moleculares de virus gripales.



MATERIAL Y MÉTODOS

1. MUESTRAS PROCESADAS

En el periodo de tiempo estudiado (1 de Mayo de 2009 al 31 de Mayo de 2011) se recibieron un total de 3895 muestras clínicas para detección molecular de gripe A pandémica, gripe estacional y otros virus respiratorios responsables de cuadros de infección viral de vía aérea alta y baja.

Dichas muestras corresponden a 3598 pacientes del área sanitaria de Castilla y León incluyendo la Red Centinela de Gripe.

En un principio, al inicio de la pandemia en 2009, los médicos peticionarios solicitaban la detección molecular de virus respiratorios enviando dos o más muestras de la vía aérea alta preferentemente (frotis nasal derecho e izquierdo, frotis nasal y frotis faríngeo). Al cabo de 2 meses, al comprobar la fiabilidad de los resultados y su concordancia, se constituía una alícuota de los productos que se nos remitían y se procesaba un sólo análisis. Si las muestras recibidas correspondían a vía aérea superior y a vía aérea inferior, no se realizaba la alícuota y se procesaban ambas.

El perfil de las diversas muestras recibidas se representa en la Tabla 1, en la que se exponen las diez modalidades recibidas de especímenes clínicos recibidos y procesados. La mayor proporción corresponde al frotis faríngeo seguido del frotis o aspirado nasofaríngeo.

**Tabla 9** .Tipos de muestra recibidos categorizados por orden de frecuencia.

TIPO DE MUESTRA	%
FROTIS FARÍNGEO	56.6
FROTIS NASOFARÍNGEO	20.2
ASPIRADO NASOFARÍNGEO	11.5
LAVADO NASOFARÍNGEO	4
LAVADO BRONCOALVEOLAR	1.6
BRONCOASPIRADO	0.9
ASPIRADO TRANSTRAQUEAL	0.6
MINI LAVADO BRONCOALVEOLAR	0.4
ESPUTO	0.1
OTRAS	4.1

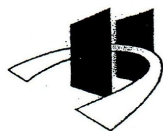


La recogida de las muestras para su procesamiento se realizó en el horario habitual del laboratorio, de 8:00 horas a 15:00 horas, por el personal que trabaja en la Recepción, y en el resto del día, depositaban las muestras en un frigorífico para tal efecto.

A partir del mes de Agosto de 2009, se instauró el horario de tarde con técnicos de laboratorio que seguían procesando las muestras debido a la carga asistencial que produjo la pandemia declarada, de 15:00 horas a 22:00 horas, con lo cual la recogida de muestras y empresas de transportes que venían de todas las provincias de Castilla y León, tuvieron ampliado el horario para entregar los productos y así asegurar la conservación de la muestra hasta su final proceso.

Este horario se mantuvo hasta el mes de Octubre de 2010. A partir de dicha fecha se instauró de nuevo el horario de mañana.

Una importante proporción de las muestras que se remitieron al laboratorio de microbiología vinieron con un volante y una ficha adjunta, que se muestra en la figura 4 y 6, con el fin de obtener el mayor número de datos demográficos y clínicos, de los pacientes estudiados aunque en ocasiones dicha información fue muy escasa, especialmente fuera del periodo pandémico.



HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO
Avda. Ramón y Cajal, 3
47005 - VALLADOLID



MICROBIOLOGIA

Dpto. de Microbiología e Inmunología

1.º Apellido: _____ 2.º Apellido: _____ Nombre: _____ Sexo (V/M): _____ Fecha de nacimiento /Edad: _____ Núm. H.º Clínica: _____ Ingresado en Planta: _____ Habitación: _____ Cama: _____ Observaciones: _____	NO ESCRIBIR EN ESTE RECUADRO
--	------------------------------

Servicio (Extrahospitalarios: Centro): _____ Doctor: _____ Firma: _____ Facultativos hospitalarios: número de identificación/ Facultativos extrahospitalarios: número de colegiado: _____
--

<p>BACTERIOLOGIA:</p> Sospecha diagnóstica: _____ Tratamiento antibiótico: _____ Muestra: _____ Marcar el análisis solicitado: <input checked="" type="checkbox"/> Primer análisis solicitado <input type="checkbox"/> Control (especificar): _____ <input type="checkbox"/> Cultivo de bacterias <input type="checkbox"/> Cultivo de hongos <input type="checkbox"/> Baciloscopia y cultivo de Micobacterias <input type="checkbox"/> Examen parasitológico Otros (especificar): _____ Observaciones: _____

<p>VIROLOGIA, SEROLOGIA:</p> Sospecha diagnóstica: _____ Tratamiento previo: _____ Muestra: _____ <input type="checkbox"/> Primer análisis solicitado <input type="checkbox"/> Control (especificar): _____ Aislamiento/Detención de: _____ Serología frente a: _____ Observaciones: _____

H.U.V. 4 - 5 - 44

RELLENAR CON MAYUSCULAS O LETRA DE IMPRENTA.
LOS VOLANTES ILEGIBLES O PARCIALMENTE CUMPLIMENTADOS SERAN RECHAZADOS.
IMPRESCINDIBLE CUMPLIMENTAR EL APARTADO SOSPECHA DIAGNOSTICA.
UTILIZAR UN VOLANTE PARA CADA MUESTRA.

Figura 4. Volante de petición de análisis microbiológico.

En la Figura 5 se muestra el medio de transporte para virus que se utilizó de manera mayoritaria. Fue el medio para virus “**Transport Médium**” *Vircell*® Microbiologists.

Este medio de transporte para virus, Chlamydia y Micoplasma evita el secado de la muestra, mejoran la viabilidad desde la recogida hasta su inoculación e inhiben el sobrecrecimiento bacteriano en muestras contaminadas. Contiene 2 mL de medio Hank’s BSS conteniendo HEPES, gelatina, BSA, sacarosa y antibióticos compatibles, así como dos escobillones de Rayón estériles.

El éxito del diagnóstico virológico depende en gran medida de la calidad de las muestras y de sus condiciones de transporte y almacenamiento antes de ser procesadas en el laboratorio.

Este producto es adecuado para procesar muestras por PCR y tiene marca CE.



Figura 5. Medio de Transporte para virus “**Transport Médium**” comercializado por *Vircell*® Microbiologists.

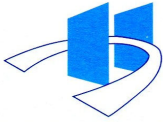
No obstante, algunas muestras eran remitidas a nuestro laboratorio con otro medio de transporte para virus de otra marca comercial. Fueron admitidas y procesadas igualmente, con el único requisito de estar contenidas en un medio de transporte compatible con las técnicas de detección molecular.



Todas las muestras recibidas, tras su recepción, se trasladaban a la Sección de Alertas y Gripe para comprobar su estado y características y se rellenaba una ficha, que se muestra en la Figura 6, con una serie de datos cruciales presentes en el volante peticionario que ayudaban a seguir con el proceso y a su interpretación de los resultados finales.

La ficha consta de datos de filiación del paciente y datos clínicos como factores de riesgo, ingreso en UVI, gestación, enfermedades concomitantes, etcétera..., médico peticionario y su procedencia, estado de la muestra en el momento de su recepción..., entre otros.

En la ficha está insertada una tabla donde se reflejan las técnicas que se practican para el diagnóstico, la fecha del momento del proceso, el resultado y el día de emisión del informe definitivo. Se completaba, inicialmente, por el personal de técnicos que recepcionaban la muestra y finalmente, tras la interpretación de los resultados, por el facultativo que emite el informe definitivo.



HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO
Avda. Ramón y Cajal, 3
Tfno. 983 42 00 00
47003 - VALLADOLID



FICHA DE RECOGIDA DE DATOS DE PACIENTES SOSPECHOSOS DE GRIPE

Nombre y Apellidos:

Nº de historia:

Edad:

Fecha y hora de recepción:

Procedencia:

Antecedentes:

Muestra recibida a través de:

Procedimiento ordinario(HCUV) Mensajero oficial Otras mensajerías

Incidencias en la muestra:

Tipos de Muestra:

	Marcar lo que corresponda	Nº de laboratorio de microbiología HCUV(pegar etiqueta)
Frotis nasal		
Frotis faríngeo		
Suero		
Plasma		
Otra(especificar)		

Fecha	Técnica	Resultado	Incidencias	Diagnóstico
	CDC <input type="checkbox"/>			
	Roche <input type="checkbox"/>			
	Luminex <input type="checkbox"/>			
	Otras (indicar) <input type="checkbox"/>			

Figura 6. Ficha de control de muestras para detección de gripe y otros virus respiratorios.



La procedencia de las muestras fue variada, siendo el propio Hospital Clínico de Valladolid y el Hospital Universitario Río Hortega de la misma ciudad los más usuarios de la petición, seguidos por todos los centros de salud de la ciudad y Hospital General Yagüe, Hospital Universitario de Salamanca y después, en menor medida, el resto de Hospitales de la Comunidad. Obtuvimos muestras de todos los Hospitales de la Comunidad Autónoma. La Red Centinela de Gripe también envió sus muestras, frotis faríngeos en la mayoría de los casos, y se procedió de la misma manera para la realización del diagnóstico.

Los centros de Salud que participaron, con el envío de muestras, y pertenecen a la vigilancia anual de la Gripe, se muestra en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Centros de Salud pertenecientes a la Red Centinela de Gripe de la comunidad de Castilla y León.

RELACION DE CENTROS DE LA RED CENTINELA DE CASTILLA Y LEON			
CENTRO	DIRECCIÓN	TELEFONO	FAX
C.S. Arévalo	Av.Emilio Romero, 28 Arévalo. 5200 Ávila	920300118	920302362
C.S. El Barco De Avila	C/Las eras, S/N El Barco de Ávila. 5600 Ávila	923430246	920341329
C.S. Sotillo de La Adrada	Pz.De la Concordia, S/N Sotillo de La Adrada.	918673109	918668126
C.S. Aranda Norte	C/Santiago, 7 Aranda de Duero. 9400 Burgos	947509494	947503032
C.S. Aranda de Duero Rural	C/Burgo de Osma, 53 Aranda de Duero. 9400 Burgos	947511453	847503308
C.S. Briviesca	C/Santa Ana al Rio, 36 Briviesca. 9240 Burgos	947592244	947590607
C.S. Sedano	C/Las eras, S/N Sedano. 9142 Burgos	947150038	947150087
C.S. Quincoces De Yuso	Br. De San Pedro, S/N Quincoces De Yuso. 9510 Burgos	947194232	947194159
Consultorio Medico Sasamon	C/Los Caballeros, 7 Sasamón. 9123 Burgos	947370032	947370032
C.S. Eras de Renueva	C/Abad Viñayo, S/N 24008 Leon	987245952	987237712
C.S. San Andrés del Rabanedo	C/Burbia, 23 San Andrés del Rabanedo. 24191	987228024	987223748
C.S. Santa María del Páramo	C/Prado Arriba, S/N Sta. María del Páramo. 24240 León	987360007	987360047



C.S. Trobajo del Camino	C/Buenaventura Durruti, 1 Trobajo del Camino.	987800802	987808044
C.S. Bembibre	C/Carvajal, 1 Bembibre. 24300 León	987510630	987513107
C.S. Ponferrada II	C/Pico Tuerto, S/N Ponferrada. 24400 León	987410250	987423990
C.S. Frómista	Cr. Santander, S/N Frómista. 34440 Palencia	979810065	
C.S. Palencia Rural	Av. San Telmo, S/N 34004 Palencia	979710361	
C.S. Saldaña	C/Vista Alegre, S/N Saldaña. 34100 Palencia	979890009	
C.S. Eras del Bosque	C/ Eras del Bosque, S/N 34003 Palencia	979752044	
C.S. Torquemada	Pz. De los bueyes, 13 Torquemada. 34230 Palencia	979800132	
Consultorio Médico Dueñas	C/Hoyo, S/N Dueñas. 34210 Palencia	979780281	
Consultorio Médico Boada	C/Mayor, 98 Boada. 37290 Salamanca	923440801	923440286
C.S. Garrido Sur	Av. Comuneros, 27-31, 1ª Planta 37003 Salamanca	923126593	923255548
C.S. Linares de Riofrio	C/De Guijuelo, S/N Linares de Riofrio. 37760 Salamanca	923416287	923416170
C.S. Villares de la Reina	C/La Fuente, 27 Villares de la Reina.37184	923122280	923124985
C.S. Peñaranda de Bracamonte	Av. De Los Jardines, S/N Peñaranda de Bracamonte. 37300	923541600	923540011
C.S. Vitigudino	C/Alameda, 2 Vitigudino. 37210 Salamanca	923501151	923500478
C.S. Cantalejo	Cr.Sepúlveda, 54 Cantalejo. 40320 Segovia	921520085	921520496



C.S. Carbonero El Mayor	Cr. Bernardos, 8 Carbonero El Mayor. 40270 Segovia	921562158	921561023
C.S. Riaza	Pz. María Hernando, 1 Riaza. 40500 Segovia	921550238	921550256
C.S. Segovia III	C/Vía Roma, S/N 40003 Segovia	921413327	921413995
C.S. Agreda	C/Venerable, 85 Agreda. 42100 Soria	976646869	976647225
C.S. Gómara	Cr. Almazán, S/N Gómara. 42120 Soria	975380295	975380248
C.S. Soria Sur	C/Nicolás Rabal, 19 Soria. 42003 Soria	975221299	975233072
C. S. Tordesillas	Cr. De Valladolid, S/N Tordesillas. 47100 Valladolid	983771038	983771812
C.S. Medina de Rioseco	Pz De La Constitucion, S/N Medina de Rioseco.	983700511	983700517
Consultorio Médico Simancas	C/Calzada, S/N Simancas. 47130 Valladolid	983591785	983350974
C.S. Delicias I	Pº. Juan Carlos I, 18 47013 Valladolid	983228311	983228316
C.S. Plaza Circular	C/Doctor Montero, 2 47005 Valladolid	983212620	983212960
C.S. Parada del Molino	C/Parada del Molino, 2 49026 Zamora	980511411	980518793
C.S. Tera	C/Carretera, 72 Camarzana de Tera. 49332 Zamora	980649038	980649038
C.S. La Guareña	C/Arrabal de San Pedro, S/N Fuentesaúco. 49400	980601108	980600908
C.S. Zamora Sur	C/Santa Teresa, 26 49011 Zamora	980510761	980510761



Durante el periodo de tiempo estudiado, también recibimos en cuatro ocasiones, controles de Gripe enviados por la Organización Mundial de la Salud, en las fechas siguientes: Junio de 2009, Diciembre de 2009, Junio de 2010 y Diciembre de 2010.

Estos controles enviados por la OMS, al ser Valladolid Centro Nacional de Gripe, constan de 10 muestras que contienen ARN de virus de la Gripe inactivadas mediante rayos y que se reciben liofilizadas para ser reconstituidas con un buffer incluido en el kit de envío. En dichas muestras se solicita el tipado y subtipado de cada una de ellas en caso de ser positiva para virus gripal. En alguna ocasión también se reciben 2 muestras más en las que se solicita reconstitución con buffer y extracción de material genético previo al tipado y subtipado.



2.- TÉCNICAS UTILIZADAS:

Para el diagnóstico molecular de todas las muestras respiratorias recibidas durante este período de tiempo se utilizaron de manera preliminar 2 técnicas moleculares:

1.- *XTAG Respiratory Viral Panel Fast (Luminex Molecular Diagnostics Abbott®)*.

2.- *Real Time – PCR Detection of Influenza A H1N1 Swine (Roche ®)*.

En muestras donde el resultado era confuso o no concluyente para Gripe A H1n1 pdm, se utilizó otra técnica molecular de soporte, *Real Time PCR System Applied Biosystems* , aprobado por CDC.

En los controles de la OMS, que se recibieron durante el periodo de tiempo de estudio, además de estas tres técnicas mencionadas, se utilizó otra técnica basada en Microarrays de baja densidad comercializada por *Clondiag®*.



3.- DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS:

3.1. XTAG Respiratory Viral Panel Fast (Luminex Molecular Diagnostics Abbott®).

XTAG® Respiratory Viral Panel Fast (RVP FAST) es una prueba multiplex cualitativa de ácido nucleico destinada a la detección e identificación simultáneas de varios ácidos nucleicos de virus respiratorios en frotis nasofaríngeos, aspirados nasales y lavados broncoalveolares en individuos con posible infección de tracto respiratorio.. La detección e identificación de ácidos nucleicos virales específicos en individuos que presentan signos y síntomas de infección respiratoria ayudan a diagnosticar infecciones virales si se utilizan junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio. Los tipos y subtipos de virus detectados por RVP FAST se enumeran en la tabla 11 a continuación.

Tabla 11. Virus respiratorios detectados por RVP FAST.

Virus	Tipo/Subtipo
Gripe A	H1
	H3
Gripe B	
Virus respiratorio sincitial	
Coronavirus	229E
	OC43
	NL63
	HKU1
Virus de la Parainfluenza	Parainfluenza1
	Parainfluenza2
	Parainfluenza3
	Parainfluenza4
Matapneumovirus humano	
Enterovirus/rinovirus	
Adenovirus	
Bocavirus humano	



3.1.1 Descripción del método de RVP FAST:

La tecnología del Luminex 200 se basa en la fluorimetría de flujo de la célula con innovaciones desarrolladas por Luminex. La hidráulica, la robótica, la óptica, el control de la temperatura, el software y las microesferas xMAP® trabajan en conjunto para permitir el análisis simultáneo de hasta 100 analitos en una muestra de prueba única.

RVP FAST incorpora en la plataforma Luminex® la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (PCR-TI) múltiplex junto con el sistema clasificación por “tags” universal de propiedad exclusiva de Luminex. El análisis incluye también un control interno (fago MS2 de *E. coli*) que se añade a cada muestra antes de la extracción y un control de procedimiento (ADN del bacteriófago lambda) que se añade como reacción PCR-TI en cada procedimiento.

En cada muestra, se utilizan 10 µl del extracto viral (ARN o ADN) en una única PCR-TI múltiplex. Cada virus, subtipo o control interno de la muestra da como resultado amplímeros de PCR (que oscilan entre 58 y 206 pb, sin incluir el “tag” de 24 segmentos).

A continuación se añade una alícuota de 2 µl del producto de la PCR-TI a una reacción de hibridación/detección que contiene la matriz universal y el conjugado de estreptavidina/R-ficoeritrina. Cada población de microesferas de Luminex detecta un objetivo viral o control de análisis específico mediante una hibridación anti-tag/tag específica. Después de la incubación de los productos de PCR-TI con la mezcla de microesferas, el instrumento Luminex ordena y lee las reacciones de hibridación/detección. Se genera una señal (de intensidad de



Fluorescencia media o MFI) para cada población de microesferas. Estos valores de fluorescencia se analizan para determinar la presencia o ausencia de objetivos virales y/o controles en cada muestra.

Con una única reacción múltiple se identifican todos los virus. El xTAG Data Analysis Software para RVP FAST (TDAS RVP FAST) analiza los datos para poder proporcionar un informe que resuma los virus presentes.

3.1.2 Reactivos suministrados con el equipo:

A continuación, en la Tabla 12 se exponen los reactivos que se suministran con el equipo.

**Tabla 12.** Reactivos suministrados con el equipo.

Reactivo	Volumen para 96 pruebas	Condiciones de aislamiento
Mezcla base para xTAG RVP FAST	192 μ l x 1 ampolla	Almacenar a una temperatura de entre -25 y -15° C. tras la recepción.
Mezcla de enzimas OneStep para xTAG	57 μ l x 3 ampollas	
Tampón OneStep para xTAG,	1.0 mL x 1	
Mezcla de dNTP para xTAG	200 μ l x 1	
Agua libre de RNasa para	1,9 mL x 1	
Mezcla de microesferas para xTAG RVP FAST	1.92 mL x 1 ampolla	Almacenar a una temperatura de entre -25 y -15 protegida de la luz tras la recepción. Almacenar a una temperatura de entre 2 y 8° C. protegida de la luz tras el primer uso.
Tampón informante para xTAG	12.0 mL x 1 ampolla	Almacenar a una temperatura de entre -25 y -15 tras la recepción. Almacenar a una temperatura de entre 2 y 8° C. tras el primer uso.
Estreptavidina/R-ficoeritrina G15 (SAPE) para xTAG	120 μ l x 1 ampolla	Almacenar a una temperatura de entre -25 y -15 protegida de la luz tras la recepción.
MS2 para xTAG	1,5 mL x 2 ampollas	Almacenar a una temperatura de entre -25 y -15 tras la recepción.
ADN del bacteriófago lambda para xTAG	200 μ l x 1 ampolla	



Advertencias y precauciones para el diagnóstico de Gripe A(*Luminex RVPfast*):

Gripe de tipo A y B: Los virus de la gripe causan cada año epidemias que afectan a entre un 5 y 15% de la población durante los meses de invierno. Pertenecen a la familia de los *ortomixoviridae* y son pequeñas partículas envueltas que incluyen un genoma de ARN de cadena negativa. Las cepas de la gripe A y B sufren variaciones genéticas, que crean distintas cepas que pueden afectar a toda o una parte de la población humana. La Gripe de tipo A suele ser una infección más grave que la del tipo B y las cepas H3N2 tienen un mayor índice de mortalidad. Los virus de la gripe A tienen dos subtipos especialmente importantes para infecciones en humanos: H3N2 y H1N1. Recientemente, otro subtipo de virus de la gripe se ha vuelto muy importante para los seres humanos: H5N1 aviar. Desde 1997, esta cepa que afectaba antes solo a las aves, ha infectado a alguna persona que ha estado en contacto con aves infectadas. La gripe aviar puede ser clínicamente muy grave. En 2009, se identificó una cepa nueva de la gripe A, H1N1. Desde el 6 de julio de 2009 se ha identificado un total de 94.512 casos confirmados y sospechosos de infección por gripe H1N1 en humanos en todo el mundo. A parte de dichos casos, se han confirmado 429 muertes. Hay un informe semanal de vigilancia de la gripe disponible <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/updates/en/index.html>⁸⁸.

Gripe no clasificable en tipo (es decir, se detecta un gen matriz de la gripe A), distinto al subtipo H1 y H3: Si RVP FAST identifica positivamente el objetivo del gen matriz de la gripe A, pero no identifica ningún objetivo del gen hemaglutinina, vuelva a analizar la muestra con RVP FAST empezando por la fase de extracción con controles externos de esos dos analitos. Realice la extracción de muestras por duplicado. Si la nueva prueba no da resultados positivos de H1 o H3 en ninguna de las dos réplicas y los controles externos se



han introducido correctamente, pónganse en contacto con las autoridades sanitarias adecuadas para determinar si la muestra de la gripe A no clasificable en tipo representa una nueva cepa de la gripe A.

3.1.3 Preparación de la muestra:

Se deben de tomar precauciones estándar con respecto a la recogida, manipulación y almacenamiento de muestras antes de la extracción (consulte la edición más reciente de la directriz MM13 de CLSI y Farkas *et al.* 1996⁸⁹). Las muestras del paciente y los controles externos se deben extraer con un método validado.

Las muestras clínicas se pueden almacenar a temperaturas de entre 2 y 8^a C hasta 7 días después de la recogida en un medio de transporte universal (se recomiendan 3 mL o equivalente. Si la muestra no se va a analizar en los 7 días posteriores a la recogida, se debe almacenar congelada a una temperatura de -80^a C. Se añade 20 µl de MS2 para xTAG (control interno) a 200 µl de la muestra del paciente. Se extrae la muestra con MS2 añadido de acuerdo con el folleto del método de extracción y se diluye el material de ácido nucleico en 55 µl. Las extracciones se deben almacenar a una temperatura de -80^a C durante seis meses o hasta realizar el análisis con RVP FAST.

3.1.4 Procedimiento de análisis

Se recomienda que el procedimiento de análisis, desde la configuración de la PCR-TI hasta la adquisición de datos, se realice durante un plazo de 48 horas.



PCR-TI múltiplex

Nota: Se realizará la configuración de PCR-TI en un área previa a la PCR. Se agita y se mezcla cualquier precipitado visible (incluidas las escamas transparentes) en el tampón OneStep para disolverlo completamente antes de usarlo. Durante la configuración, se mantiene la mezcla principal y las muestras sobre hielo o un bloque frío. Se precalienta el termociclador a 50° C.

El siguiente procedimiento es para una única reacción PCR-TI. Modifíquelo para analizar hasta 96 muestras multiplicando los volúmenes por el número de muestras. Se debe incluir como mínimo un control negativo (el último tubo) en cada configuración de PCR-TI.

1. Se descongela y se lleva a temperatura ambiente la mezcla base para xTAG RVP FAST, el tampón OneStep para xTAG 5X, la mezcla de dNTP para xTAG y el agua libre de RNasa. Se agitan los tubos durante 2-5 segundos para mezclar los reactivos y se centrifugan durante 2-5 segundos para que los reactivos se asienten en el fondo.
2. Se retira la mezcla de enzimas OneStep para xTAG del congelador cuando este listo para usarla y se devuelve al congelador inmediatamente después de usarla. Se mezcla invirtiendo y girando el tubo y se centrifuga durante 2-5 segundos para que los reactivos se asienten en el fondo.
3. Se etiqueta con el número adecuado de los tubos PCR de 0,2 mL. Se incluye un tubo para cada control de procedimiento (ADN de lambda) y como mínimo un tubo para el control negativo (agua). Se colocan los tubos en un soporte para refrigerador de PCR.
4. Se etiqueta un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL como MM. Se añaden los reactivos en el siguiente orden.

**Tabla 13.** Reactivos necesarios para PCR-TI de RVP-FAST de Luminex®.

Reactivo	Volumen para 1 reacción
Agua libre de RNasa para xTAG	1,3 µL
Tampón OneStep para xTAG, 5X	4,0 µL
Mezcla de dNTP para xTAG	1,1 µL
Mezcla base para xTAG RVP FAST	2,0 µL
Mezcla de enzimas OneStep para xTAG	1,6 µL
Volumen total	10,0 µL

5. Se agita la mezcla principal de PCR-TI durante 2-5 segundos para mezclar los reactivos y se centrifugan durante 2-5 segundos para que se asienten en el fondo.
6. Se añade una parte alícuota de 10 µL de la mezcla principal de PCR-TI en cada tubo de PCR de 0,2 mL etiquetado (en el soporte para refrigerador de PCR).
7. Se añade a cada tubo 10 µL de la muestra de ácido nucleico o ADN de fago lambda extraído. Se tapa el tubo inmediatamente después de añadir la muestra.
8. Para controles negativos de PCR-TI, se añade al tubo 10 µL de agua libre de RNasa. El último tubo debe ser un control negativo.
9. Se agitan los tubos durante 2-5 segundos para mezclar los reactivos y se centrifugan durante 2-5 segundos para que se asienten en el fondo.
10. Se los tubos en un termociclador precalentado (50° C.) y realice ciclos en las siguientes condiciones:



- Establezca la temperatura del termociclador como temperatura BLOCK (de bloque) con capa térmica activada.
- Precaliente el termociclador a 50° C.

Tabla 14. Procedimiento para PCR de RVP-FAST de Luminex®.

1 ciclo →	1 ciclo →	34 ciclos →	1 ciclo →	Fin
50° C	95° C	95° C - 30 seg	72° C	4° C
20 min	15 min	59° C - 30 seg	2 min	ESPERA
		72° C - 30 seg		
Velocidades recomendadas de acceso al termociclador:			ABI: ajuste 9600	
			Bio-Rad DNAEngine (MJ PTC 200): 2° C/seg	
			MJ PTC100: (velocidades de acceso predeterminadas)	
			Eppendorf: 20% de velocidad de acceso (1,2° C/seg)	

11. Almacene los tubos de PCR-TI hasta 48 horas a una temperatura de entre 2 y 8° C hasta que esté listo para utilizarla.

3.1.5 Hibridación/detección de microesferas

Nota: Antes de la reacción de hibridación, encienda el sistema Luminex y prepare el instrumento para leer las muestras según se indica en el manual del usuario de Luminex. Realice la hibridación de microesferas en el área posterior a PCR. Limite la exposición a la luz de las microesferas e informante durante la configuración de la reacción. Precaliente el termociclador a 45° C durante la fase de hibridación/detección de 20 minutos. No desnaturalice los productos de PCR-TI antes de la fase de hibridación/detección. Establezca la temperatura



del bloque calentador XYP en 40° C. 10 minutos antes del final de la fase de hibridación/detección.

1. Descongele y lleve a la temperatura ambiente la mezcla de microesferas para xTAG RVP FAST y el tampón informante para xTAG.
2. Agite el conjugado estreptavidina/R-ficoeritrina G15 (SAPE) para xTAG durante 2-5 segundos. Diluya SAPE 75 veces junto con el tampón informante para xTAG en un tubo de vidrio borosilicato o de polipropileno. Cada muestra requiere 75 µL de solución informante diluida. El cálculo de volúmenes por reacción (incluidos los excesos) para la reacción de hibridación se proporciona a continuación. Al preparar las diluciones, mida los volúmenes con precisión:

Tabla 15. Volúmenes de tampón informante y SAPE en función del número de muestras para RVP-FAST de Luminex®.

Número de reacciones de hibridación	Volúmen del tampón informante para xTAG (mL)	Volumen de SAPE (µL)
24	2,22	30
48	4,44	60
96	8,88	120

Tape el tubo con Parafilm y remuévalo durante 10 segundos para mezclarlo. Protéjalo de la luz hasta que esté listo para usarlo.

3. Etiquete los pozos de la reacción de hibridación/detección (córtelos de una placa de microtitulación de 96 pozos de Costar).



4. Agite el tubo con la mezcla de microesferas para xTAG RVP FAST durante 10 segundos y sométalo a ultrasonido durante 10 segundos para dispersar las microesferas. Repita el procedimiento.
5. Añada una parte alícuota de 20 μL de la mezcla de microesferas para xTAG a cada pozo.
6. Agítense los tubos con los productos de PCR-TI (consulte la sección 11.1) durante 2-5 segundos y centrifúgelos durante 2-5 segundos para que los reactivos se asienten en el fondo.
7. Añada una parte alícuota de 2 μL del producto de la PCR-TI a los pozos adecuados, a los que antes ha añadido la mezcla de microesferas. Pipetee arriba y abajo el líquido de 2 a 3 veces para mezclar la muestra (evite la contaminación cruzada entre pozos).
8. Transfiera la solución informante a la cubeta de depósito y con una pipeta de 8 canales, añada 75 μL de la solución informante a cada pozo. Pipetee arriba y abajo con cuidado el líquido de 5 veces (evite la contaminación cruzada entre pozos).
9. Tape los pozos con Microseal.
10. Coloque los tubos en un termociclador precalentado a 45° C durante 20 minutos.

3.1.6 Preparación del instrumento Luminex y adquisición de datos.

1. Antes de la fase de hibridación, siga los procedimientos diarios de inicio y mantenimiento incluidos en el manual de usuario de Luminex. Realice una fase de limpieza. Asegúrese de que el bloque calentador XYP se ha calentado a 40 °C, como mínimo 10 minutos antes del final de la hibridación/detección.



2. Ajuste la altura vertical del brazo de muestreo para leer las muestras de una placa Costar. Utilice para ello, una placa Costar vacía con una esfera de alineación.
3. Cree un lote nuevo haciendo clic en **New Batch** (Nuevo lote).
4. Rellene la información del lote, introduzca la información del paciente incluyendo el número de muestra.
5. Tras 20 minutos de incubación, coloque la placa en el soporte de placa y retráigala, pulse **Star Plate**.
6. Una vez finalizada la lectura, limpie el sistema Luminex.

3.1.7 Análisis de datos

Para realizar el análisis de los datos es necesaria la instalación de TDAS RVP FAST que viene adjunto con el manual de usuario que incluye el CD. En éste manual de usuario de TDAS RVP FAST se describe cómo utilizar el software.

3.1.8 Interpretación de los resultados

Cada muestra incluye una columna individual para cada objetivo viral, el control interno (bacteriófago MS2) y el control de procedimiento (bacteriófago lambda).

Dianas de objetivos virales (excepto gripe A):

- 1.- **POS**: se ha detectado objetivo viral.
- 2.- **NEG**: no se ha detectado el objetivo viral.



3.- **No Call** (sin dianas): hay un fallo en uno o más parámetros/controles del análisis.

Dianas de Gripe A:

1.- **H1 D**: se ha detectado el subtipo H1 de la Gripe A (estacional).

2.- **H3 D**: se ha detectado el subtipo H3 de la Gripe A.

3.- **H1, H3 D**: se han detectado los subtipos H1 (H1 estacional) y H3 (H3 estacional) de la Gripe A.

4.- **Ut D** (No clasificable en subtipo): se ha detectado un virus de la Gripe A de subtipo no clasificable (p. ej., H5N1, o H1N1pdm).

5.- **NEG**: no se ha detectado el objetivo viral.

6.- **No Call** (sin dianas): hay un fallo en uno o más parámetros/controles del análisis.

Dianas de control (control interno y de procedimiento)

1.- **PRES**: se ha detectado el control interno/de procedimiento recomendado.

2.- **ABS** (Ausente): no se ha detectado el control interno/de procedimiento recomendado.

3.- **No Call** (sin dianas): No se ha podido determinar la presencia o ausencia del control interno/de procedimiento debido a que no se ha cumplido algún criterio específico del análisis.



3.2 - Real Time – PCR Detection of Influenza A H1N1 Swine (Roche®).

3.2.1.- Introducción del método:

Este Kit comercializado por Roche® permite detectar gripe A H1N1pdm; su uso fue destinado en 2009 para detectar el nuevo subtipo que creó la pandemia.

En Abril de 2009, un nuevo virus A H1N1 fué reportado desde las autoridades de Méjico. La gripe A H1N1 pdm tenía un gen de la neuraminidasa muy similar al subtipo H5N1, en cambio, tenía un gen de Hemaglutinina muy específico que podía ser usado para la identificación. La Retrotranscripción (RT) y posterior reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de gripe A está basada en la conservada secuencia genética de la proteína de la matriz viral M2, y el subtipo H1 pdm está basado en la detección de la secuencia de la Hemaglutinina específica H1.

Los virólogos (Pannig *et al.* 2009)⁹⁰ que han trabajado en este kit han diseñado los cebadores (primers) y la mezcla de sondas necesaria para la detección del ARN viral de este subtipo de gripe en muestras clínicas, ha sido recomendado por el Instituto Robert Koch en Berlín, Alemania (Mayo de 2009).

El número de test que se puede hacer con este Kit es 100, con un volumen final de reacción de 20 µl para ser usado en el termociclador LightCycler® 480 o 2.0.

3.2.2.- Contenido del Kit:

3.2.2.1 Vial de tapón **azul**: Mezcla de cebador y sonda para Gripe A (M2). Vial liofilizado que contiene 1 nmol de cebador junto con 0.5 nmol de sonda-FAM disuelto en 300µ de Tris-HCl para una concentración final de 3.33 µM de cebador y 1.67 µM de sonda.

3.2.2.2 Vial de tapón **amarillo**: Mezcla de cebador y sonda de ácido nucleico humano. Control de Extracción. Se trata de un vial liofilizado que contiene



1nmol de cebador y 0.5 nmol de sonda como control de extracción disuelto en 300µl de Tris-HCl para conseguir una concentración final de 3.33µ de cebador y 1.67µde sonda.

3.2.2.3 Vial de tapón azul: Control de gripe A/M2: Un vial liofilizado disuelto en 400µL de Tris-HCl que contiene 8×10^5 copias de gen M2 para utilizarse como control positivo.

3.2.2.4 Vial de tapón rojo: Mezcla de cebador y sonda para Gripe A(H1). Vial liofilizado que contiene 1 nmol de cebador junto con 0.5 nmol de sonda-FAM disuelto en 300µ de Tris-HCl para una concentración final de 3.33 µM de cebador y 1.67 µM de sonda.

3.2.2.5 Vial de tapón rojo: Control de gripe A/H1: Un vial liofilizado disuelto en 400µL de Tris-HCL que contiene 8×10^5 copias de gen M2 para utilizarse como control positivo.

3.2.2.6 Vial de tapón transparente: Agua de PCR. El kit contiene dos viales de 1 mL cada uno.

3.2.2.7 Vial de tapón blanco: Tris-HCl, este disolvente presenta un pH de 8.0 y se utiliza para reconstituir la mezcla de cebadores y sondas y los controles. El kit contiene 2 viales de 1 mL cada uno.

3.2.3.- Conservación y estabilidad:

El kit es estable entre +15°C y +25°C pero debe guardarse entre +2°C y +8°C en la oscuridad.

Una vez reconstituidas los cebadores y las sondas deben de conservarse a -20°C realizando pequeñas alícuotas para evitar excesivas descongelaciones/congelaciones y poner en peligro su utilidad.

Es necesario precalentar cebadores y sondas durante 10 minutos a 85°C y posteriormente introducir en hielo para su correcto funcionamiento.



3.2.4 Equipos o reactivos adicionales requeridos:

- Laboratorio equipado.
- Puntas de pipeta libres de RNAsas.
- Tubos de microcentrifuga de 1.5 mL para la preparación de la Master mix y diluciones.
- Cambio de guantes en cada paso.
- Para PCR: Sistema de PCR a tiempo real como el *LighCycler*® 2.0 utilizado en nuestro caso. Capilares y tapones de los mismos para utilizar en este soporte.
- Para realizar la retrotranscripción-PCR en un solo paso se utiliza otro Kit adicional: *Real Time ready RNA Virus Master* comercializado también por Roche®.

3.2.5 Procedimiento

Para la identificación y detección correcta de la muestra y una extracción del material genético adecuada, el Kit incluye una sonda/cebador adicional que puede usarse en el mismo ensayo; de esta forma, permite detectar simultáneamente el ácido nucleico de la muestra a analizar junto con el control de extracción.

El procedimiento que se siguió fue la RT-PCR en un sólo paso en el que se consigue una cantidad de 20 µl de reacción para su posterior introducción en capilares y utilización del Sistema LightCycler 2.0 de Roche®.

3.2.5.1 Descongele los viales 1a al 4 que corresponden con los controles de proteína matriz de gripe A, Hemaglutinina H1(2009) y control de extracción, además se deben descongelar también los 3 viales del Kit *Real Time ready RNA Virus Master* que se corresponden con Enzyme Blend, Reaction Buffer y Water PCR Grade.



3.2.5.2 Ponga sus muestras en hielo. Prepare la RT-PCR máster mix como se indica en el protocolo siguiente y póngalo también en hielo.

3.2.5.3 Dispense la mezcla y la máster mix realizada anteriormente en los capilares preparados para el instrumento LightCycler 2.0. Siempre empiece por el control negativo, seguido de las muestras problema y, por último, dispense el control positivo al final.

3.2.5.4 Cierre cada capilar con su tapón correspondiente nada más pipetear la máster mix y su muestra.

3.2.5.5 Mantenga, mientras realiza todo el proceso, los capilares en un termobloque frío. Inserte los capilares en unos adaptadores para realizar una rápida centrifugación (aproximadamente 5 segundos) a más de 3.000 r.p.m y coloque a continuación los capilares en el carrusel del equipo ordenados en sus posiciones.

3.2.5.6 Empiece el programa de PCR.

PREPARACIÓN DE LA RT-PCR MASTER MIX

En un tubo de reacción de 1.5 mL prepare la RT-PCR máster mix en el orden de la tabla siguiente y mezcle vigorosamente pipeteando arriba y abajo.

**Tabla 16:** Preparación de RT-PCR master mix.

COMPONENTES	Inf A/M2 + Control de extracción	Inf A/H1
Enzyme Blend 50x (<i>Real Time ready RNA Virus Master/vial1</i>)	0.4 µL	0.4 µL
Reaction buffer 5x (<i>Real Time ready RNA Virus Master/vial2</i>)	4.0 µL	4.0 µL
Preheated Primer/Probe Mix Inf A/M2 (vial 1a)	3.0 µL	-
Preheated Primer/Probe Mix/ Human NA Extracion Control (vial 1b)	3.0 µL	-
Preheated Primer/Probe Mix / Inf A/H1 (vial 3)	-	3.0 µL
Water PCR Grade	4.6 µL	7.6 µL
Precooled Viral RNA Sample or Positive Control or Negative Control	5.0 µL	5.0 µL
Total Volumen	20.0 µL	20.0 µL

Prepare la mezcla calculando para 1 reacción más multiplicando cada volumen por el número de reacciones.



Esta RT-PCR Master mix puede ser usada para todos los soportes de LigtCycler de Roche®.

PROTOCOLO DE RT-PCR PARA EL INSTRUMENTO LIGHTCYCLER 2.0 DE ROCHE®.

Este protocolo de RealTime PCR utiliza los siguientes programas:

- 1.- Transcripción reversa del RNA viral.
- 2.- Desnaturalización inicial de cDNA/RNA hibridado.
- 3.- Amplificación del cDNA.
- 4.- Enfriamiento del carrusel en el termobloque.

En la siguiente tabla se muestran los parámetros que deben ser programados en el LightCycler 2.0 para hacer la RealTime PCR.

Tabla 17: Protocolo de RT-PCR.

Analysis mode	Cycles	Segment	Target (C°)	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (C°/s)	Acquisition mode
Reverse transcription	1	-	58	0:08:00	20	none
none						
Initial desnaturation	1	-	95	0:00:30	20	none
none						
Amplification						
quantification	45	Desnat.	95	0:00:01	20	None
		Annealing	60	0:00:20	20	Single
		extension	72	0:00:01	2	none
Cooling						
none	1	-	40	0:00:30	20	none

3.2.6 Interpretación de los resultados



En la siguiente tabla se muestran los canales de longitud de onda a la que realiza la interpretación en el instrumento LightCycler 2.0 de Roche®.

Tabla 18: Canales para la adquisición de datos.

System	LightCycler 2.0 Instrument
Channel for Inf A/M2	530
Channel for extraction control (Internal control)	560
Channel for inf A/H1	530

3.2.6.1 Control Negativo: El resultado del control negativo debe ser siempre negativo medido en el canal indicado para inf A/M2 y para Inf A/H1. Si el resultado es positivo, todos los resultados de las muestras ensayadas en esa reacción deben ser anuladas por la potencial contaminación de los reactivos. En este caso, un resultado positivo obligaría a repetir el ensayo con una Master mix de RT-PCR realizada de nuevo.

3.2.6.2 Control Positivo: El resultado del control positivo medido en su canal apropiado de inf A/M2 y Inf A/H1 debe ser siempre positivo. Si el resultado es negativo, debe realizarse una nueva RT-PCR e invalidar todos los resultados de las muestras ensayadas.

3.2.6.3 Resultados de las muestras problema: Chequee los resultados de los controles de ese ensayo e interprete los resultados de las muestras como se muestra en la tabla 19.

**Tabla 19:** Interpretación de los datos utilizando el Control de Extracción.

Inf A/M2	Control de Extracción (Control Interno)	Inf A/H1	Resultado
Positivo	Positivo	Positivo	Gripe A Positivo Pandémica (H1N1)2009 Positivo
Positivo	Positivo	Negativo	Gripe A positivo Pandémica (H1N1)2009 Negativo
Positivo	Negativo	Positivo	Gripe A Positivo Pandémica (H1N1)2009 Positivo
Positivo	Negativo	Negativo	Gripe A Positivo Pandémica (H1N1)2009 Negativo
Negativo	Positivo	Positivo	No valorable
Negativo	Positivo	Negativo	Gripe A negativo Pandémica (H1N1)2009 Negativo
Negativo	Negativo	Positivo	No valorable
Negativo	Negativo	Negativo	No valorable



3.2.6.4 Control interno: Si los resultados son negativos para Inf A/M2, el control de extracción en el canal 560 debe ser positivo para confirmarr que la reacción de RT-PCR no ha sido inhibida. Si una muestra es positiva en el canal de Inf A/M2 con un alto contenido en RNA puede competir con su propio control interno y resultar negativo.



3.3 RT-PCR PARA GRIPE A H1N1 2009 APROBADA POR LOS CDC, *Real Time PCR System Applied Biosystems.*

Como se comentó al inicio de este capítulo, las dos técnicas previas se utilizaron para la detección de gripe y de otros virus respiratorios de manera rutinaria en todas las muestras, ésta otra técnica de detección de gripe A solamente se utilizó en algún caso aislado ante un resultado discordante entre las técnicas previas para afianzar nuestro diagnóstico.

El protocolo de Applied-Biosystems por RT-PCR en real-time para la detección de gripe A/H1N1 incluyen un panel de *primers* y sondas basadas en el diseño que publicó el CDC en la página web de la OMS el día 28 de Abril de 2009 y revisado el 30 de Abril del mismo año: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimptpcr/en/index.html>⁹¹.

Las secuencias de los *primers* fueron idénticas a las diseñadas por el CDC. Las sondas TaqMan® estaban diseñadas de acuerdo al CDC y marcadas con 6-Carboxifluoresceína (FAM).

Los ensayos se diseñaron para la detección cualitativa de los virus de la gripe A/H1N1 2009.

Esta técnica está basada en la realización de una retrotranscripción previa para convertir el RNA viral en cDNA y posteriormente amplificar el material genético mediante 4 PCR diferentes dependiendo de su secuencia diana. Se utilizan en una misma Real-Time PCR, 4 reacciones que permiten detectar si el material genético es compatible con gripe A, gripe A de origen porcino, Hemaglutinina H1 específica de gripe A porcina (H1N1) y finalmente una reacción que se utiliza como control de procedimiento frente al gen humano RNasa P.

3.3.1 Formato de sondas:



3.3.1.1 **TaqMan® Influenza A MGB Assay (Set 1) (50X)** está diseñado para detectar los virus de la gripe A.

3.3.1.2 **TaqMan® H1N1 Influenza A MGB Assay (Set 2) (50X)** está diseñada para detectar específicamente los virus de la gripe porcina A (H1N1 2009).

3.3.1.3 **TaqMan® H1N1 Influenza A Subtype H1 MGB Assay (Set 3) (50X)** está diseñada para detectar el subtipo H1 de los virus de gripe A porcina (H1N1).

3.3.1.4 **TaqMan® RnaseP MGB Assay (Set 4)(50X)** corresponde a sondas que amplifican el gen humano RNasa P y sirve como control positivo para la presencia de ácidos nucleicos.

3.3.2 Instrumento de PCR a tiempo real recomendado:

7500 fast para uso exclusivo de investigación de Applied Biosystems.

3.3.3 Reactivos RT-PCR de un paso recomendados:

Para la realización de los ensayos, se recomiendan utilizar los siguientes kits comerciales:

3.3.3.1 Invitrogen SuperScript™ III Platinum One-Step Quantitative Kit.

3.3.3.2 RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System.

3.3.3.3 AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents.

3.3.4 Procedimiento:

Se utiliza el kit recomendado con los siguientes volúmenes

**Tabla 20.** Volúmenes utilizados para el kit de RT-PCR

REACTIVO	VOLUMEN POR REACCIÓN
dH ₂ O	n X 8 µL
Assay Mix	n X 0.5 µL
Enzyme Mix	n X 1 µL
2 X PCR Master Mix	n X 12.5 µL
Volumen total Mix	22 µL

NOTA:

n = número de muestras en el ensayo. Calcular el mix n + 1 en el caso de ensayos de hasta 10 muestras y para ensayos de más de 10 muestras, calcular n + 2.

Dispensar los 22µL de mix en los pocillos de las placas y añadir a cada uno 3µL de muestra de RNA. Para el caso de los controles negativos, añadir 3µL de agua de PCR (dH₂O).

Programa de termociclador:

Tabla 21. Programación del termociclador para la realización de la técnica.

Reverse Transcription	HOLD	50° C 30 minutos
Activación	HOLD	95° C 10 minutos
PCR amplificación	45 ciclos	95° C 15 sec
		55° C 30 sec

La colección de datos de fluorescencia se produce al final del paso de extensión de 55°C.



3.4. ARRAY VIRUS INFLUENZA A (CLONDIAG®).

3.4.1 Fundamento de la técnica:

Este kit es útil para la identificación de diferentes subtipos de Influenza A en base al tipo de Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA).

Para poder realizar la técnica, se extrae el contenido de RNA del virus y se realiza una retrotranscripción para obtener cDNA, con el que se hará una reacción de PCR marcando el producto con biotina (uso de *primers* biotinilados).

El producto de PCR biotinilado se hibrida en la membrana de los pocillos del array, enfrentándolo a 535 sondas de DNA correspondientes 218 secuencias de distintos marcadores virales necesarios para el tipaje H-N.

El producto biotinilado que se une a las sondas específicas que se encuentran en la membrana del array se revela con Streptavidina-Peroxidasa (reactivo C4) más sustrato de la peroxidada (reactivo D1)

En la membrana del array hay dos spots que corresponden al control de hibridación, habiendo biotina unida y, por tanto, controlando el revelado.

Después de leer los resultados, obtenemos un informe que nos indica si en la muestra había virus Influenza A y el subtipo.



3.4.2 Protocolo:

3.4.2.1. One-Step RT-PCR:

- Realizar la extracción de RNA vírico siguiendo el protocolo de extracción habitual.
- Para realizar la reacción de Retrotranscripción (RT) para obtener cDNA y la amplificación del cDNA, se recomienda el uso del kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System con Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Cat. No. 12574).

Protocolo:

Grabar en el termociclador el siguiente programa.

Tabla 22 : Protocolo en el termociclador de la retrotranscripción

Pre-heat cover/lid to 105°C	
Reverse transcription	30 min at 50°C
Activation of Taq Polymerase	2 min at 94°C
45 cycles with	45 sec at 50°C
	45 sec at 68°C
	30 sec at 94°C
Final elongation	5 min at 68 °C
Cool down to 4°C, hold	

- Resuspender los *primers* (HA y NA) del Kit de Clondiag con 100µL de agua destilada de grado molecular (*RNAse free*). Echar el agua desde arriba y dejar 3 minutos a Tª ambiente.
- Realizar la reacción de RT y la PCR, con los dos *primers*. Por tanto, para cada muestra vamos a realizar dos reacciones independientes de One-Step RT-PCR, una para cada *primer* (HA o NA).



Tabla 23. Reactivos de RT-PCR necesarios para la realización de la técnica en función del número de test realizados.

Number of tests (add surplus for 1 PCR)	1	3	5	7	9
RNAse-free, ultrapure water	8.5 μL	25,5 μL	42,5 μL	59,5 μL	76,5 μL
Rxn Mix (Invitrogen kit)	12.5 μL	37,5 μL	62,5 μL	87,5 μL	112,5 μL
Primer Mix (HA or NA)	2.0 μL	6 μL	10 μL	14 μL	18 μL
SSIII RT/ PlatinumTaq Mix	1.0 μL	3 μL	5 μL	7 μL	9 μL
Specimen (RNA isolate or control)	1 x 1 μL	3 x 1 μL	5 x 1 μL	7 x 1 μL	9 x 1 μL
TOTAL	25 μL	75 μL	125 μL	175 μL	225 μL

Como se deduce de la tabla anterior, el volumen final de la reacción con cada uno de los *primers*, será de 25 μL , poniendo en el eppendorf 1 μL de RNA *target*.

Como tenemos que amplificar las HA y las NA, utilizaremos 2 μL de muestra, en total.

- Se recomienda preparar una Master-mix con todos los componentes excepto la muestra para cada uno de los *primers* (HA o NA) y dispensar 24 μL en todos los eppendorfs de 0,2mL (*RNAse free*) que necesitemos (según muestras a amplificar).

-

NOTA: Importante poner un control negativo (H_2O destilada para PCR) para controlar posibles contaminaciones de la PCR. Por tanto, al hacer los cálculos para preparar la Master-mix, hay que tener en cuenta que vamos a amplificar una muestra más.

Poner los eppendorfs en el Termociclador.

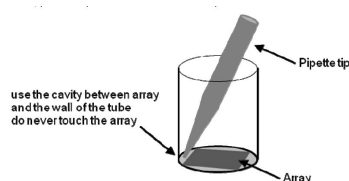
Tabla 24 . Programa de termociclador para RT-PCR

Pre-heat cover/lid to 105°C	
Reverse transcription	30 min at 50°C
Activation of Taq Polymerase	2 min at 94°C
45 cycles with	45 sec at 50°C
	45 sec at 68°C
	30 sec at 94°C
Final elongation	5 min at 68 °C
Cool down to 4°C, hold	

3.4.2.2. Hibridación:**Recomendaciones para la manipulación de la membrana del Array**

Esta membrana se encuentra en el fondo del pocillo de las tiras. Es la parte más delicada del Array. Algunas recomendaciones para su uso son:

- Intentar no tocar la superficie del mismo cuando se pipetea, como se muestra a continuación:

**Figura 7.** Esquema del array para facilitar su utilización.

- Limpiar con un papel/toalla con alcohol 70% la parte inferior de las tiras para limpiarlas.
- Nunca dejar que se seque la membrana (más de 2 minutos sin líquido).
- El control de la temperatura es crítico. Cumplir estrictamente las temperaturas indicadas ya que puede haber degradación de enzimas a altas temperaturas o rendimientos subóptimos a temperaturas bajas.

Antes de empezar:

- Atemperar el reactivo D1 antes de su pipeteo. Se puede sacar el reactivo de la nevera cuando se empieza el proceso de incubación con C1. Este reactivo es muy sensible a cambios de temperatura y luz.
- Precalentar el termomixer a 40°C.



3.4.2.2.1- Pre-washing: (de los pocillos de la placa de hibridación)

- Poner, en el marco, las tiras de pocillos que hagan falta.
- Añadir 200µL de agua ultrapura a cada pocillo.
- Pipetear arriba y abajo 4 veces, sin tocar la membrana.
- Descartar el agua.
- Añadir 200µL de buffer C1 a cada pocillo.
- Incubar en el *termomixer* 2' a 40°C y 550rpm.
- Descartar el buffer C1.

3.4.2.2.2- Preparación de las muestras

- Mezclar 96µL de buffer C1 con 2µL de cada uno de los productos de PCR obtenidos por muestra (HA y NA).
- Calentar la mezcla a 95°C durante 3-5 minutos.
- Poner en hielo y transferirlas a los pocillos de la placa de hibridación, en menos de un minuto.

NOTA: En caso de exceder este tiempo, se puede repetir la desnaturalización.

3.4.2.2.3.- Hibridación

- Transferir la mezcla de 100µL a cada pocillo en la posición que le toque a cada muestra, según el diseño de la placa que hayamos hecho previamente.
- Tapar los pocillos.
- Incubar 1 hora a 40°C y 550rpm.

NOTA: Esta incubación con C1 y el amplificado (hibridación) se puede alargar más de 1 hora (hasta un máximo de 3 horas) por si hubiera necesidad de alargar el protocolo. La señal será más intensa.

Durante esta incubación, podemos preparar la mezcla del conjugado C3+C4

(para 8 muestras (pocillos): 10µL C3+1000µL C4).

**Tabla 25.** Esquema orientativo para la realización del conjugado C3+C4

	1 well	2-3 wells	4-6 wells	7-10 wells	11-15 wells	16-20 wells	21-30 wells	31-40 wells
C3	1.5 µL	3.5 µL	7 µL	11 µL	16 µL	21 µL	32 µL	42 µL
C4	150 µL	350 µL	700 µL	1100 µL	1600 µL	2100 µL	3200 µL	4200 µL

Dejar la mezcla a T^a ambiente hasta el momento de su uso.

- Descartar todo el volumen, con pipeta pero con cuidado de no tocar la membrana.

- Añadir 150µL de buffer C2 y pipetear arriba y abajo 4 veces, sin tocar la membrana (X1).

- Descartar el C2.

- Volver a añadir 150 µL de buffer C2 a los pocillos e incubar a 40°C durante 15 minutos (X2)

NOTA: Para los lavados con C2 no hace falta tapar los pocillos.

- Descartar el C2.

- Añadir 100µL de la mezcla C3/C4 e incubar 15min a 30°C y 550rpm.

- Descartar todo el volumen de la mezcla C3/C4 con la pipeta pero con cuidado de no tocar la membrana.

- Añadir 150µL de buffer C5 y pipetear arriba y abajo 4 veces, sin tocar la membrana (X2).

- Descartar todo el volumen, con la pipeta pero con cuidado de no tocar la membrana.

- Añadir 100 µL de buffer D1 e incubar 10min a T^a ambiente y oscuridad, sin agitación..

- Descartar todo el volumen, con la pipeta pero con cuidado de no tocar la membrana.

- Realizar lectura con ArrayMate.

**Tabla 26.** Ejemplo de la posición que ocupa cada muestra en la placa.

position	sampleID	assayID	comment
1	12345	10326	Dr. Jones
2	12346	10326	Dr. Miller
3	12347	10326	Dr. Yale
4	12348	10326	Dr. Palmer
5	12349	10326	Dr. Jones
6	12350	10326	Dr. Jones
7	12351	10326	Dr. Chapman
8	12352	10326	Dr. Scott
9	12353	10326	control
17	12354	10326	internal test

Tabla 27. Esquema de la placa.

	1	2	3	4
A	1	9	17	
B	2			
C	3			
D	4			
E	5			
F	6			
G	7			
H	8			

3.4.2.3. Crear una lista de trabajo:

- Abrir el archivo *.txt, de muestra, y editar las ID de las muestras.

Ejemplo de lista:

position	experiment_name	sampleID	daily_number
1	10326	1	1
2	10326	2	2
3	10326	3	3
4	10326	4	4

- Cambiar el contenido de la columna referente al nombre de los pacientes (sample ID)

- Cada número es un ID de muestra.

- Para cambiarlo, hay que hacer doble clic en cada uno de los números que se quiera editar y escribir el nuevo.

- Al acabar, el cursor quedará a la derecha del número. Dar al tabulador, de manera que los siguientes caracteres queden en la misma columna que el resto.

3.4.2.4. Lectura:

- Encender el aparato

- Entrar en el usuario R&D (password: "abcde")

- Darle a la opción "New Run" (esquina superior izquierda).



- Se puede dar el nombre al "Run" (Run Name), y editar el nombre del operador (operator ID) en la parte superior de la pantalla.
- Insertar el pendrive en el lector USB (parte inferior derecha del ArrayMate) y seleccionar la opción para trabajar con lista de trabajo externa.
- Se abre la siguiente ventana:

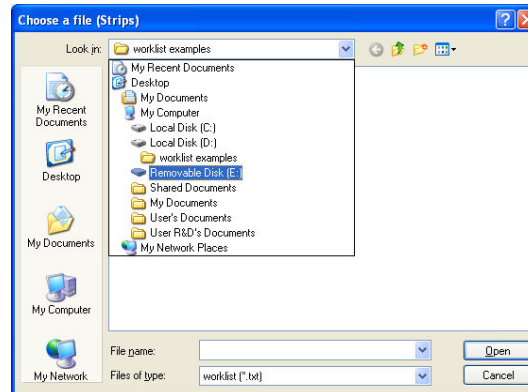


Figura 8. Esquema del PC (I).

- Abriremos el disco extraíble para poder acceder a la información guardada en él, y haremos
doble clic encima del archivo correspondiente a la lista de trabajo.
- Para comprobar la lista de trabajo que hemos cargado, podemos abrirla, clicando en el botón



- Después de cargar la lista de trabajo, darle a Next (parte inferior derecha de la pantalla)
- Veremos que se abre el lector y ya podremos colocar el soporte metálico y la placa que queremos leer, colocándola de manera que el pocillo A1 quede en la parte interior izquierda.

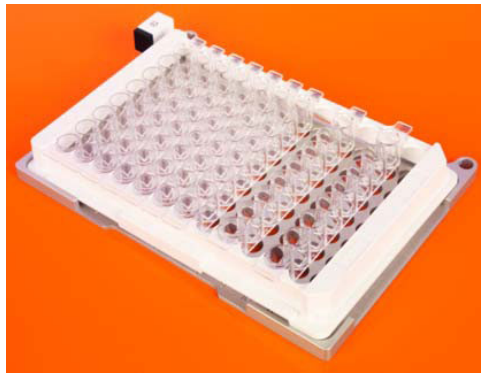


Figura 9. Esquema de la placa de PCR

- Pulsar Next (parte inferior derecha de la pantalla)

- El proceso de lectura empieza automáticamente

Durante el proceso de lectura, el aparato nos indica qué está haciendo, con los siguientes iconos:

Imagen tomada



Analizando



Lectura Realizada



- Oiremos un pequeño pitido, cuando el aparato haya acabado además de ver el símbolo correspondiente a “Lectura Realizada”, en todos los pocillos

- Darle Next (parte inferior derecha de la pantalla) para abrir el lector y poder retirar la placa

- Volver a darle a Next para cerrar el lector

4.- Recuperación de resultados:

Las lecturas se organizan en carpetas, como se muestra en la siguiente imagen

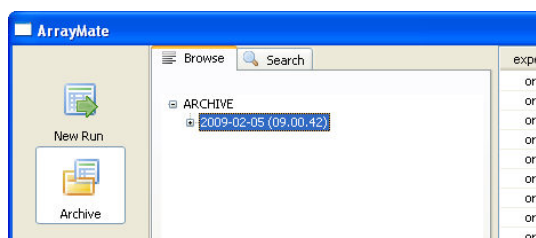


Figura 10. Esquema del PC (II).

Para poder ver los resultados de cada cepa, desplegar la carpeta de resultados, dándole al “+”

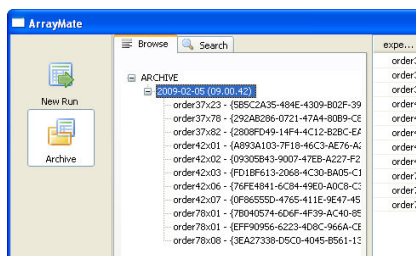


Figura 11. Esquema del PC (III).

Ponerse encima de cada uno de los resultados, por separado, para poder ver los informes de cada una de las cepas analizadas.

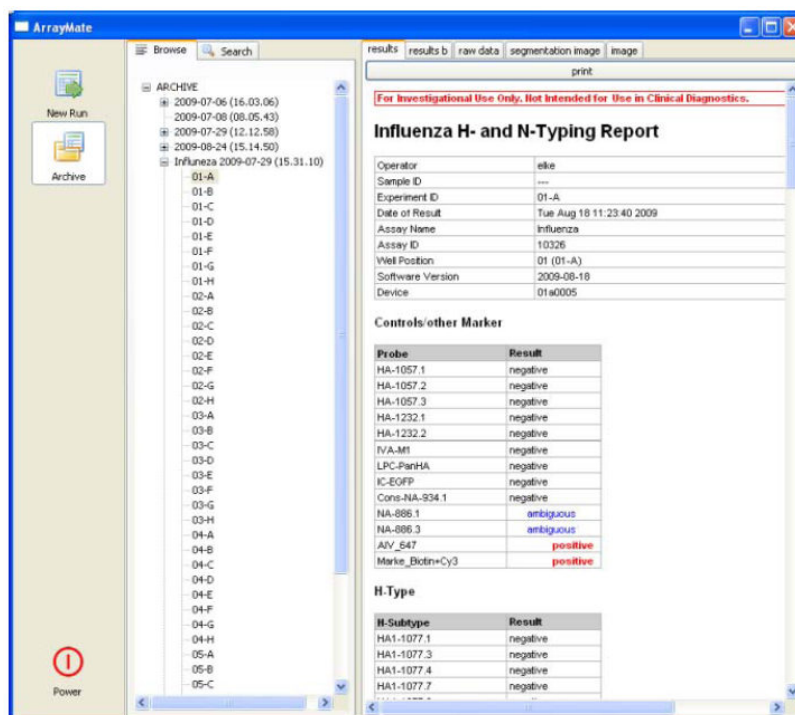


Figura 12. Esquema del Pc (IV)

- Para poder exportar los resultados, hay que situarse encima de la carpeta del Run, que se quiera recuperar y clicar el botón derecho del ratón.

NOTA: No se pueden exportar los resultados de cada cepa, individualmente. Sólo se pueden exportar *Runs* completos.

- Elegir la opción “Export RunReports”

- Aparecerá la siguiente ventana

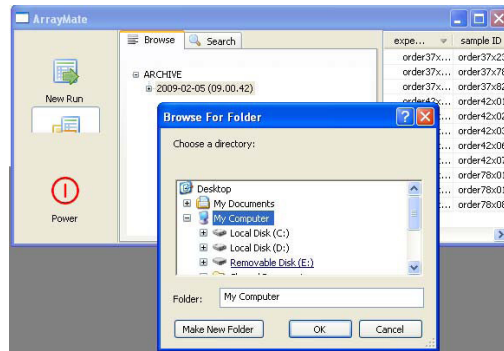


Figura 13. Esquema del PC (V).

- Abrir el pendrive y grabar los resultados



4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO REALIZADO

Las variables cuantitativas se presentan con la media y la desviación típica, y las cualitativas según su distribución de frecuencias.

Mediante el test Chi-cuadrado de Pearson, se ha analizado la asociación de las variables cualitativas. En el caso de que el número de celdas con valores esperados menores de 5 sean mayores de un 20%, se ha utilizado el test exacto de Fisher o el test Razón de verosimilitud para variables con más de dos categorías.

Las comparaciones de los valores cuantitativos se han realizado con la prueba T de Student para muestras independientes.

Los datos han sido analizados con el programa estadístico SPSS versión 19.0 para Windows. Aquellos valores de $p < 0,05$ serán considerados estadísticamente significativos.



RESULTADOS

I. Estudio descriptivo de la serie analizada

Durante el período de estudio analizado (1 de mayo de 2009 a 31 de mayo de 2011) se han procesado un total de 3595 muestras respiratorias recibidas con la solicitud de determinación de virus respiratorios de toda la comunidad de Castilla y León. Dentro de este periodo, se distinguirán a lo largo del estudio, dos intervalos de tiempo diferenciados; el primero del 1 de Mayo de 2009 al 30 de Abril de 2010 y el segundo del 1 de Mayo de 2010 al 31 de Mayo de 2011.

En función de su procedencia, las muestras correspondieron a 11 áreas sanitarias del Sistema Regional de Salud de Castilla y León. En la Tabla 28 y en la Figura 14 se representan la distribución del global de las muestras procesadas en función de su origen geográfico. Destaca en primer lugar el elevado porcentaje procedente de las dos Áreas Sanitarias de Valladolid (38.1%), en segundo lugar el área sanitaria de Burgos (23%) y con menor frecuencia se encuentran las áreas de Salamanca, Segovia, Palencia, Soria, Zamora, León y Ávila.

Por lo que hace referencia a la distribución por sexos, de las muestras que fueron remitidas, el 55.1% correspondieron a varones y un 44.9% a mujeres ($p = 0.820$).

De ellas 1443 fueron positivas para gripe u otros virus respiratorios, obteniendo de este modo un rendimiento diagnóstico global del 40.14%. Al analizar este parámetro en función del año, alcanzó su máximo en los meses de Enero, Febrero, Marzo, Abril y Mayo de 2011, situándose en el 47.05%.



Tabla 28. Distribución de las solicitudes recibidas para la determinación de virus respiratorios en función de su procedencia.

Provincia	N	%
Ávila	122	3,4
Burgos	829	23
León	223	6,2
Palencia	219	6,1
Salamanca	288	8
Segovia	255	7,1
Soria	154	4,3
Valladolid	1372	38,1
Zamora	133	3,7
Total	3595	100

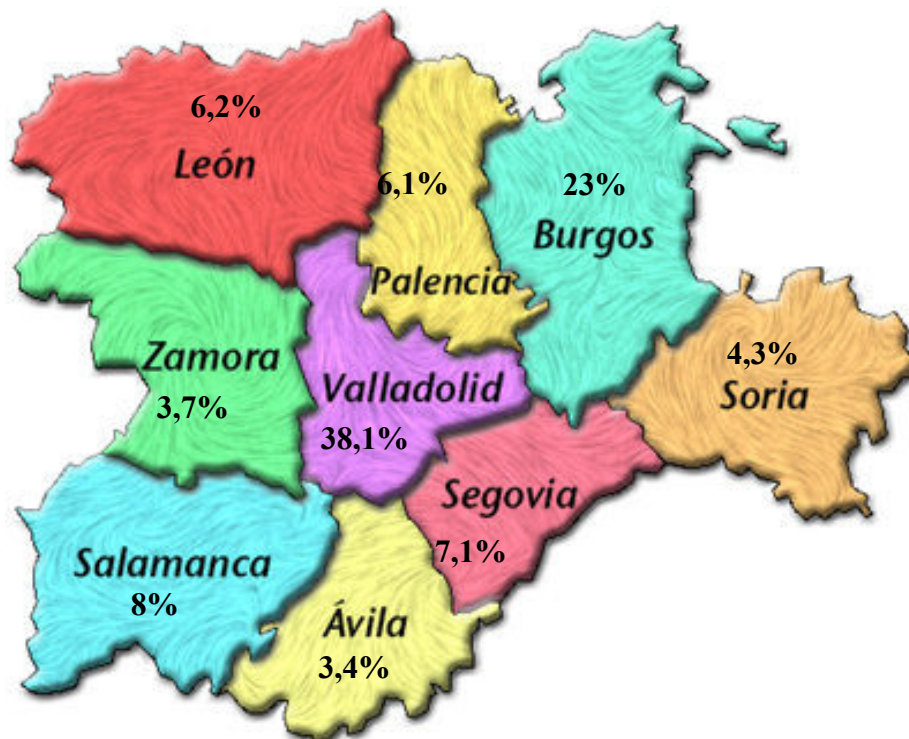


Figura 14. Distribución porcentual de la demanda diagnóstica para virus respiratorios.

La mayor parte de las peticiones que se recibieron correspondían a pacientes hospitalarios, 2672 muestras (74.3%), y 923 peticiones (25.7 %) remitidas desde Centros de Salud de toda la Comunidad. En la Tabla 29 se expone la distribución según el ámbito asistencial y la provincia de origen de la petición.

Tabla 29. Distribución de la demanda diagnóstica de virus respiratorios por provincia de origen y ámbito asistencial.

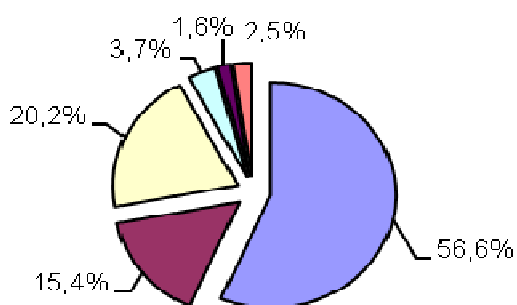
Provincias	Muestras de procedencia:		Total N/%
	Hospitalaria N/%	Centros de Salud N/%	
Ávila	106 (2,95%)	16 (0,45%)	122 (3,4%)
Burgos	610 (16,93%)	219 (6,07%)	829 (23%)
León	167 (4,64%)	56 (1,56%)	223 (6,2%)
Palencia	168 (4,68%)	51 (1,42%)	219 (6,1%)
Salamanca	227 (6,31%)	61 (1,69%)	288 (8%)
Segovia	204 (5,68%)	51 (1,42%)	255 (7,1%)
Soria	126 (3,52%)	28 (0,78%)	154 (4,3%)
Valladolid	971 (26,96%)	401 (11,14%)	1372 (38,1%)
Zamora	93 (2,59%)	40 (1,2%)	133 (3,7%)
Total	2672 (74,3%)	923 (25,7%)	3595 (100%)

La distribución de muestras en función de la categoría de las mismas se representa en la Tabla 30. Como puede observarse los Frotis Faríngeos son los que representaron el mayor volumen de demanda diagnóstica (2035/56,6%), seguidos de los Frotis Nasofaríngeos (726/20,2%) y los Lavados Nasofaríngeos (553/15,4%). El resto de muestras se recibieron en menor porcentaje, Frotis Nasal (133/3,7%), Lavado Broncoalveolar (58/1,6%) y otras (Mini BAL, aspirados traqueales, biopsias pulmonares) que en conjunto, supusieron el 2,5% del total (90 muestras).



Tabla 30. Distribución de la demanda diagnóstica de virus respiratorios por tipo de muestra. (2009-2011)

Muestra	N (Frecuencia)	% (Porcentaje)
Frotis Faríngeo	2035	56,6
Lavado Nasofaríngeo	726	20,2
Frotis Nasofaríngeo	533	15,4
Frotis Nasal	133	3,7
Lavado Bronco-alveolar	58	1,6
OTRAS	90	2,5



FF: Frotis faríngeo.

LNF: Lavado Nasofaríngeo.

FNF: Frotis Nasofaríngeo.

FN: Frotis Nasal.

BAL: Lavado broncoalveolar.

Figura 15. Distribución de los diferentes tipos de muestras procesadas.

A continuación, en la Tabla 31 y en la Figura 16, se efectúa una representación de la distribución mensual de las muestras recibidas. Cabe destacar que fueron los meses de Noviembre (22%), Diciembre (17%), Enero (11.9%) y Octubre (11.7%), en orden de mención decreciente, en los que se recibió la mayor proporción de demanda diagnóstica.

Es oportuno reseñar que en el conjunto del periodo estudiado, de los 25 meses, se recibieron muestras durante tres periodos mensuales de Mayo correspondiendo al 2.4% de la demanda diagnóstica total: Mayo de 2009 pertenece al periodo pandémico mientras que Mayo de 2010 y Mayo de 2011 pertenecen, tras la distribución que se ha realizado, al periodo postpandémico.



Tabla 31. Distribución mensual agregada de la demanda diagnóstica de gripe y virus respiratorios entre 2009 y 2011.HCUV.

Mes	N	%
Enero	432	12.01
Febrero	251	6.98
Marzo	222	6.18
Abril	131	3.65
Mayo	134	3.74
Junio	68	1.89
Julio	198	5.50
Agosto	127	3.54
Septiembre	305	8.48
Octubre	423	11.77
Noviembre	748	20.80
Diciembre	556	15.46
Total	3595	100%

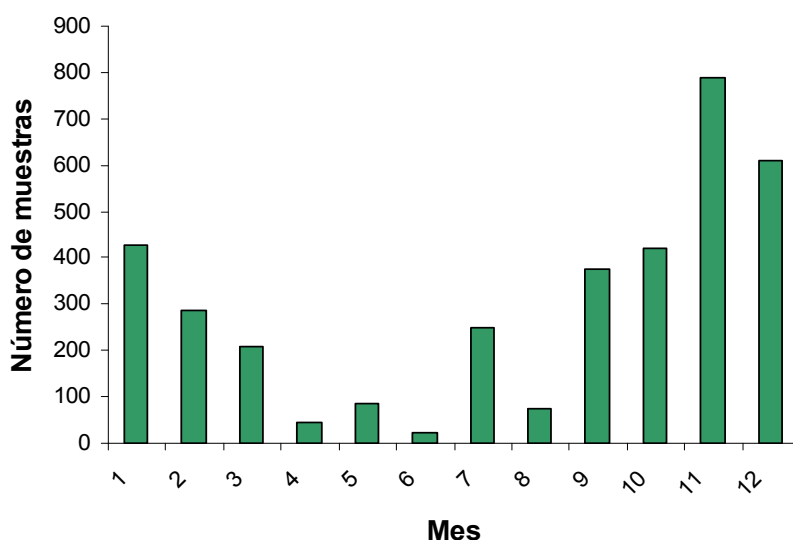


Figura 16. Representación gráfica de la demanda mensual agregada de virus respiratorios y gripe.

Teniendo en cuenta la demanda diagnóstica recibida en el período pandémico (mayo de 2009-abril de 2010) y en el período post-pandémico (mayo de 2010-mayo de 2011) se exponen a continuación las Tablas 32 y 33.

Tabla 32. Distribución mensual desagregada de la demanda diagnóstica de gripe y virus respiratorios en el período pandémico. HCUV.

MES	N(FRECUENCIA)	%
Mayo 2009	10	0.39
Junio 2009	9	0.35
Julio 2009	177	7.02
Agosto 2009	119	4.72
Septiembre 2009	286	11.35
Octubre 2009	399	15.83
Noviembre 2009	697	27.65
Diciembre 2009	416	16.50
Enero 2010	140	5.55
Febrero de 2010	76	3.01
Marzo 2010	104	4.13
Abril 2010	87	3.45

Tabla 33. Distribución mensual desagregada de la demanda diagnóstica de gripe y virus respiratorios en el período post-pandémico. HCUV.

MES	N(FRECUENCIA)	%
Mayo 2010	73	6.85
Junio 2010	59	5.54
Julio 2010	21	1.97
Agosto 2010	8	0.75
Septiembre 2010	19	1.78
Octubre 2010	24	2.25
Noviembre 2010	51	4.79
Diciembre 2010	120	11.26
Enero 2011	292	27.42
Febrero de 2011	175	16.43
Marzo 2011	118	11.08
Abril 2011	44	4.13
Mayo de 2011	61	5.73

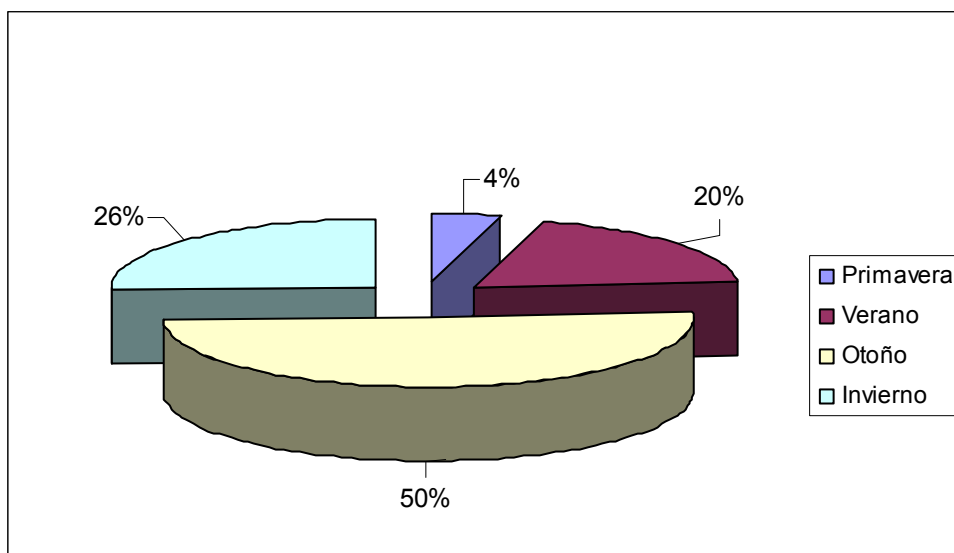


Figura 18 .Representación de la demanda agregada de virus respiratorios y gripe en función de la estacionalidad.

La distribución por sexos de las muestras que se trabajaron en los dos años estudiados fue la siguiente: el 55.1% correspondieron a varones y el 44.9% restante correspondieron a mujeres.

En cuanto a la edad media de los pacientes cuyas muestras fueron recibidas durante el periodo de tiempo estudiado se situó en 28,35 años (DS 25.32). En la Figura 19 se observa que el rango de edad de los pacientes donde la demanda fue más numerosa corresponde a las edades comprendidas entre 14 y 65 años (47%), seguidas del rango pediátrico entre 1 y 13 años (22.5%). Se recibieron un 17.3% de muestras de lactantes menores de un año de edad y el 13.2% restante correspondieron a pacientes mayores de 65 años.

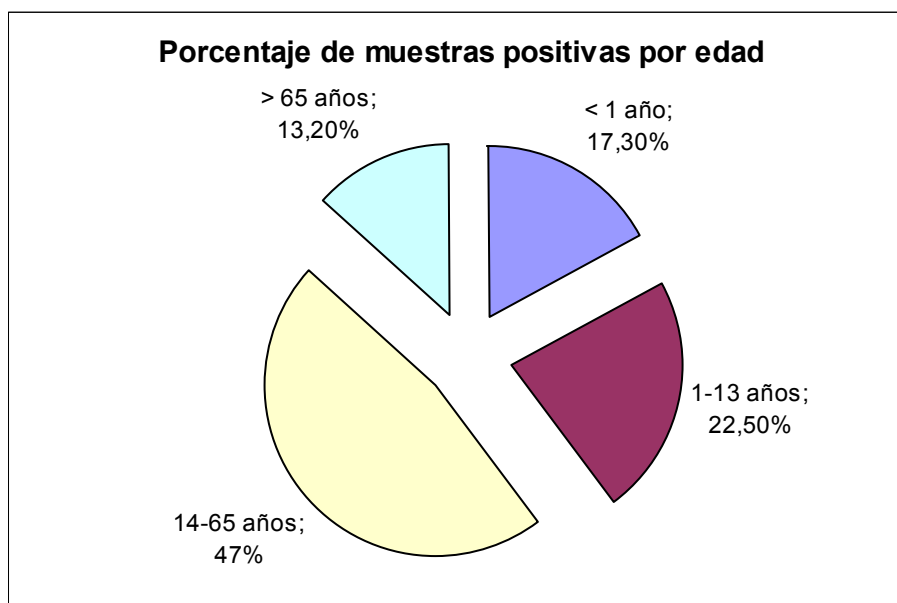


Figura 19. Distribución etaria de resultados positivos para virus respiratorios y gripe.

II. Resultados del diagnóstico de Gripe y virus respiratorios mediante técnicas de detección de virus respiratorios.

Aunque el virus de la Gripe es uno de los numerosos virus respiratorios conocidos, debido a su importancia epidémica y sanitaria se han elaborado los resultados teniendo en cuenta este hecho. De esta forma se enfrentan datos globales que incluyen la gripe y otros virus respiratorios, bien aislados o en coinfección; datos específicos para el virus de la Gripe y otro apartado en el que se representan los datos de otros virus respiratorios por separado sin el virus de la gripe. También se hacen constar los datos correspondientes al año pandémico (2009-2010) y al post-pandémico (2010-2011) de forma independiente.

DATOS GLOBALES:

Durante el período objeto de estudio han resultado positivas un total de 1.443 muestras para cualquier virus respiratorio, lo que supuso en conjunto un rendimiento diagnóstico del 40,14%. En el período pandémico se obtuvo un total de 1.055 (73,1%) muestras positivas y en el período post-pandémico 389 (26,9%).

Entre las muestras positivas el 51,5% correspondieron a virus gripales, el 40,6% a otros virus respiratorios y el 7,9 % restante a coinfecciones, tal y como se representa en la Figura 20 y en la Tabla 34.

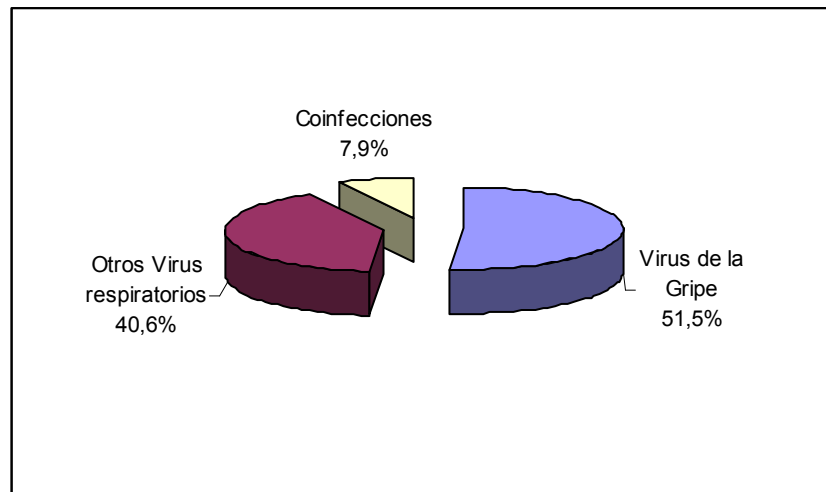


Figura 20. Distribución global de los resultados positivos en el diagnóstico de virus respiratorios y gripe.

Tabla 34. Resultados positivos globales de las muestras recibidas.

Muestras Positivas	N	%
Virus de la gripe	743	51,5
Otros virus Respiratorios	586	40,6
Coinfecciones	114	7,9
Total	1443	100

En la tabla 35 y en la Figura 21 se exponen los datos totales desglosados en los tres años diferentes de estudio y desagregados dependiendo de la detección, bien sea Gripe, otro virus respiratorio, coinfección y en los que no se detectó ningún virus. Fue en 2009 donde más detecciones de Gripe obtuvimos con un 29.1% (615) sobre el total de ese año, seguido de 2011 con 13.7% (114). En cuanto al resto de virus respiratorios analizados fue también en 2009 donde más volumen de muestras positivas tuvimos con 315 (14.9%), pero en esta ocasión le siguió el año 2010 con 182 (27.9%). Se destaca el poco volumen de muestras recibidas en 2010 con un total de 651, muy por debajo del año 2011 con 833, recibiendo el mayor volumen en 2009 con 2111 muestras.

Tabla 35. Virus positivos desglosados por tipo de virus y por año de estudio.

Virus respiratorios	2009	2010	2011
Gripe	615 (29,1%)	39 (6%)	114 (13,7%)
Otro virus	315 (14,9%)	182 (27,9%)	178 (21,3%)
Coinfección	40	41	33
Total positivos	930 (44,1%)	221 (33,9%)	292 (35%)
Negativo	1.181 (55,9%)	430 (66,1%)	541 (65%)
TOTAL	2.111	651	833

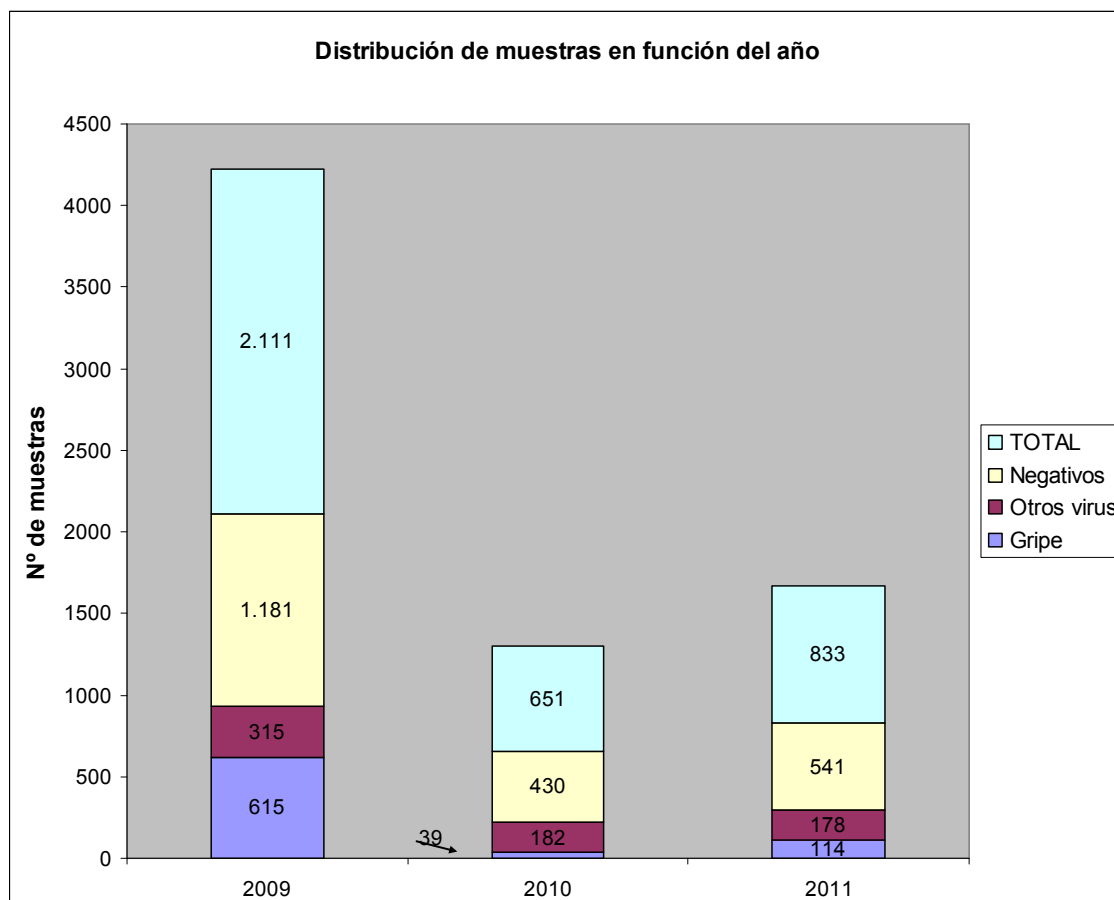


Figura 21. Distribución de las muestras en el diagnóstico de virus respiratorios y gripe en función del año.

Al analizar las muestras por grupos de edad, en la figura 22 se observa el mayor volumen de resultados positivos en el rango de pacientes adultos (14-65 años) que junto con los pacientes en edad pediátrica (1-13 años) incluyendo los lactantes menores de 1 año suponen el 86.8% de detecciones de virus gripales u otros virus respiratorios. En la figura 23 se muestra de manera más pormenorizada el número de muestras positivas en cada rango de edad.

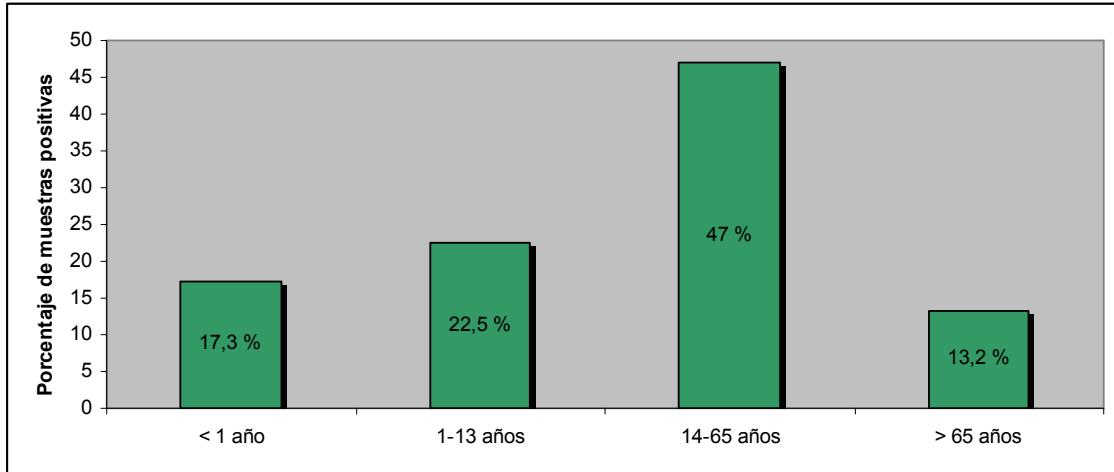


Figura 22. Distribución etaria agregada de diagnósticos positivos de virus respiratorios y gripe.

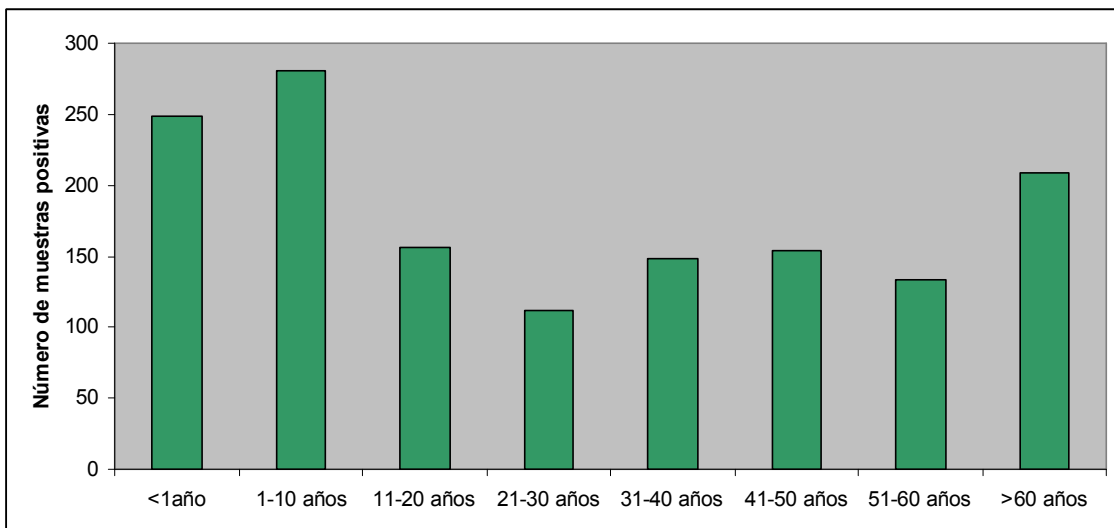


Figura 23. Distribución etaria agregada de número de muestras positivas de virus respiratorios y gripe.

En la figura 24, al agrupar las muestras positivas por trimestres anuales, es muy llamativa la frecuencia que se presenta en el último trimestre del año, otoño, con 732 muestras (50.7%) que representan más de la mitad de la positividad obtenida. Le sigue en frecuencia el primer trimestre del año, con 370 muestras positivas (25.6%), a continuación el trimestre estival con 282 (19.5%) y, finalmente, con 59 detecciones positivas (4.1%) es el segundo trimestre del año el que tiene una menor representación. En la figura 25 esta información está desagregada por años.

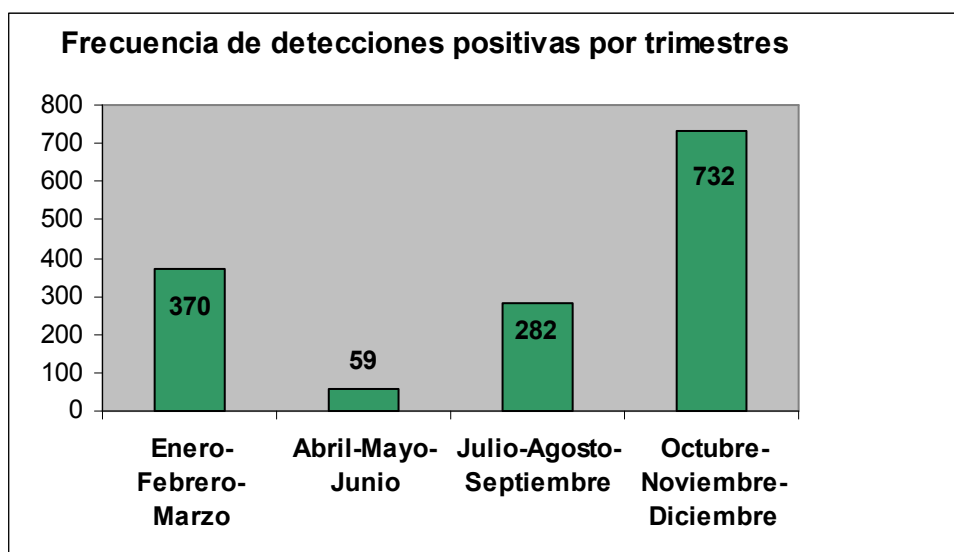


Figura 24. Representación gráfica agregada de los resultados positivos obtenidos mediante técnicas de detección de virus respiratorios categorizados por trimestres.

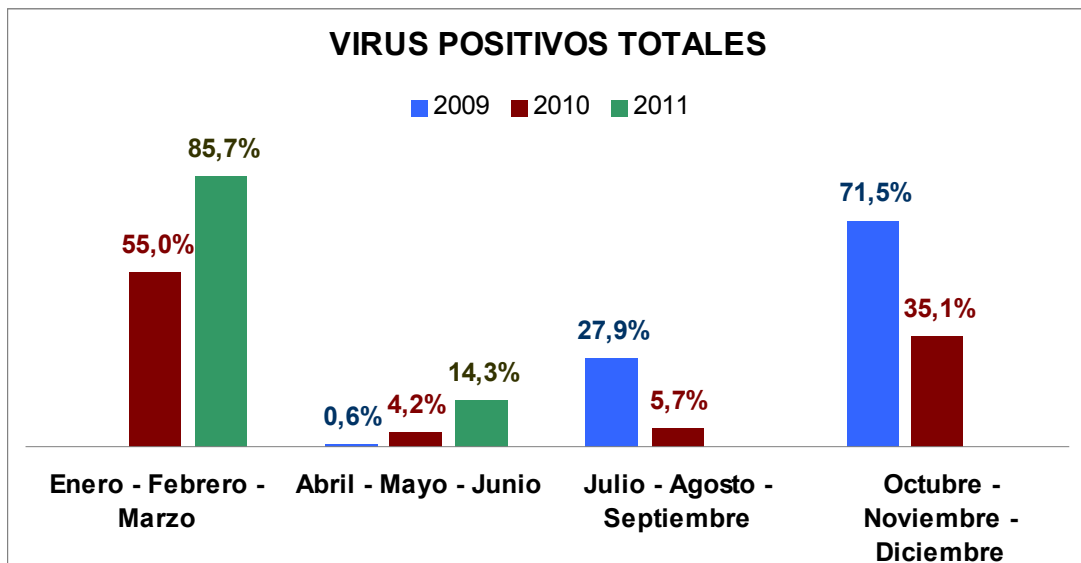


Figura 25. Representación gráfica de los resultados positivos obtenidos mediante técnicas de detección de virus respiratorios categorizados por trimestres y año.

1.- Detección de Virus de la Gripe.

Al considerar el grupo de muestras con resultado positivo de algún virus de la Gripe, correspondieron a Virus de la Gripe A H1N1 nueva variante 717 (95.9%), de igual forma 2 (0,3%) con virus de la gripe A H3N2 estacional, 2 (0,3%) con virus de la Gripe A H1N1 estacional y 26 (3,5%) muestras con virus de la Gripe B. Estos datos se muestran en la Tabla 36.



Tabla 36. Distribución de las diferentes muestras positivas a virus de la gripe categorizadas en función del tipo y subtipo antigénico.

Virus de la Gripe	N	%
Gripe A H1N1 nv*	717	95.9
Gripe A H1N1 estacional	2	0.3
Gripe A H3N2 estacional	2	0.3
Gripe B	26	3.5
Total	747	100

*Gripe A H1N1 nueva variante.

Hemos encontrado una tendencia constante en la detección de virus gripal A H1N1 nv y esporádicamente se ha documentado virus de la gripe B.

Los pacientes con muestras positivas (N=26) para virus de la gripe B tienen

una edad media de 20.77 años, 15 muestras (57.7%) correspondieron a varones frente a 11 (42.3%) que correspondieron a mujeres.

En el periodo pandémico sólo documentamos una detección de gripe B en el mes de Enero de 2010 que correspondió a un varón de 39 años, mientras que en el periodo postpandémico se detectaron las 25 muestras positivas de gripe B restantes.

En la figura 26 se representa gráficamente el porcentaje por grupo de edad de las detecciones positivas obtenidas y puede observarse cómo es la etapa pediátrica la que representa el 50% de la positividad. En la figura 27 al desagregar los datos por décadas de edad, es el rango de entre 11 y 20 años donde encontramos más detecciones (N=9).

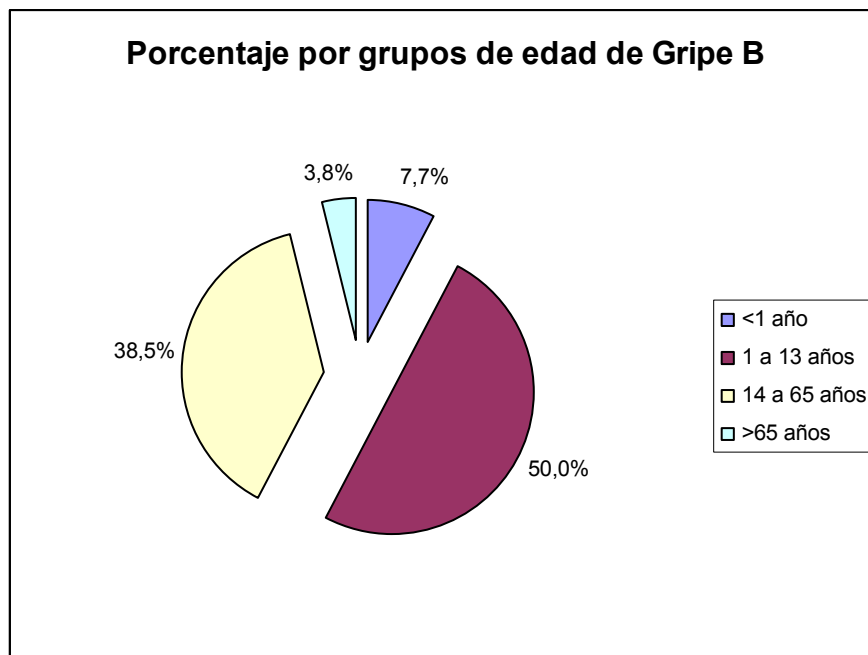


Figura 26. Representación gráfica de los resultados de gripe B por grupos de edad.

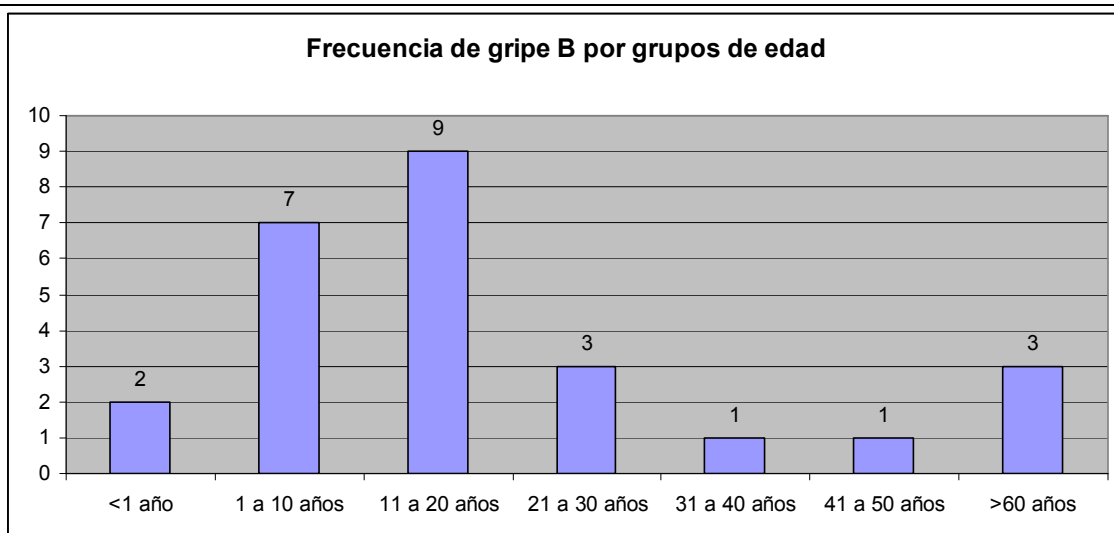


Figura 27. Representación gráfica de detecciones de gripe B por grupos de edad.



En la Tabla 37 se muestra que Valladolid fue la provincia donde más detecciones positivas de gripe B obtuvimos (N=10), seguida de León (N=4), Segovia (N=3) y Soria (N=3).

Tabla 37. Distribución de las muestras positivas a virus de la gripe B categorizadas en función de su procedencia.

Provincia	N	%
Ávila	0	0
Burgos	2	7,7
León	4	15,4
Palencia	1	3,8
Salamanca	2	7,7
Segovia	3	11,5
Soria	3	11,5
Valladolid	10	38,5
Zamora	1	3,8
Total	26	100

En la figura 28, se representa gráficamente cómo las detecciones de Gripe B se produjeron principalmente en los meses invernales (N=22) representando el 84,6%; las muestras positivas restantes (N=4) se detectaron en el mes de Diciembre cuando todavía es otoño. Se destaca que no hubo muestras positivas ni en primavera ni en verano y que en el periodo pandémico tan sólo se detectó una muestra positiva para virus de la gripe B.

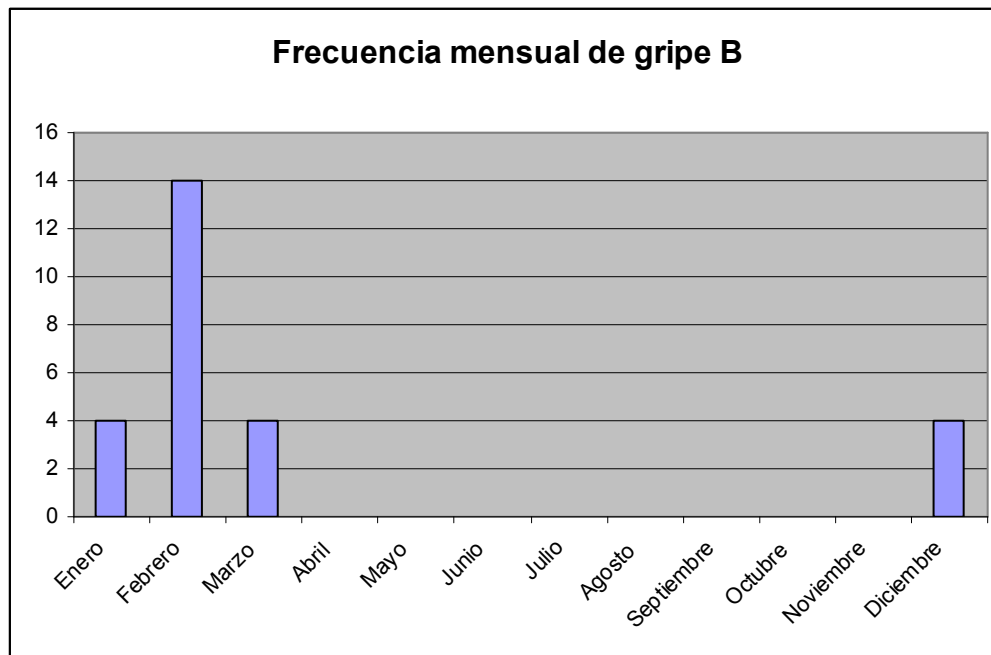


Figura 28. Representación gráfica de la frecuencia mensual de gripe B.

Al efectuar el análisis del rendimiento diagnóstico, independientemente del tipo de virus documentado, en función del Área asistencial, nos encontramos que Valladolid, con sus dos áreas sanitarias diferenciadas, representa la provincia dónde se produjeron más resultados positivos para gripe u otro virus respiratorios (550/38,1%), seguida de la de Burgos (332/23%) y después, en menor proporción y en orden decreciente, Salamanca (116/8%), Segovia (102/7,1%), León (90/6,2%) y Palencia (88/6,2%). El resto de provincias restantes de Castilla y León mostraron un menor rendimiento tal y como se expone en la Tabla 38.



Tabla 38. Distribución de muestras positivas de virus respiratorios en función del área geográfica de procedencia.

PROVINCIA	N	%	% ACUMULADO
AVILA	49	3.4	3.4
BURGOS	332	23.0	26.4
LEÓN	90	6.2	32.6
PALENCIA	88	6.1	38.7
SALAMANCA	116	8.0	46.8
SEGOVIA	102	7.1	53.8
SORIA	62	4.3	58.1
VALLADOLID	550	38.1	96.3
ZAMORA	54	3.7	100
TOTAL	1443	100	

Al analizar de manera pormenorizada los hallazgos correspondientes a la provincia de Valladolid, desagregados en función del área sanitaria y de la

procedencia, representamos en las Figuras 29 y 30 y en la Tabla 39 los datos más relevantes.

Se representan en las mismas el número de muestras positivas para algún virus respiratorio realizando tres grandes grupos: procedencia hospitalaria del Area Oeste, procedencia hospitalaria del Area Este, grupo que incluye las muestras procedentes del Hospital Comarcal de Medina del Campo, y un

tercer grupo que recoge las muestras positivas procedentes de Atención Primaria solicitadas por profesionales de la Red de Médicos Centinela de Castilla y León.

Como se puede observar en la Figura 14, la mayor parte de los resultados positivos se observaron en muestras procedentes del Área Este (341/62%).

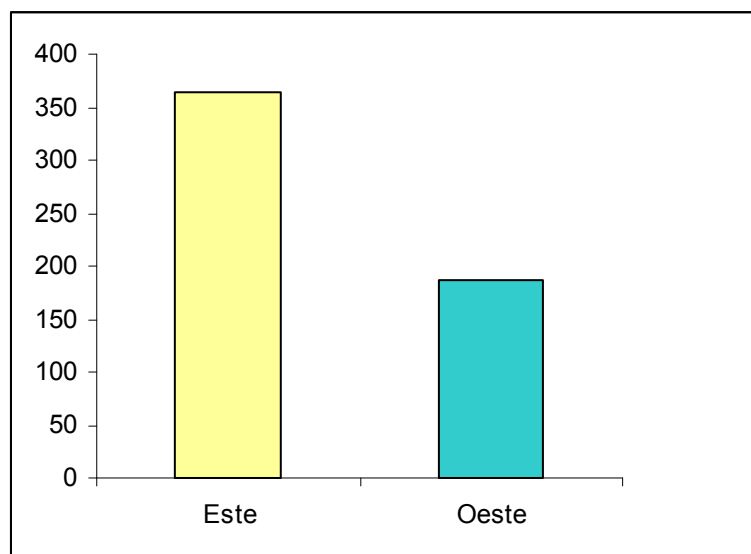


Figura 29. Distribución por área sanitaria de Valladolid del número de muestras positivas para virus de la Gripe y rendimiento diagnóstico.

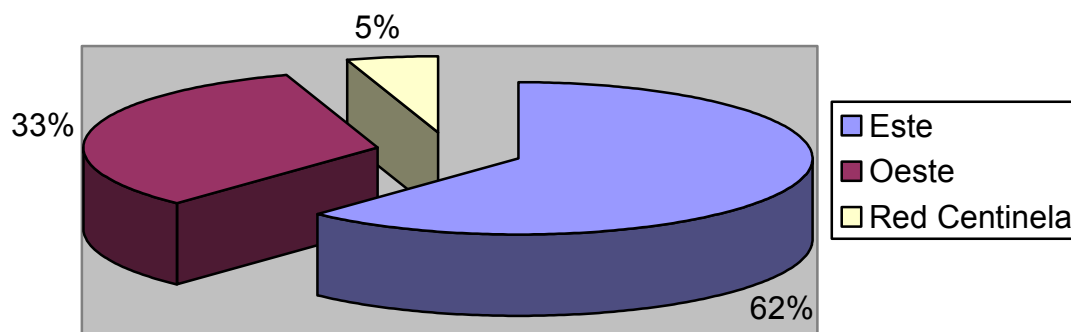


Figura 30. Distribución de porcentajes de muestras positivas en la provincia de Valladolid en función del área de procedencia.

Tabla 39. Distribución de muestras positivas en función del área sanitaria reflejando su Hospital de referencia dentro de la provincia de Valladolid.

VALLADOLID	N total	% rendimiento
ESTE (H.C.U.V)*	341	62.0
OESTE (H.R.H)**	181	32.9
RED CENTINELA	28	5.1
TOTAL	550	100

*H.C.U.V: Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

**H.R.H: Hospital Rio Hortega de Valladolid.

2.- Detección de otros virus respiratorios

Considerando el grupo de muestras con resultado positivo en la detección de virus respiratorios y excluyendo, por su anterior mención, a los Virus Gripales, en la Tabla 40, se expone de manera explícita que la detección de Rino/Enterovirus (310/52.9%) corresponde a más de la mitad de las muestras positivas, seguido de Virus Respiratorio Sincitial (110/18.7%) y del grupo de los virus Parainfluenza, (72/ 12.3%).

En menor proporción se han documentado el resto de virus respiratorios estudiados (Metapneumovirus 40/6.8%); Coronavirus 24/4.1%, Adenovirus 15/2.6% y Bocavirus 15/2,6%).

Tabla 40. Distribución global de muestras con resultado positivo excluyendo virus gripales.

VIRUS RESPIRATORIOS	N	%
Rino/Enterovirus	310	52.9
Virus Respiratorio Sincitial *	110	18.7
Virus Parainfluenza**	72	12.3
Metapneumovirus	40	6.8
Coronavirus***	24	4.1
Adenovirus	15	2.6
Bocavirus	15	2.6
Total	586	100

*VRS A y B.
**Virus Parainfluenza 1, 2, 3 y 4.
***Coronavirus OC43, NL63, 229E y HKU1.

De manera más detallada se exponen a continuación, la distribución de los tipos de Virus Parainfluenza y Coronavirus. En los primeros, en términos absolutos destacan los Virus Parainfluenza 2 (24/4.1%) y 1 (22/3.8%), por este orden, seguidos de 3 (17/2.9%) y 4 (9/2.5%) en cuanto a número de detecciones.

En la Figura 31 se representa gráficamente la distribución de los diferentes tipos referidos al universo global de Virus Parainfluenza en aras a esclarecer su representatividad comparativa.

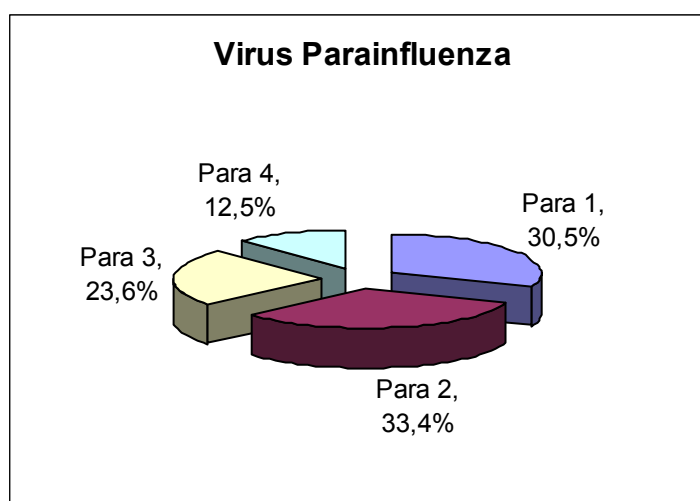


Figura 31. Representación gráfica de la distribución de muestras positivas para los diferentes tipos de virus Parainfluenza, referidos a su universo global (n=72).

En los Coronavirus, el tipo OC43 (17/2.9%) es el que representa una proporción más elevada con respecto al resto. Por lo que hace referencia a la distribución de tipos en términos absolutos destaca, como se ha avanzado, el OC43 (17/2,9%), seguido del NL63 (3/ 0.2%), el 229E (3/ 0.2%) y el HKU 1 (1/ 0.1%). En la Figura 32 se representa adoptando el modelo precedente la distribución de los diferentes tipos referidos al universo global de Coronavirus.

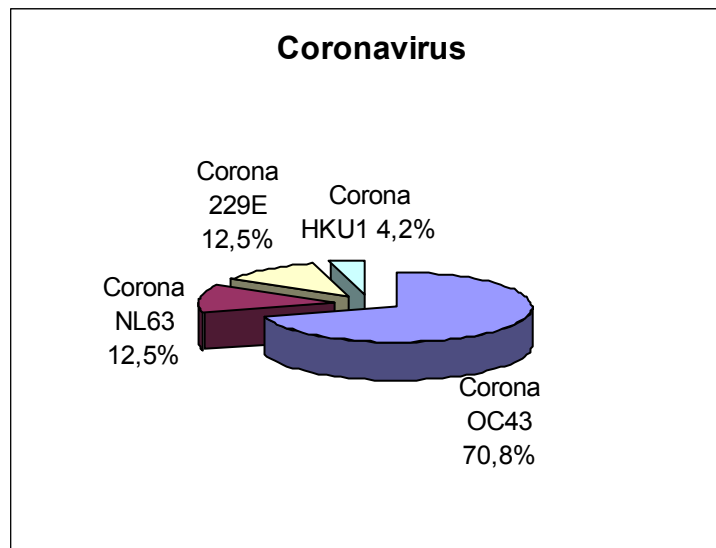


Figura 32. Representación gráfica de muestras positivas para los diferentes tipos de Coronavirus (n=24).

3.- Detección de coinfecciones.

Por lo que hace referencia a la presencia de coinfecciones por diferentes virus respiratorios en nuestra serie el 7.4 % (107) de las muestras mostraron la presencia de dos virus respiratorios, y en 0.5% (7) se documentaron tres virus. En aras a especificar las diferentes combinaciones objetivadas en nuestra serie, en la Tabla 41 y 42 se reflejan en orden decreciente de porcentaje, la casuística de nuestro Centro en las coinfecciones dobles y en las triples.

**Tabla 41.** Listado de coinfecciones de dos virus durante el período analizado.

COINFECCION	N	%
Entero/Rinovirus+RSV	31	2.1
Gripe A H1N1 nv+Entero/Rino	13	0.93
Entero/Rino+Bocavirus	10	0.8
Adenovirus+Entero/Rino	9	0.6
Adenovirus+RSV	6	0.4
Coronavirus OC43+Entero/Rino	5	0.35
Coronavirus OC43+RSV	4	0.3
Entero/Rino+Para 1	3	0.2
Entero/Rino+Para 3	3	0.2
Entero/Rino+Para 3	3	0.2
Gripe A H1N1+RSV	3	0.2
Para 4 +RSV	3	0.2
Metapneumovirus+Adenovirus	2	0.1
Bocavirus+Adenovirus	2	0.1
Bocavirus+RSV	2	0.1
CoronaNL63+Metapneumovirus	2	0.1
Entero/Rino+Para 4	2	0.1
Entero/Rino+Metapneumovirus	2	0.1
Gripe A H1N1 nv+Adenovirus	1	0.08
Gripe A H1N1 nv+Metapneumovirus	1	0.08
Para 1+RSV	1	0.08
Para 3+Adenovirus	1	0.08
TOTAL	107	7.4

**Tabla 42.** Coinfecciones de tres virus durante el período de estudio

COINFECCIONES TRIPLES	N	%
Ent/Rino+Adenovirus+Bocavirus	2	0.1
RSV+Ent/Rino+Bocavirus	1	0.08
Ent/Rino+Adenovirus+Para4	1	0.08
Metapneumovirus+Ent/Rino+Bocavirus	1	0.08
Para 3+Ent/Rino+Bocavirus	1	0.08
Ent/Rino+Adenovirus+Metapneumovirus	1	0.08
TOTAL	7	0.5

En la siguiente figura, Figura 33, se representa la presencia de coinfecciones o no en función de la estación del año estudiada. Al estudiar estas dos variables se observa que en otoño ($n=51/44.7\%$) y en invierno ($n=55/48.2\%$) se producen la mayor parte de las coinfecciones produciéndose en verano y en primavera el mismo número ($n=4/3.5\%$) aunque, en datos absolutos, es verano donde menos se documentan, muestras positivas 282; coinfecciones 4. $p<0.001$.

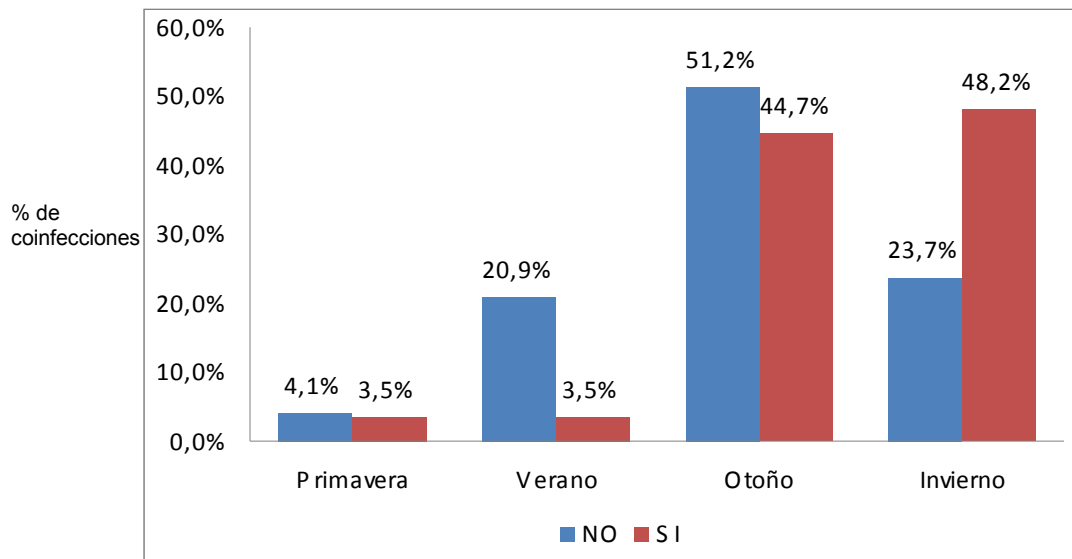


Figura 33. Distribución estacional acumulada de coinfecciones víricas respiratorias.

III. Estudio comparativo entre virus de la Gripe y otros virus Respiratorios

Por lo que hace referencia a la distribución comparativa de diferentes variables asociadas a las muestras categorizadas en función de la documentación de virus de la Gripe frente a otros virus respiratorios, cabe destacar, en primer término, que la edad media de los pacientes con gripe fue, 31,32 años, DS 21.82, la cual resultó ser significativamente superior a la de los pacientes en los que se detectaron otros virus respiratorios, 25.42 años, DS 28.90. La distribución por sexos fue equilibrada entre ambos grupos, correspondiendo en el caso de los virus de la gripe a una proporción varones/mujeres de 55.4%/44.6% y en el subgrupo de otros virus respiratorios de 54.8%/45.2%. En cuanto a la procedencia de las muestras del ámbito comunitario se recibieron el 17.2% de los virus de la gripe y sólo el 6.6% de otros virus respiratorios ($p < 0.001$). El balance de la procedencia de muestras hospitalarias se situó en el 82.4% para virus de la gripe y superior (92%) en el caso de otros virus respiratorios.

Un parámetro que traduce la eficiencia diagnóstica del laboratorio es el que hace referencia al tiempo de emisión de resultados; en este sentido del 82.9% de las muestras en las que se detectaron virus gripales se emitió el resultado en un tiempo igual o inferior a 2 días; resultando este parámetro superior en los casos en los que se documentaron otros virus respiratorios (89.5%). En el intervalo de 3 a 7 días se informó el 15.1% de los virus gripales, y el 9.9% del resto de virus respiratorios. La proporción de informes emitidos en tiempo mayor a una semana fue bajo en el caso de virus gripales (2%) y mínimo para otros virus respiratorios (0.6%). Todos estos datos se expresan en la Tabla 42.



Tabla 43. Distribución comparativa de diferentes variables asociadas a la categoría de las muestras en las que se documenta virus de la Gripe frente a otros virus respiratorios.

	Gripe	V. Respiratorios
Edad media (años).....	31,32	25,42*
Sexos (V/M)	55,4%/44,6%	54,8%/45,2%
Procedencia		
Comunitaria/Hospitalaria	17,2%/82,4%	6,6%/92%**
Tiempo de emisión de resultados***		
≤ 2 días	82,9%	89,5%
3 a 7 días	15,1%	9,9%
≥ 8 días	2,0%	0,6%

*P < 0.001.

**P < 0.001

*** P = 0.001

En la Figura 34, se representa la proporción de gripe y de otros virus respiratorios en función del sexo del paciente del cual recibimos la muestra. Como puede observarse el resultado no fue estadísticamente significativo ($p=0.820$) y se representa un porcentaje similar de varones y de mujeres en el caso de ser un resultado positivo a gripe como a otro virus respiratorio.

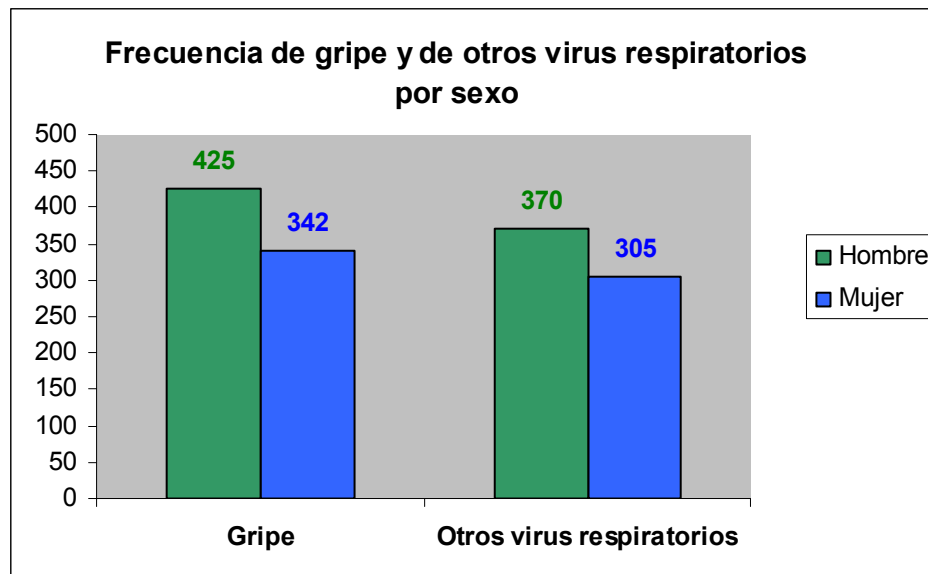


Figura 34. Distribución por sexos de gripe y de otros virus respiratorios.

En la figura 35, analizamos los resultados positivos por trimestres a lo largo de los 25 meses de estudio. Fue en el cuarto trimestre del año la época donde las detecciones positivas tanto para gripe ($n=426$) como para otros virus respiratorios ($n=306$) fueron más numerosas, seguidas del primer trimestre, aunque en este caso, la mayor parte de las detecciones positivas son debidas a otros virus respiratorios ($n=246$), virus gripales ($n=124$). En el tercer trimestre del año, fueron los virus de la gripe ($n=214$) los que tienen un porcentaje más elevado, 75.9% de detecciones positivas, y finalmente en los meses de Abril, Mayo y Junio documentamos 4 virus gripales frente a 55 muestras positivas para otros virus respiratorios.

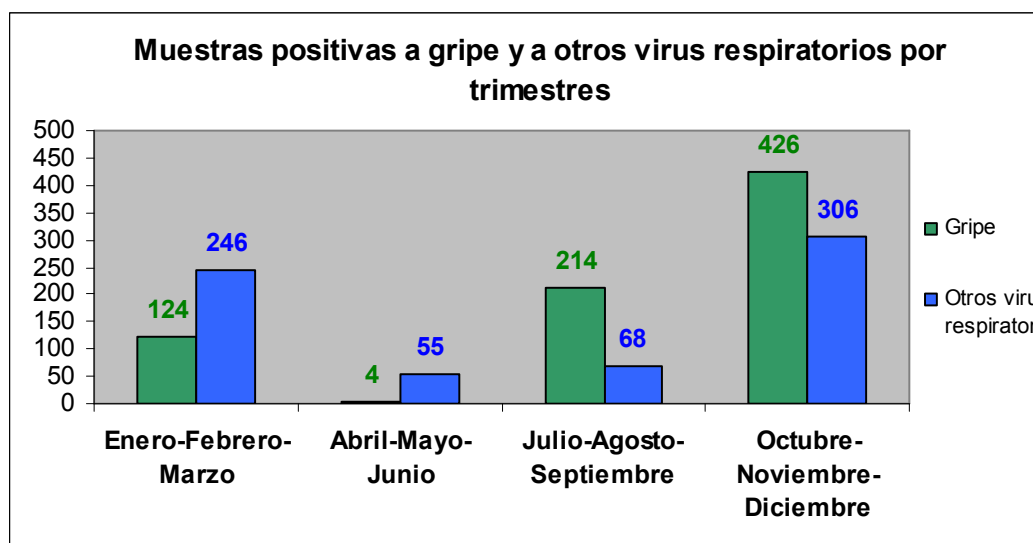


Figura 35. Distribución trimestral de detecciones positivas de gripe y otros virus respiratorios.

Por el interés que reviste nuestra actividad como Centro de Referencia en Gripe presentamos en la Figura 36 la categorización de muestras recibidas en función de su positividad o no a virus gripales, desagregadas por provincias. Destaca, en primer lugar, la provincia de Valladolid, con un total para virus gripales de 284 muestras positivas y 263 para otros virus respiratorios. Le sigue en frecuencia la provincia de Burgos, pero en este caso, resultó ser mayor el número de muestras positivas para otros virus respiratorios ($n=211$) que para virus gripales ($n=163$). En el resto de provincias, con menor recuento, destaca que en todas ellas el número de muestras positivas para virus gripales que es mayor que para otros virus respiratorios, a excepción de Soria, donde presentaron la misma frecuencia.

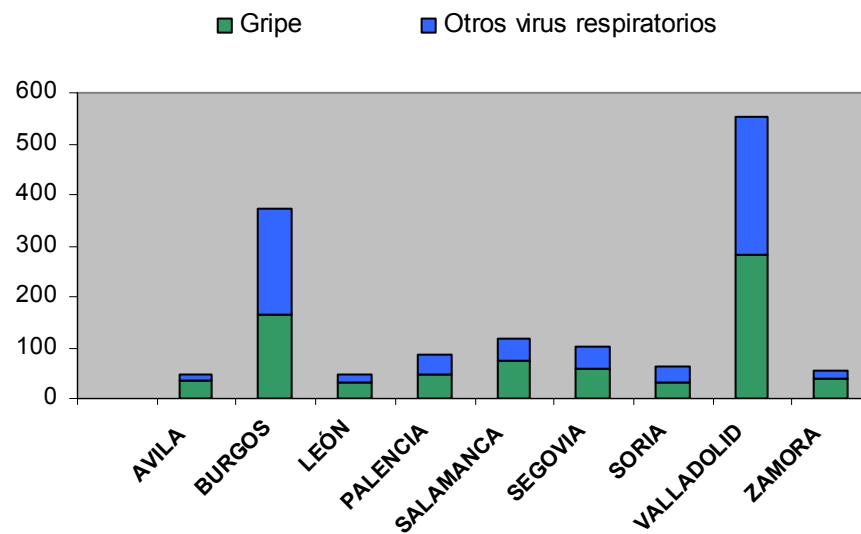


Figura 36. Distribución por provincias de detección de v. de la gripe y otros virus respiratorios.

En cuanto a la información remitida en las solicitudes de determinación de pruebas de detección de virus respiratorios hemos podido analizar 747 volantes de petición. De ellos sólo en 114 (15.3%) se reflejaba la fiebre como signo clínico acompañante, 55 (48.2%) correspondieron a muestras en las que se identificaron virus gripales y 59 (51.8%) a muestras en las que se documentaron otros virus respiratorios, la relación no fue estadísticamente significativa. La patología más frecuente que se refirió en los volantes de petición fue la bronconeumonía (n=245, 32.8%); tal patología se documentó en 89 (36.3%) pacientes cuya positividad correspondió a virus gripales y en 156 (63.7%) la detección positiva correspondió a otros virus respiratorios. En cuanto a los pacientes, que en su volante figuraba, que presentaban una infección respiratoria (n=190, 25.4%), se detectaron 105 (55.2%) muestras positivas para virus de la gripe y 85 (44.8%) para otros virus respiratorios.



De manera deliberada hemos procedido a analizar nuestros resultados categorizándolos de modo dicotómico para cada uno de los cuatro grandes agentes implicados en la etiología de las muestras procesadas. Por lo que hace referencia a la Gripe en la Tabla 44 y en la Figura 37 se representan los porcentajes de positividad documentados en los 9 trimestres estudiados, oscilando entre el 0 % y el 79.5%, lo cual alude a una amplia variabilidad.

Tabla 44. Distribución trimestral porcentual de la correlación de muestras positivas para Gripe y otros virus respiratorios.

AÑO	TRIMESTRE	GRIPE	
		NO*	SI
2009	2 T.	50,0%	50,0%
	3 T.	20,5%	79,5%
	4 T.	39,2%	60,8%
2010	1 T.	91,7%	8,3%
	2 T.	90,9%	9,1%
	3 T.	92,9%	7,1%
	4 T.	64,5%	35,5%
2011	1 T.	54,4%	45,6%
	2 T.	100,0%	0,0%

*NO: Detección de algún virus respiratorio en ausencia de detección de v. de la Gripe

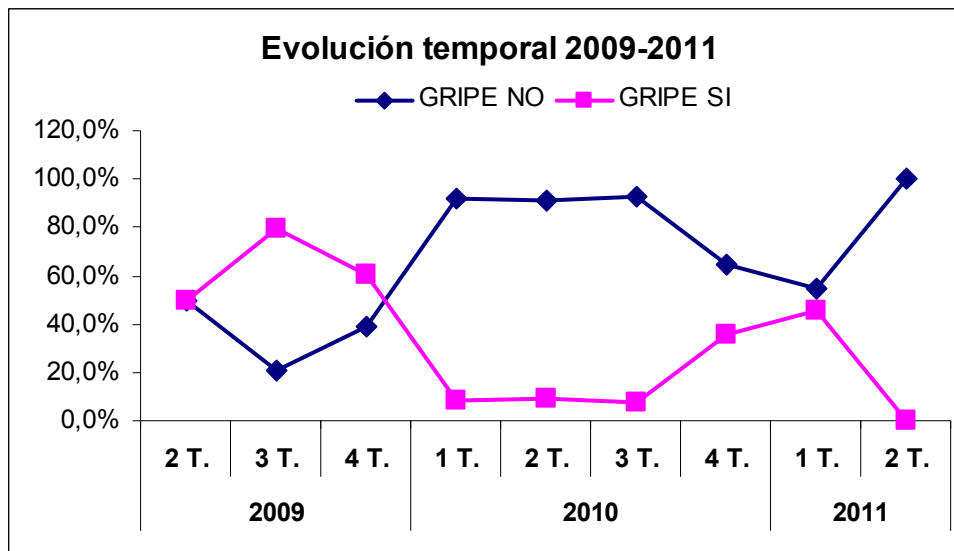


Figura 37. Evolución temporal para las detecciones positivas de gripe y de otros virus respiratorios.

Haciendo referencia a los Virus Parainfluenza, se presenta la Tabla 45 y la Figura 38, destacan con mayor proporción el 2ª (18.2%) y 3ª trimestre (21.4%) del año 2010, el resto de trimestres representan poca frecuencia y variabilidad.

Tabla 44. Distribución temporal por trimestres de muestras positivas para virus Parainfluenza y muestras positivas para otros virus respiratorios.

AÑO	TRIMESTRE	Para	
		NO	SI
2.009	2 T.	83,3%	16,7%
	3 T.	93,7%	6,3%
	4 T.	93,4%	6,6%
	1 T.	96,7%	3,3%
2.010	2 T.	81,8%	18,2%
	3 T.	78,6%	21,4%
	4 T.	92,1%	7,9%
	1 T.	96,8%	3,2%
2.011	2 T.	85,7%	14,3%

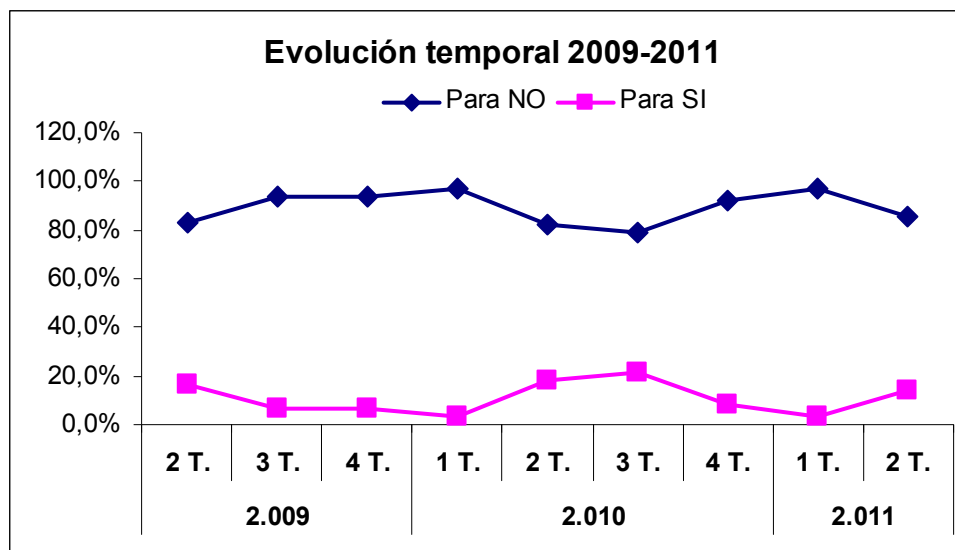


Figura 38. Evolución temporal para las detecciones positivas de virus Parainfluenza y de otros virus respiratorios.

El Virus Respiratorio Sincitial (VRS) muestra en la Tabla 46 y en la Figura 39 muestra, claramente, un predominio invernal con detecciones del 49.2% en el 1 T del año 2010 y 11.2% en el 1 T de 2011. En los dos trimestres otoñales estudiados (2009 y 2010), su representación está en torno al 10%.

Tabla 46. Distribución temporal por trimestres de muestras positivas para Virus Respiratorio Sincitial (VRS) y muestras positivas para otros virus respiratorios.

AÑO	TRIMESTRE	VRS	
		NO	SI
2009	2 T.	100,0%	0,0%
	3 T.	100,0%	0,0%
	4 T.	89,8%	10,2%
2010	1 T.	50,8%	49,2%
	2 T.	100,0%	0,0%
	3 T.	100,0%	0,0%
2011	4 T.	90,8%	9,2%
	1 T.	88,8%	11,2%
	2 T.	100,0%	0,0%

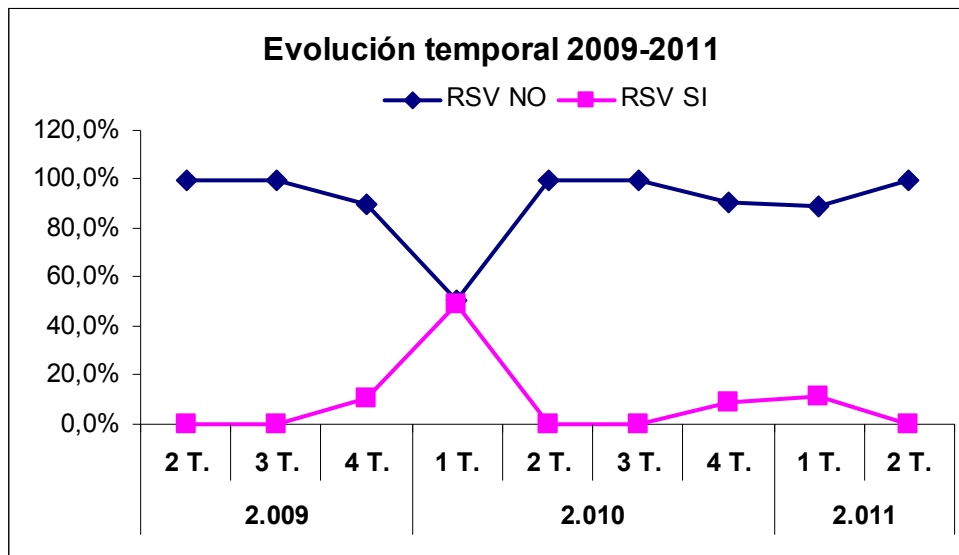


Figura 39. Evolución temporal para las detecciones positivas de Virus respiratorio sincitial (VRS) y de otros virus respiratorios.

Al analizar el rinoenterovirus, en la Tabla 47 y en la Figura 40, se representan de manera comparativa las detecciones de rinoenterovirus frente al resto de virus respiratorios y se observa la positividad en todos los trimestres estudiados oscilando del 14.9% en el 3T de 2009 hasta el 71.4 % en el 2T de 2011.

Tabla 47. Distribución temporal por trimestres de muestras positivas para rinoenterovirus y muestras positivas para otros virus respiratorios.

AÑO	TRIMESTRE	Rinoenterovirus	
		NO	SI
2.009	2 T.	66,7%	33,3%
	3 T.	85,1%	14,9%
	4 T.	73,8%	26,2%
2.010	1 T.	63,3%	36,7%
	2 T.	54,5%	45,5%
	3 T.	42,9%	57,1%
	4 T.	56,6%	43,4%
2.011	1 T.	75,2%	24,8%
	2 T.	28,6%	71,4%

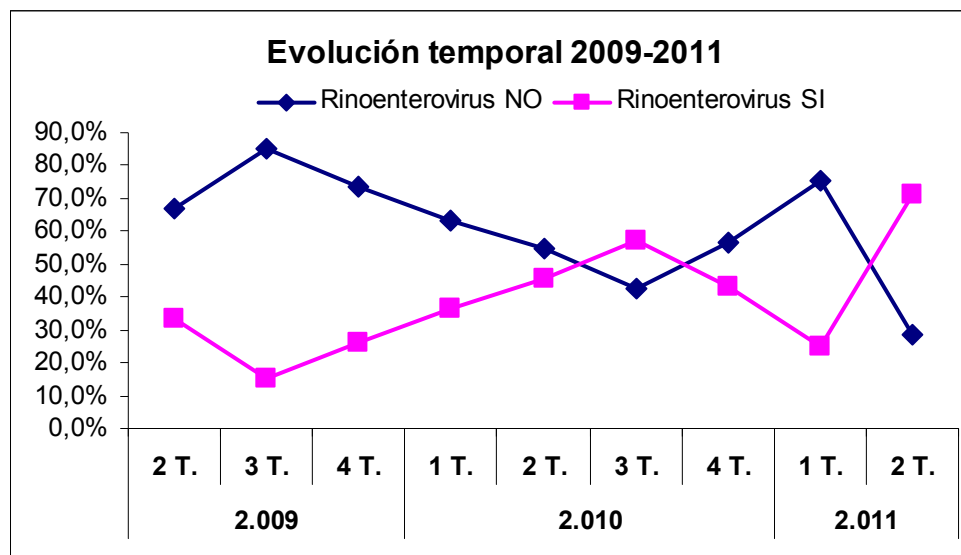


Figura 40. Evolución temporal para las detecciones positivas de Rinoenterovirus y de otros virus respiratorios.

De manera complementaria a lo expuesto anteriormente, hemos procedido a representar en la Figura 41 el universo de positividades por trimestres en las siguientes categorías: Gripe, Rino/Enterovirus, VRS, Virus Parainfluenza y resto de virus respiratorios. En lo que respecta a la Gripe observamos un porcentaje muy alto en el periodo pandémico del año 2009 alcanzando su máxima representatividad en el tercer trimestre del año (78%). Rinoenterovirus tiene representación en todos los periodos estudiados oscilando su frecuencia entre el 15% y el 64%. Al analizar Virus Parainfluenza observamos que, como en Rinoenterovirus, tiene representación en todos los trimestres estudiados pero con una frecuencia más baja y homogénea (3%-20%). VRS, con su claro predominio invernal alcanzó su pico de frecuencia en Enero-Febrero-Marzo de 2010 (41%). De manera global se representa, en una porción de la figura, el resto de virus respiratorios, y se muestra de manera muy gráfica que en el periodo pandémico de 2009 la frecuencia es menor o igual al 2% mientras que en el año 2010 y 2011 la representación tiene poca oscilación y se sitúa en torno al 20%.

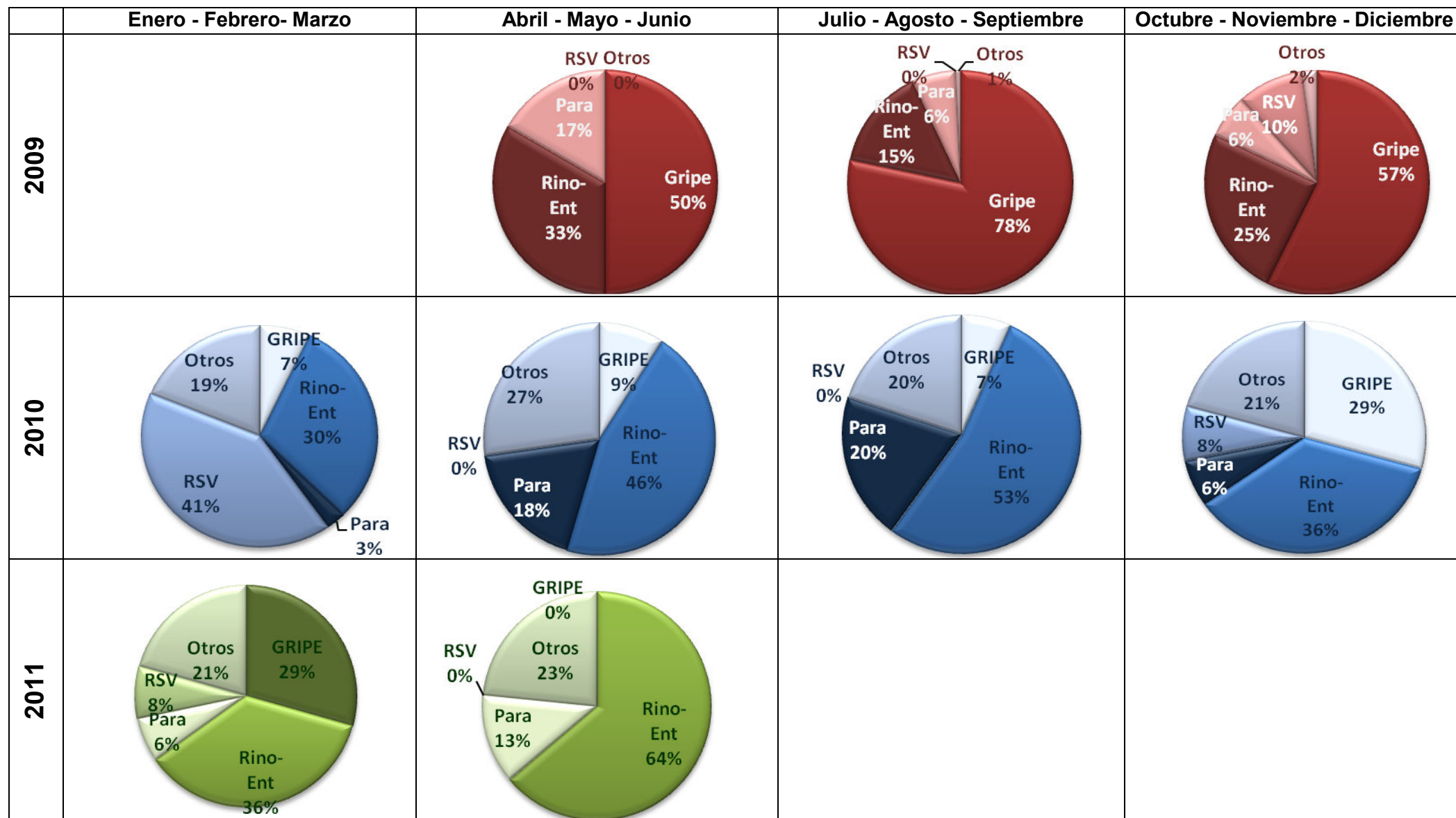


Figura 41: Evolución temporal para la detección positiva de gripe, virus Parainfluenza, Rinoenterovirus y VRS desagregadas por trimestres y años.

IV. Perfil de los cuadros en los que se ha documentado virus gripales atendidos en el Hospital Clínico de Valladolid.

De manera más exhaustiva se han analizado las muestras que fueron positivas que correspondían a pacientes atendidos en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

Se han analizado un total de 262 muestras que al ser procesadas por los métodos expuestos en el capítulo correspondiente, resultaron positivas para gripe o para algún virus respiratorio.

Desglosando los resultados en función del virus al cual fueron positivas obtuvimos un total de 121 positivas para gripe, 127 positivas para otros virus respiratorios y 14 coinfecciones. Todos los resultados positivos a gripe correspondieron a gripe A H1N1 pdm.

En la Tabla 48, se describen las muestras positivas de nuestro hospital con una serie de variables epidemiológicas y clínicas. En lo referente a la edad media obtuvimos una edad mayor para muestras positivas a gripe (35.37) que para las otras dos categorías, siendo la edad media de 5 años para los pacientes coinfectados. Analizando el sexo, vemos un número mayor de pacientes varones en positivos a virus de la gripe que en positivos a otros virus respiratorios. Al analizar la estancia en Unidad de Cuidados Intensivos se observó la misma proporción en virus de la gripe que en otro virus respiratorio y no ingresó ningún paciente que tuvo coinfección. Finalmente se estudió la utilización de antibioterapia en estos pacientes; el 50% de los pacientes en los que se detectó virus de la gripe se utilizó algún antibiótico, porcentaje similar en los coinfectados y se utilizó en menor medida (46 pacientes frente a 81) en los que se detectó otro virus respiratorio.

Tabla 48. Detecciones positivas del Hospital Clínico Universitario categorizadas por diferentes variables epidemiológicas y clínicas.

	GRIPE	OTROS VIRUS	COINFECCIONES	p-valor
Edad	35,4 ± 23,5	31,0 ± 29,8	5,0 ± 14,4 *	<0,001
Días de Estancia	9,3 ± 13,0	11,18 ± 10,3	5,7 ± 4,1 **	0,009
Sexo (Mujeres)	56 (46,7%)	67 (52,8%)	5 (35,7%)	0,374
UCI (SI)	13 (14,6%)	14 (15,9%)	0 (0%)	0,364
Tratamiento (SI)	60 (72,3%)	46 (52,3%)	6 (60%)	0,026

* Diferencia estadísticamente significativa entre Coinfecciones con respecto a gripe y otros virus.

** Diferencia estadísticamente significativa entre Coinfecciones con respecto a otros virus.



V. Resultados del Control de Calidad de la OMS.

Como ya se comentó en el capítulo correspondiente a Material y Métodos, en los 25 meses de estudio se procesaron 4 paneles enviados por la OMS al Centro de Gripe adscrito a la Universidad de Valladolid. Cada panel recibido consta de 10 muestras en el caso de los dos primeros paneles expuestos (Panel 7 y 8) y 12 muestras en los paneles recibidos posteriormente (Panel 9 y 10).

En la Tabla 49 se muestran los resultados que fueron enviados tras su proceso. Mención especial requiere el Panel 9 en el que, tras un fallo en el procesamiento, se enviaron 3 muestras positivas para virus gripal A sin subtipar (untyped), posteriormente fue enviado de nuevo el resultado, dando como positivo un subtipo H5.

En las Figuras 42, 43, 44 y 45 se representan el reporte con los resultados que se envían tras su análisis.



Tabla 49. Resumen comparativo de los resultados obtenidos en los cuatro paneles de la OMS procesados en el período de estudio.

PANEL 7 (18/01/2010)	PANEL 8 (14/06/2010)	PANEL 9 (10/01/2011)	PANEL 10 (20/06/2010)
2010/1= H1	2010/11= Flu B	2011/1= A Untyped	2011/11= Flu B
2010/2= H5	2010/12= H1 pdm N1	2011/2= Ø	2011/12= H5
2010/3= H3N2	2010/13= H5	2011/3= Ø	2011/13= Flu B
2010/4= H5	2010/14= H3	2011/4= H1 pdm N1	2011/14= H5
2010/5= H1 pdm N1	2010/15= H5	2011/5= H1 pdm N1	2011/15= H3
2010/6= H5	2010/16= Ø	2011/6= A Untyped	2011/16= H5
2010/7= Flu B	2010/17= H1	2011/7= A Ø	2011/17=H1 pdm N1
2010/8= H5	2010/18= H5	2011/8= Flu B	2011/18= H5
2010/9= Ø	2010/19= H5	2011/9= H3	2011/19= Ø
2010/10= H1 pdm N1	2010/10= H1 pdm N1	2011/10= A Untyped	2011/10=H1 pdm N1
		2011/V01= H1	2011/V03=AUntyped
		2011/V02= H3	2011/V04=AUntyped



6. Result Form-Panel 7

Lab code: 223

Date ^a of dispatch:	18/01/2010
Deadline for submitting results:	23/02/2010
Date panel received:	29/01/2010
Date testing started:	4/2/2010
Date testing completed:	23/2/2010
Date results reported:	15/2/2010
Tests performed by:	
Results reported by:	<u>FAX</u>

^a The format of the date is dd/mm/yyyy.

Sample Number	Overall results	NA subtyping if performed	Sample Number	Overall result	NA subtyping if performed
2010-01	FluA Pos <input checked="" type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	2010-06	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input checked="" type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____
2010-02	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input checked="" type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	2010-07	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input checked="" type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____
2010-03	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input checked="" type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input checked="" type="checkbox"/> <u>N2</u> <input type="checkbox"/> _____	2010-08	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input checked="" type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____
2010-04	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input checked="" type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	2010-09	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input checked="" type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____
2010-05	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input checked="" type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input checked="" type="checkbox"/> <u>N1</u> <input type="checkbox"/> _____	2010-10	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input checked="" type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input checked="" type="checkbox"/> <u>N1</u> <input type="checkbox"/> _____

If the FluB assay was not performed, leave the boxes 'Pos' and 'Neg' as blank.

Figura 42. Resultados emitidos en el Panel 7 OMS.



6. Result Form-Panel 8

Lab code: 223

Date of dispatch:	14/06/2010
Deadline for submitting results:	20/07/2010
Date panel received:	_ / _ /2010
Date testing started:	_ / _ /2010 <i>24/junio</i>
Date testing completed:	_ / _ /2010 - <i>8/julio</i>
Date results reported:	_ / _ /2010 - <i>12/julio</i>
Tests performed by:	<i>Dr. R. M. MORALES y Dr. E. ROS</i>
Results reported by:	<i>Dr. LEJARRU</i>

^ The format of the date is dd/mm/yyyy.

Sample Number	Overall results	NA subtyping if performed	Sample Number	Overall result	NA subtyping if performed
2010-11	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	2010-16	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____
2010-12	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input checked="" type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input checked="" type="checkbox"/> <u>NA</u> <input type="checkbox"/> _____	2010-17	FluA Pos <input checked="" type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____
2010-13	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input checked="" type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	2010-18	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input checked="" type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____
2010-14	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input checked="" type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	2010-19	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input checked="" type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input checked="" type="checkbox"/> <u>NA</u> <input type="checkbox"/> _____
2010-15	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input checked="" type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	2010-20	FluA Pos <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input checked="" type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA nontypeable <input type="checkbox"/> FluA Neg FluB <input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____

Figura 43. Resultados emitidos en el Panel 8 OMS.



7. Result Form-Panel 9

Lab code: 223

Date of dispatch:	10/01/2011
Deadline for submitting results:	15/02/2011
Date panel received:	12/01/2011
Date testing started:	20/01/2011
Date testing completed:	27/01/2011
Date results reported:	14/01/2011
Tests performed by:	11/2/11
Results reported by:	

* The format of the date is dd/mm/yyyy.

Sample Number	Overall results	NA subtyping if performed	Sample Number	Overall result	NA subtyping if performed
2011-01	FluA <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input checked="" type="checkbox"/> HA untyped	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	2011-06	FluA <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input checked="" type="checkbox"/> HA untyped	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
2011-02	FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg		2011-07	FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	
2011-03	FluA <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA untyped	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	2011-08	FluA <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA untyped	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
2011-04	FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg		2011-09	FluB <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	
2011-05	FluA <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H3 <input checked="" type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA untyped	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	2011-10	FluA <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H5 <input checked="" type="checkbox"/> HA untyped	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
V01-2011	FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg		V02-2011	FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	

Pos, positive; Neg, negative.

Figura 44. Resultados emitidos en el Panel 9 OMS.



1-06-13

WHO External Quality Assessment Programme for the Detection of Influenza Virus Type A by PCR
 GUV-PTP-TRM-WHO-EQA-RES-01-P10-2011-06-13

7. Result Form-Panel 10

Lab code: 223

Date of dispatch:	20/06/2011
Deadline for submitting results:	26/07/2011
Date panel received:	22/6/2011
Date testing started:	27/6/2011
Date testing completed:	14/7/2011
Date results reported:	12/7/2011
Tests performed by:	S. ROJO y R. AMANJA
Results reported by:	MAIJA PINEDO

^ The format of the date is dd/mm/yyyy.

Sample Number	Overall results	NA subtyping if performed	Sample Number	Overall result	NA subtyping if performed
2011-11	FluA <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA untyped FluB <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	2011-16	FluA <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H3 <input checked="" type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA untyped FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
2011-12	FluA <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H3 <input checked="" type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA untyped FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	2011-17	FluA <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H3 <input checked="" type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA untyped FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
2011-13	FluA <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA untyped FluB <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	2011-18	FluA <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H3 <input checked="" type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA untyped FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
2011-14	FluA <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H3 <input checked="" type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA untyped FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	2011-19	FluA <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA untyped FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
2011-15	FluA <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H1pdm <input checked="" type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA untyped FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	2011-20	FluA <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H1pdm <input type="checkbox"/> H3 <input checked="" type="checkbox"/> H5 <input type="checkbox"/> HA untyped FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
V03-2011	FluA <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input checked="" type="checkbox"/> HA untyped FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	V04-2011	FluA <input checked="" type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg <input type="checkbox"/> H1 <input type="checkbox"/> H3 <input type="checkbox"/> H1pdm <input checked="" type="checkbox"/> HA untyped FluB <input type="checkbox"/> Pos <input checked="" type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Pos, positive; Neg, negative.

Figura 45. Resultados emitidos en el Panel 10 OMS.



VI. Utilización de Oseltamivir en el tratamiento de la Gripe A H1N1 pdm 2009 en pacientes del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

Durante el periodo de estudio se evaluó la adherencia al protocolo de actuación ante casos de gripe por el virus A H1N1nv, según las directrices del Ministerio de Sanidad y Consumo y de la Comunidad Autónoma: tratamiento a todos los pacientes con al menos un factor de riesgo de presentar una enfermedad grave y sin que sea requisito, para el inicio de tratamiento, la conformidad del laboratorio de Microbiología.

Se realizó un estudio observacional, retrospectivo de cinco meses de duración (Octubre 2009 - Marzo 2010) y se incluyeron todos los pacientes ingresados y los atendidos en el Servicio de Urgencias del Hospital tratados con oseltamivir.

Se registraron los datos de filiación de los pacientes y las siguientes variables: dosis y pauta del antiviral, criterios de riesgo de los pacientes, antibioticoterapia asociada, registro del diagnóstico microbiológico en el programa "Informes" del hospital.

Se recibieron 87 prescripciones por protocolo. Se trataron 87 pacientes, 57 hombres y 30 mujeres, con una edad media de 48 años.

74/87 tenían un criterio clínico de tratamiento, 10/74 presentaron más de un factor de riesgo. En más de la mitad de los pacientes, 40/74, el factor de riesgo está asociado a patologías respiratorias crónicas. 80/87 pacientes reciben tratamiento con dosis y pauta habitual, 75 mg/12h; a 3/87 pacientes se les administra 150 mg/12 h, dos de ellos ingresan en la Unidad de Cuidados Intensivos y el tercero es un paciente ingresado por el Servicio de Hematología en tratamiento con quimioterapia. 4/87 pacientes recibieron dosis plenas aunque tenían un aclaramiento de creatinina comprendido entre 10-50 ml/minuto.



58/74 pacientes recibieron otros antibióticos, además de oseltamivir; 37/58 fueron tratados con uno sólo y 21/58 con más de uno. En los sistemas de información del hospital no están registrados los datos farmacoterapéuticos de 16/87 pacientes, se dan de alta desde el Servicio de Urgencias o ingresan en unidades sin un Sistema de Distribución de Medicamentos en Dosis Unitaria. De las 64 pruebas de confirmación de gripe A solicitadas al Servicio de Microbiología sólo 8 fueron positivas.

Se dispensaron desde el Servicio de Farmacia: 630 cápsulas de Tamiflu® 75mg, 23 soluciones de oseltamivir 50 mg/ml y 3 soluciones de Tamiflu® 12 mg/ml).

En el 85% (74/87) de las sospechas por gripe A los clínicos se adhedieron al protocolo y se prescribió oseltamivir en pacientes con factores de riesgo asociado.

Sólo el 12,5% (8/64) de las muestras enviadas al Servicio de Microbiología del hospital fueron positivas.

Por cada caso de gripe A confirmada microbiológicamente se trataron en nuestro hospital, con el antiviral oseltamivir, a 11 pacientes.



DISCUSIÓN



La discusión de los resultados obtenidos la llevaremos a cabo en distintos apartados enumerados en su desarrollo posteriormente.

En primer lugar, es preciso considerar las características de la muestra poblacional incluida en el estudio, para poder efectuar una interpretación correcta de nuestros hallazgos.

A continuación, analizaremos las variables relativas al diagnóstico de Gripe y de otros virus respiratorios, aludiendo al perfil de la demanda atendida.

Seguidamente, presentaremos las aportaciones documentadas en la distribución comparativa de la Gripe frente a otros virus respiratorios así como el perfil de los cuadros gripales atendidos en nuestro centro.

Por último, se discutirán los resultados de los controles de calidad procedentes de la OMS que se realizaron en el periodo de estudio.



1.- ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA POBLACIONAL ESTUDIADA.

La población de nuestro estudio se caracteriza por proceder de 11 áreas sanitarias del Sistema regional de salud de Castilla y León. La proporción de sexos presenta un ligero balance a favor de los varones (55.1%) y un rendimiento diagnóstico global del 40.14%. No es por tanto una muestra homogénea, sino que presenta el sesgo inherente a la atención de la demanda que se ha ejercido sobre un laboratorio que actúa como centro de referencia en Gripe en nuestra Comunidad Autónoma. En cuanto a la edad de los pacientes de las muestras recibidas y procesadas es el rango de los adultos entre 14 y 65 años donde se tiene más representación (47%) y parece lógico que sea así por ser el intervalo más amplio, seguidos por las muestras pediátricas entre 1 y 13 años con un 22.5% destacando el 17.3% de muestras de lactantes menores de un año de edad.

La demanda procedente de las dos áreas sanitarias de Valladolid seguida de la de Burgos obedece con elevada probabilidad a la propia configuración física y asistencial de la red sanitaria que responde a la emergencia de la Gripe pandémica. Diversos autores han realizado en nuestro país estudios descriptivos sobre el diagnóstico de gripe A H1N1 con diferentes enfoques: estudios epidemiológicos en el contexto asistencia⁹², análisis de variables clínicas asociadas al diagnóstico en distintos grupos de población⁹³ y descripción de marcadores pronósticos^{94,95}, hallazgos circunscritos a los propios aislados víricos o incluso comparación de técnicas diagnósticas en el contexto del periodo pandémico y postpandémico⁹⁶.

El número de pacientes incluidos en dichas investigaciones es muy variable y en algunas se obtiene a expensas del análisis de series multicéntricas^{94, 97-100}.

No hemos encontrado trabajos que analicen de forma consecutiva los resultados de la demanda asistencial a la que se somete a un sólo centro. Es por ello, por lo que nuestro estudio tiene una relevancia mayor, ya que se analiza toda la población atendida en un centro de diagnóstico, obteniendo así una visión de conjunto de dos años consecutivos dividiendo el estudio para algunas variables en dos periodos diferenciados, periodo pandémico y periodo postpandémico.

Tal y como hemos avanzado, la mayor parte de las peticiones que se recibieron en nuestra serie procedían de pacientes hospitalizados (74.3%), lo cual confiere un matiz comparable a las aportaciones realizadas por otros grupos españoles¹⁰¹⁻¹⁰⁴ y extranjeros¹⁰⁵.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto podemos concluir que el diagnóstico de Gripe y de otros virus respiratorios en el periodo pandémico y postpandémico se centró en pacientes hospitalizados, mayoritariamente adolescentes y adultos entre 14 y 65 años, siendo para mayores de 65 años mucho menos frecuente. A pesar de las indicaciones al respecto, en más de la mitad de los volantes de petición no constaba la patología ni otros datos relevantes. Además, el diagnóstico etiológico viral se consiguió en 4 de cada 10 pacientes referidos correspondiendo en general a infecciones causadas por un único virus respiratorio, siendo mayoritarias las debidas al virus de la gripe. Las coinfecciones se encontraron en un porcentaje muy inferior, aunque no desdeñable, en menos de 1 de cada 10 pacientes.



Parece lógico que los frotis faríngeos sean las muestras que constituirían el mayor volumen de demanda diagnóstica (56.6%), seguidos por los lavados nasofaríngeos (20.2%) en correspondencia con las normas y protocolos de obtención de muestras diagnósticas que se redactaron para la asistencia de los pacientes potencialmente infectados desde el inicio de la pandemia (Diagnóstico microbiológico de las infecciones por virus respiratorios SEIMC, 2ª Edición 2008, Protocolo de diagnóstico virológico H1N1)¹⁰⁶.

De acuerdo con el perfil de pacientes que ingresaron en unidades hospitalarias, cabe apuntar que las muestras se diversificaron y el porcentaje de éstas se situó en una proporción pequeña (2.5%) del total. En este sentido las series del Grupo de trabajo del Proyecto CIBERESP¹⁰⁴ que tras realizar un estudio de casos y controles describen los resultados de 37 hospitales de 7 Comunidades autónomas y reflejan los aspectos epidemiológicos, clínicos e, incluso, farmacológicos para pacientes hospitalizados y el riesgo de complicarse con una neumonía bacteriana secundaria tras padecer una Gripe.

Al tratarse nuestra aportación de los hallazgos diagnósticos en un colectivo de personas a las que se les solicita una investigación de virus respiratorios a lo largo del tiempo, se destaca que fueron los meses de Octubre a Enero aquellos en los que se atendió la principal demanda diagnóstica; como corresponde a la experiencia habitual de los grupos que atienden patología respiratoria infecciosa¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Un matiz específico de nuestra serie reside en el hecho de que se inicia en el mes de Mayo de 2009 coincidiendo con la emergencia del virus de la Gripe



pandémica, lo cual motiva que en el conjunto, este mes, suponga el 2.4% de la demanda diagnóstica; y que al compararlo con los meses de Mayo

postpandémico la proporción de la demanda sea mayor. No existen muchos estudios que abarquen periodos cronológicos de tres años desde el inicio de una pandemia de gripe, lo cual constituye un elemento de ayuda para entender en su conjunto la etiología y diagnóstico de las infecciones respiratorias víricas.

En resumen, se puede concluir que la tasa de rendimiento diagnóstico de todos los virus respiratorios, incluida la Gripe, fue superior en el primer año de circulación del virus pandémico, probablemente debido a una mejor caracterización clínica de las peticiones diagnósticas.



2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS TRAS EL DIAGNÓSTICO DE GRIPE Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS.

Tras haber explicado en el capítulo de resultados las diferencias que se presentan de los datos positivos para Gripe y para otros virus respiratorios y los dos periodos analizados; estos muestran que en el periodo pandémico se obtuvieron el 73.1% de muestras positivas del estudio, que corresponde a un total de 1055 muestras positivas. Mientras que en el periodo postpandémico el se diagnosticaron solo el 26,9 % del conjunto de muestras positivas del estudio (389 muestras positivas). En el estudio de manera global, se encontraron 1443 muestras positivas, de las cuales el 51.5% correspondieron a virus de la gripe, 40.6% a virus respiratorios y el 7.9% restante a coinfecciones bien fueran de virus de la Gripe con otros virus respiratorios u otros virus respiratorios entre sí, datos que coinciden con otros estudios realizados de ámbito nacional e internacional¹¹⁰⁻¹¹².

Al analizar las muestras positivas en función del año, es en 2009 donde más detecciones positivas obtuvimos tanto para Gripe como para otros virus respiratorios, seguidos en el año 2011. A pesar de que no existen muchas publicaciones que comuniquen series trianuales como la presente, es de destacar la variabilidad existente en la actividad diagnóstica comunicada por diferentes grupos y desde diversos enfoques^{113,114}.

Un hecho original de nuestra serie es el relativo escaso volumen de muestras recibidas en el año 2010, que en conjunto representa menos de la tercera parte de los productos procesados en el año precedente, hallazgo no reflejado en la literatura hasta donde hemos podido revisar. Al reflejar nuestro trabajo la actividad constante de un laboratorio en el diagnóstico etiológico de la infección por virus respiratorios, dicho hallazgo, puede traducir la escasa actividad clínica



en cuadros de esta focalidad posteriores a la circulación de un virus gripal pandémico.

Cuando abordamos nuestros hallazgos considerando el protagonismo proporcional que han mantenido los virus de la gripe frente al resto de virus respiratorios, podemos afirmar, que en el año 2009 la actividad del virus de la Gripe duplicó la presentada por el resto de virus, si bien en los dos años siguientes, éstos últimos superaron a la de los virus gripales. Tal y como hemos comentado en el párrafo precedente, el año 2010 fue de particular escaso rendimiento en términos de actividad gripal, donde la proporción de virus respiratorios superó en cinco veces a la de los virus gripales. Diversas series españolas¹¹⁵⁻¹¹⁷ han establecido aportaciones relevantes en la caracterización y vigilancia de los virus gripales pero no conocemos trabajos que aborden en su conjunto el comportamiento de todos los virus respiratorios, por lo que este estudio tiene un valor añadido. Se ha postulado el protagonismo que alcanzan las denominadas variantes mayores¹¹⁸ que emergen como virus pandémicos pero se desconoce más, por razones obvias, acerca del comportamiento a medio plazo de la nueva variante pandémica. Por otra parte, la creciente disponibilidad de herramientas de diagnóstico molecular^{106,119-123} para diagnosticar nuevos virus respiratorios posibilita la realización de estudios prospectivos más amplios desde el punto de vista etiológico a partir del momento actual pero limita su comparación con series consideradas históricas⁶⁹. Un hecho adicional a considerar es que, si bien en los adultos las infecciones respiratorias de origen vírico son una causa importante de morbilidad, sin embargo los cuadros clínicos que demandan atención médica se circunscriben a pacientes con patología de base, inmuno-deprimidos o en edades extremas de la vida, niños y ancianos, y es por ello, por lo que la proporción de agentes etiológicos no está en relación con su propia circulación¹²⁴.



En consonancia con lo expresado anteriormente los resultados de este trabajo, demuestran que el mayor volumen de resultados positivos para virus respiratorios y gripe acontece en un rango amplio de edad. Este hecho puede

asociarse a que nuestro laboratorio ofrece diagnóstico virológico de manera global sin discriminar la gravedad de la patología que la motiva, a un amplio territorio de nuestra comunidad autónoma y en un contexto tanto asistencial rutinario como asistencial especial en el curso de la pandemia de gripe que minoritariamente contenía casos que provenían de la Red Centinela Sanitaria de Gripe.

El mayor número de muestras positivas, en el contexto de esta serie corresponde a la edad pediátrica, hecho que concuerda con lo comunicado por diversos grupos en nuestro entorno¹²⁵⁻¹²⁹. Muchos de los trabajos publicados en series pediátricas corroboran nuestra observación y ponen de manifiesto que la incorporación de herramientas de diagnóstico molecular al diagnóstico de infecciones respiratorias permiten describir múltiples agentes que acompañan y/o coexisten con los virus gripales^{107,112,119,127,130,131} en población infantil.

Cuando efectuamos la agrupación de las muestras positivas por trimestres es el cuarto del año, coincidiendo con el otoño, el que agrupa más de la mitad de las mismas, seguido en frecuencia por el primero (invierno), este hecho resulta convencional en el contexto de la actividad diagnóstica de virus respiratorios¹³². El hallazgo de una proporción notable en el trimestre estival se encuentra en relación con la diseminación en la circulación del virus pandémico, hecho que en la serie que presentamos es notorio aunque en el análisis temporal puede resultar diluido.



Cabe valorar en este apartado la distribución de los hallazgos de los diferentes virus gripales, que en nuestra serie estuvieron mayoritariamente representados por el virus de la gripe A H1N1 nueva variante al que pertenecieron 19 de cada 20 virus detectados. La proporción restante la ocuparon virus de la gripe B y en una proporción mínima virus de la gripe A H3N2 y A H1N1 estacionales. Al igual que se ha publicado en otras series contemporáneas con nuestro trabajo¹³³. Este estudio demuestra la constancia en la circulación del virus pandémico y la documentación esporádica del virus de la gripe B. Éste último hizo su aparición fundamentalmente en el periodo postpandémico y entre pacientes de las dos primeras décadas de la vida¹³⁴.

En relación a lo comentado podemos concluir que durante la primera circulación pandémica el virus de la Gripe más frecuentemente diagnosticado fue Gripe A H1N1 nv; los virus respiratorios fueron notablemente menos frecuentes, como así el virus de la Gripe B y otros subtipos de A que se diagnosticaron en proporciones mínimas.

El hecho de que en nuestra serie de 25 meses, el virus de la gripe B se encontrara fundamentalmente en los meses invernales puede estar asociado a la circulación secuenta a la del virus pandémico, de manera similar con la experiencia previa de nuestro grupo en la actividad diagnóstica del Centro de Gripe de Valladolid, aunque en menor medida. Este Centro, a lo largo de los tres últimos años ha notificado de forma esporádica actividad gripal B fuera de los meses de invierno, en consonancia con otras redes nacionales y europeas. Incluso el verano del 2012, no incluido en este estudio, se demostró la presencia de casos de gripe B, ejemplo de los matices distintos de la epidemiología del virus de la gripe B.



Como corresponde a la mayor demanda de diagnóstico a nuestro laboratorio por parte de las provincias de Valladolid y Burgos, el mayor porcentaje de muestras positivas para virus respiratorios corresponde a dichas provincias, que en conjunto supusieron el 60% de la positividad total. Este hecho obedece tanto a razones de oferta diagnóstica como de coordinación administrativa y sanitaria. En el inicio de la actividad pandémica, diversos organismos oficiales de ámbito nacional establecieron protocolos de diagnóstico, en los que nuestro Centro mantuvo un papel activo¹³⁵ (Ministerio de Sanidad e Instituto de Salud Carlos III con la Red de Vigilancia Epidemiológica) y por este motivo, los profesionales de la Microbiología que habitualmente utilizan nuestro servicio como referencia en su actividad, integraron las muestras respiratorias en sus circuitos de derivación.

En íntima conexión con lo expuesto destaca el elevado rendimiento diagnóstico que se obtuvo de las muestras procedentes de la Red Centinela Sanitaria (62%), cuya consolidación y actividad ha alcanzado una posición destacada en el ámbito de la Vigilancia Epidemiológica y Salud Pública en nuestro país¹³⁶ (Junta de Castilla y León).

En el contexto asistencial de Valladolid cabe destacar que nuestra actividad ha asumido todas las muestras de procedencia hospitalaria de nuestra provincia, hecho que apunta a un enfoque eficiente y a la optimización de recursos entre las dos áreas sanitarias. La oportunidad que representa efectuar un diagnóstico vírico en patología respiratoria de manera homogénea para extensas áreas de un territorio, no debiera ser desaprovechada y puede traducir de una manera fiel la difusión de estos agentes en el interfaz comunidad-hospital. Diferentes autores en nuestro país^{137,138} han recogido su experiencia en este ámbito, pero la mayoría se circunscribe a una visión de centro de referencia, mientras que



nuestro grupo atendemos las necesidades diagnósticas en todos los niveles asistenciales.

Al considerar nuestros resultados en cuanto a la detección de virus respiratorios excluyendo a los virus gripales cabe destacar que más de la mitad correspondieron a Rino/enterovirus (59%) seguidos del VRS (18.7%) y de los virus Parainfluenza (12.3%). En proporciones inferiores al 10% documentamos la presencia de Metapneumovirus (6.8%), Coronavirus (4.1%), Adenovirus (2.6%) y Bocavirus en la misma proporción (2,6%). Existen publicaciones que a lo largo de la última década han documentado la prevalencia de los virus respiratorios con diferentes enfoques¹³⁹⁻¹⁴¹ y en distintos grupos etarios^{142,143}. Todas ellas se benefician de la disponibilidad de las técnicas de detección molecular que han revolucionado las posibilidades de diagnóstico vírico en la práctica clínica. Si bien las prevalencias globales muestran variabilidad entre las cifras detectadas en diferentes contextos, aportaciones como la de nuestro grupo cobra valor al ser pioneras en la detección de una amplia gama de virus. Hasta donde hemos sido capaces de revisar, los Coronavirus del tipo OC43, NL63, 229E y HKU1 constituyen las primeras comunicaciones realizadas en nuestra comunidad autónoma.

Podemos concluir que entre los virus respiratorios no gripales diagnosticados destaca por su mayor frecuencia Rino/Enterovirus con más de la mitad de detecciones dentro de este grupo; seguidas de VRS y Parainfluenza. De tal forma que los cinco grandes virus de infección respiratoria son: virus de la Gripe (A y B), Rino/Enterovirus, VRS y Parainfluenza.

Parece oportuno destacar también que en nuestra serie una proporción no desdeñable de muestras (7.4%) revelaron la presencia de coinfección entre dos virus respiratorios tal y como se ha detallado en el apartado correspondiente de resultados. En una proporción muy pequeña (0.5%) se evidenciaron infecciones triples. Desde un punto de vista conceptual existen lagunas



importantes en la patogenia de las coinfecciones virales y por ello, la interpretación veraz de las coinfecciones es un campo de mantenido debate. En los casos de coinfecciones por cualquier virus de la gripe o alguno de los

más importantes (VRS, Parainfluenza) es fácil atribuir el papel patogénico a los mismos. Permanece como incógnita la descripción de cuál de los virus que coinfectan actúa como protagonista principal y si el aislado acompañante posee verdadero significado patogénico en casos de virus de circulación anual, con periodo de excreción más largo y patología muy variada (rinovirus).

En consonancia con lo que se acaba de exponer, podemos concluir que las coinfecciones más frecuentes incluyeron virus de probada patogenia y prolongada circulación epidémica: Rino/Enterovirus + VRS, Rino/Enterovirus + Gripe A H1N1, Rino/Enterovirus + Bocavirus y Rino/Enterovirus + Adenovirus. Éstas fueron más frecuentes en niños que en adolescentes y adultos.

Nuestros resultados muestran que la descripción epidemiológica de las coinfecciones puede aportar luz al conocimiento, en el sentido mencionado en el párrafo anterior, ya que en invierno su presencia ha sido mayoritaria y ha doblado en porcentaje a las infecciones simples. Hecho escasamente documentado en la literatura^{144,145-147} que concuerda con las razones expuestas además de un mayor predominio de algunos virus de reciente desarrollo diagnóstico (Bocavirus, metapneumo, corona, etc).

Desde el punto de vista práctico; de nuestra experiencia se desprende la necesidad de incorporar tanto a las redes de vigilancia como a la práctica clínica la detección de otros virus respiratorios. Todas las redes que conocemos en nuestro país estarían en condiciones de ampliar su oferta diagnóstica y de este modo responder tanto al interrogante de la verdadera circulación de los virus como al esclarecimiento de su significado meramente



patogénico. Nuestro grupo ha desarrollado una serie de trabajo de la respuesta inmunitaria¹⁴⁸ frente al VRS y otros virus respiratorios¹⁴⁹⁻¹⁵³ que puede marcar una temática a seguir en un futuro próximo, pero que debe sustentarse en la vigilancia sistemática de los cuadros respiratorios en edades extremas de la vida.



3. ESTUDIO COMPARATIVO DE GRIPE Y DE OTROS VIRUS RESPIRATORIOS

Nuestros hallazgos nos han permitido describir de manera pionera el perfil de los pacientes que presentaron gripe y el de aquellos infectados por otros virus respiratorios en una serie consecutiva derivada de la actividad asistencial. El primer hecho que destaca es que la edad media de los pacientes con gripe resultó ser significativamente superior a la de los pacientes en los que se detectaron otros virus respiratorios (31.3 +- 21.8 vs 25.4 +- 28.9), hallazgo escasamente documentado en las series contemporáneas a la nuestra¹⁵⁴. Por lo que hace referencia a la distribución por sexos, ambos grupos resultaron similares con proporciones entre varones y mujeres de 55% a 45% tanto para las personas afectadas por virus de la gripe, como para las afectadas por otros virus respiratorios. En las series de gripe publicadas en nuestro entorno la distribución por sexos resultó concordante con lo descrito por nosotros¹⁵⁵.

Tras este análisis podemos concluir que la edad media de los pacientes con Gripe (31,3 años) resultó ser significativamente superior a la de los pacientes en los que se detectaron otros virus respiratorios (25,4 años). La distribución por sexos fue equilibrada entre ambos grupos. En nuestro hospital los mismos parámetros fueron ligeramente superiores a los generales.

En nuestro estudio hemos monitorizado a lo largo de los tres últimos años la eficiencia diagnóstica referida al tiempo de emisión de los resultados al igual que otros grupos¹⁵⁶. En la presente contribución, casi el 90% de los virus respiratorios se detectaron en un tiempo igual o inferior a dos días, mejorando el porcentaje para identificar virus gripales en dicho tiempo, que en el mismo periodo se situó en 83%, sin embargo el porcentaje de resultado a los días 3 y 7 para los virus gripales alcanzó un porcentaje del 15% y para ese intervalo de tiempo de resultado diagnóstico en este periodo, el resto de virus respiratorios se situó en un % menor (10%). Una mínima proporción de resultados virológicos exigieron tiempos superiores a la semana.

En cuanto a la distribución de las dos categorías diagnósticas cabe apuntar que la procedencia hospitalaria fue mayor en los pacientes con virus respiratorios (92%) frente a los pacientes con gripe (82.4%)¹⁵⁷.

En el análisis temporal categorizado por trimestres fue el cuarto trimestre de cada año el que mostró una mayor proporción de muestras positivas tanto en gripe como en otros virus respiratorios seguidos por el primer trimestre del año en el que los virus respiratorios superaron además a los virus gripales. Este hecho concuerda con lo clásicamente señalado a lo largo de las diferentes temporadas de actividad estudiadas en nuestro centro de referencia y a lo notificado por las redes de vigilancia de salud pública en las redes de nuestro país a partir de 1995. De la carga de trabajo que genera la actividad diagnóstica de los procesos respiratorios, da una idea el hecho de que las redes de médicos centinelas notifican tradicionalmente actividad gripal entre la semana 40 de un año y la semana 20 del siguiente. Nuestro periodo de estudio ha abarcado de manera consecutiva el periodo interepidémico a pesar de lo cual, en el contexto global, y aún contado con la diseminación del virus pandémico, la actividad se ha concentrado esencialmente en los dos trimestres referidos. Un aspecto menor pero no por ello menos importante es el de que también en los meses de primavera se ha documentado circulación de virus gripales, hecho que únicamente es posible describir con una oferta de detección de virus respiratorios mantenida a lo largo del tiempo. Son escasos los grupos de trabajo que reportan hallazgos como el que mencionamos en nuestra serie¹⁵⁸.

Un aspecto claramente mejorable a tenor de lo expuesto en nuestra aportación es el de optimizar la información clínica que acompaña a la solicitud diagnóstica, hecho reiteradamente reivindicado por los microbiólogos ante los facultativos con actividad clínica. No resulta sorprendente que en la bronconeumonía haya sido la patología más frecuentemente repetida en los volantes de petición y la fiebre el signo clínico aislado más prevalente. Por el sesgo que conlleva este hecho su significación puede no ser notoria.

De acuerdo a lo relatado anteriormente podemos concluir que las patologías más frecuentemente reflejadas en los volantes de petición fueron la



bronconeumonía y la expresada de forma genérica como “infección respiratoria”. Los hallazgos virológicos en estas indicaciones clínicas fueron ligeramente distintos. En las bronconeumonías predominaron otros virus respiratorios no gripales, en la “Infección respiratoria”, Gripe y otros virus respiratorios tenían un protagonismo similar.

La categorización dicotómica elegida por nuestro grupo para clasificar los hallazgos en función de los cuatro grandes grupos de agentes etiológicos y su distribución en función de 9 trimestres ha demostrado una amplia variabilidad.

El hallazgo más constante durante las temporadas gripales ha sido la predominancia de los virus gripales frente al resto de virus respiratorios. En el caso particular de la evolución del virus respiratorio sincitial, en nuestra serie éste ha mantenido una fuerte presencia en el primer trimestre del año 2010 consecutivo a la aparición del virus pandémico. Tradicionalmente las redes de vigilancia de virus respiratorios han notificado la actividad del VRS como preludeo de la aparición de los virus gripales en la comunidad^{159,160} pero en el caso de la temporada 2009-2010 la situación ha sido la contraria. Los Rino/enterovirus han mantenido una presencia más constante y en el contexto comparativo de los trimestres estudiados se han objetivado dos picos de actividad. Con toda probabilidad del seguimiento temporal de las temporadas posteriores podremos obtener una visión más completa de las ondas de este agente. Diversos estudios¹⁶¹ en nuestro país han corroborado la circulación de Rino/Enterovirus concomitante con la actividad del resto de virus respiratorios, siendo un hecho coincidente con el nuestro su prevalencia en el periodo invernal. El virus Parainfluenza en todos los trimestres estudiados presenta una prevalencia más baja y más homogénea. Con independencia del análisis de otros factores asistenciales, epidemiológicos, socio-sanitarios y clínicos, cabe apuntar que la incorporación de las técnicas de diagnóstico molecular a la documentación etiológica de los cuadros de infección respiratoria representa una aportación innovadora y que marca el inicio de una nueva era en el conocimiento de los virus respiratorios en su conjunto¹⁶².

4. EXPERIENCIA CLINICA Y TERAPEUTICA DE LOS PACIENTES ATENDIDOS EN EL H.C.U. DE VALLADOLID

Por el interés que suscita el disponer de una muestra de pacientes propia, hemos analizado casi tres millares de muestras recibidas en nuestro laboratorio durante el periodo de actividad pandémica y el postpandémico inmediato. Destaca en primer término que existió un equilibrio entre la positividad mostrada frente a virus gripales y frente a otros virus respiratorios representando las coinfecciones un 5% de la positividad.

En resumen, se puede concluir que los porcentajes de muestras positivas de pacientes procedentes del HCUV fueron muy similares para virus de la Gripe y para otros virus respiratorios, encontrándonos una proporción de coinfecciones ligeramente inferior a la media del estudio.

En segundo término, en nuestro centro el virus gripal detectado fue monográficamente el de gripe A H1N1 09 pdm. Al analizar comparativamente las variables clínicas y epidemiológicas incluidas en esta muestra, destaca que los virus de la Gripe correspondieron a pacientes cuya edad media superaban un quinquenio a los que infectaban otros virus respiratorios. Estos hechos coinciden con los documentados en otras series¹⁶³.

Un hallazgo a nuestro juicio destacable es que las coinfecciones se documentaron en niños, lo cual corrobora en nuestro medio lo descrito por Cilla G et al en el País Vasco¹⁶⁴, Garcia et al en Majadahonda¹⁶⁵ y en otras series extranjeras¹⁶⁶. Al analizar la estancia en Unidad de Cuidados Intensivos se documentó una idéntica duración de la misma similar tanto en el grupo de virus respiratorios como en el grupo de la Gripe. Un hecho escasamente analizado en la literatura ha sido el empleo de antibioterapia en estos pacientes, que en nuestra experiencia se empleó en la mitad de los enfermos con gripe y en menor proporción en aquellos con otra infección vírica respiratoria.



En resumen, teniendo en cuenta una única variable como es la estancia en UCI podemos concluir que entre los pacientes graves (UCI) del HCUV con un diagnóstico virológico positivo se observó la misma proporción de infección por virus de la gripe que por otro virus respiratorio entre aquellos que tenían una infección vírica; no se observaron coinfecciones.

Tal y como se ha expuesto, el estudio observacional retrospectivo realizado en el otoño-invierno que siguió al debut de la pandemia hemos podido revisar casi un centenar de pacientes tratados con oseltamivir, en su mayoría presentaban un criterio clínico de tratamiento 74/87 y estaban correctamente tratados. Al hilo de lo expuesto anteriormente destaca que una proporción importante recibieron de manera complementaria la administración de antibióticos. Es llamativo el hecho de que sólo el 12% de este grupo de pacientes tuviera un diagnóstico virológico de gripe, que se explica por los problemas inherentes a una correcta definición clínico-epidemiológica de gripe en el contexto de una epidemia estacional y, de forma particular, en la pasada pandemia. Lo cual enfatiza aun más si cabe, la necesidad de optimizar las escalas clínicas de evaluación de gripe como se ha señalado¹⁶⁷. Esta experiencia supone una llamada de atención a la colaboración interactiva con los profesionales de diversas áreas del centro hospitalario que debieran ser capaces de establecer protocolos de actuación conjunta ante futuros eventos epidémicos similares.

Estos datos, nos permitieron concluir que entre todos los pacientes tratados con Oseltamivir en el HCUV, solo se solicitó confirmación microbiológica en tres de cada cuatro y únicamente se confirmó la presencia de virus de la Gripe en la décima parte de ellos.



5. ANALISIS DEL CONTROL DE CALIDAD.

La circunstancia que nos otorga el hecho de desarrollar nuestra labor diagnóstica en un centro de gripe de la OMS¹⁶⁸ ha posibilitado la realización de cuatro controles de calidad a lo largo del periodo de estudio. A tenor de los resultados obtenidos en los diferentes paneles que coinciden con los de referencia de la OMS, podemos asumir que nuestra actividad confirma un nivel de excelencia en la competencia diagnóstica. Aspecto que fue decisivo en los primeros momentos de circulación del virus ya que gran parte de los casos ocurridos en Mexico al inicio de la pandemia quedaron sin diagnosticar. Se ha insistido por distintos autores en la importancia que reviste efectuar un diagnóstico certero tanto en los tipos como en los subtipos de virus gripales¹⁶⁹⁻¹⁷¹ y ello ha alcanzado especial relevancia en las etapas iniciales de la circulación del virus pandémico. Nuestra contribución en la identificación constante tanto de este subtipo como del anteriormente señalado como emergente H5^{172,173}, ha sido refrendada por los controles periódicos de referencia obligados para los Centros de Gripe de la red GISRN (Global Influenza Surveillance and Response Network). Dichos controles ciegos deben de catalogar otros subtipos H3 y los tipos B e incluyen una o más muestras negativas. La puntuación alcanzada por nuestro laboratorio ha sido la máxima y la concordancia observada entre las técnicas de detección molecular empleadas por nosotros y la referida por la OMS ha sido absoluta.

De acuerdo al relato previo concluimos que el análisis ciego de cuatro paneles de Control de Calidad de la OMS recibidos en el Centro de Gripe en el periodo que abarca el estudio ha permitido confirmar una concordancia del 100% en las diferentes determinaciones realizadas con el protocolo diagnóstico utilizado durante el período pandémico y postpandémico.

Un aspecto adicional es que la construcción y el diseño de los cuatro paneles consecutivos han permitido evaluar nuestras herramientas diagnósticas en periodos semestrales fijos que abarcan todo el periodo de estudio. Esto además representa una garantía de buena práctica en el laboratorio de



microbiología, aspecto éste que ha sido igualmente recomendado por los organismos de control de calidad de nuestras sociedades científicas¹⁷⁴ .

Una visión complementaria de lo expuesto reside en el hecho de que nuestra actividad diagnóstica es de referencia para otros laboratorios del sistema sanitario y por ello supone una garantía contrastada de calidad para aquellos que nos confían sus labores de diagnóstico.



CONCLUSIONES



El estudio de la infección por virus de la Gripe y de otros virus respiratorios en diversos grupos de interés clínico y sanitario en nuestro medio, así como la valoración de los factores epidemiológicos y sanitarios asociados, nos ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1.- El diagnóstico de Gripe y de otros virus respiratorios en el periodo pandémico y postpandémico tuvo su protagonismo en pacientes hospitalizados, mayoritariamente adolescentes y adultos entre 14 y 65 años, siendo para mayores de 65 años mucho menos frecuente. A pesar de las instrucciones al respecto, en más de la mitad de los volantes de petición no constaba la patología ni otros datos relevantes.

2.- El diagnóstico etiológico viral se consiguió en cuatro de cada diez de los pacientes referidos; correspondiendo en general a infecciones causadas por un único virus respiratorio, siendo mayoritarias las debidas al virus de la gripe. Las coinfecciones se encontraron en un porcentaje muy inferior, aunque no desdeñable, inferior a una por cada diez pacientes.

3.- La tasa de rendimiento diagnóstico de todos los virus respiratorios, incluida la Gripe; fue superior en el primer año de circulación del virus pandémico, probablemente debido a una mejor caracterización clínica de las peticiones diagnósticas.

4.- Durante la primera circulación pandémica el virus de la Gripe más frecuentemente diagnosticado fue la nueva variante de Gripe A H1N1. Los virus respiratorios fueron mucho menos frecuentes, así como el virus de la Gripe B y otros subtipos de A que se diagnosticaron en proporciones mínimas.



5.- Entre los virus respiratorios no gripales diagnosticados, Rino/Enterovirus destaca por su mayor frecuencia con más de la mitad de detecciones dentro de este grupo; seguido de VRS y Parainfluenza. De tal forma que los cinco grandes virus de infección respiratoria encontrados han sido: virus de la Gripe (A y B), Rino/Enterovirus, VRS y Parainfluenza.

6 – Las coinfecciones más frecuentes incluyeron virus de probada patogenia y prolongada circulación epidémica: Rino/Enterovirus y VRS, Rino/Enterovirus y Gripe A H1N1, Rino/Enterovirus y Bocavirus y por último, Rino/Enterovirus y Adenovirus. Todas ellas fueron más frecuentes en niños que en adolescentes y adultos.

7.- Los porcentajes de muestras positivas para virus de la Gripe y para otros virus respiratorios en los pacientes procedentes del HCUV fueron muy similares, encontrándonos una proporción de coinfecciones ligeramente inferior a la media del estudio.

8.- La edad media de los pacientes con Gripe (31,3 años) resultó ser significativamente superior a la de los pacientes en los que se detectaron otros virus respiratorios (25,4 años). La distribución por sexos fue equilibrada entre ambos grupos. En el HCUV los mismos parámetros fueron ligeramente superiores a los generales.



9.- Las patologías más frecuentemente reflejadas en los volantes de petición fueron la bronconeumonía y la expresada de forma genérica como “infección respiratoria”. Los hallazgos virológicos en estas indicaciones clínicas fueron ligeramente distintos. En las bronconeumonías predominaron otros virus respiratorios no gripales mientras que en la “Infección respiratoria”, Gripe y otros virus respiratorios tuvieron un protagonismo similar.

10.- Entre los pacientes graves del HCUV (UCI) que tenían una infección vírica con un diagnóstico virológico positivo se observó la misma proporción de infección por virus de la gripe que por otros virus respiratorios y no se observaron coinfecciones.

11.- El análisis ciego de cuatro paneles de Control de Calidad de la OMS recibidos en el Centro de Gripe en el periodo que abarca el estudio ha permitido confirmar una concordancia del 100% en las diferentes determinaciones realizadas con el protocolo diagnóstico utilizado durante el período pandémico y postpandémico.

12.- Entre todos los pacientes tratados con Oseltamivir en el HCUV, solo se solicitó confirmación virológica en tres de cada cuatro y únicamente se confirmó la presencia de virus de la Gripe en la décima parte de ellos.



BIBLIOGRAFÍA



- 1.- Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R, Hernández B, Rodríguez Torres A. Gripe: de la etiología a la terapia. Forhos 2000; Vol 3, nº 1: 13-19.
- 2.- Ortiz de Lejarazu R, Eiros JM, Gracia I. Gripe y Viriasis Respiratorias. Medicine: Tratado de Medicina Interna. Ediciones Doyma, ISSN 0304-5412. Madrid 2006; 9ª Serie (59): 3820-29.
- 3.- Muraki Y, Furukawa T, Kohno Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Sugawara K et al. Influenza C virus NS1 protein upregulates the splicing of viral mRNAs. J Virol, 2010 ; 84: 1957-66.
- 4.- Wilson IA, Ladner RC, Skehel JJ, Wiley DC. The structure and role of the carbohydrate moieties of influenza virus haemagglutinin. Biochem Soc Trans. 1983 ;11 Pt 2:145-7.
- 5.- Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. Nature, 1983 ;303(5912):41-4.
- 6.- Kandel R, Hartshorn KL. Prophylaxis and treatment of influenza virus infection. BioDrugs, 2001;15:303-23.
- 7.- Matheson NJ, Symmonds-Abrahams M, Sheikh A, Shepperd S, Harnden A. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in children. Cochrane Database Syst Rev. 2003:CD002744.
- 8.- Schweiger B. Molecular characterization of human influenza viruses--a look back on the last 10 years. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2006;119:167-78.
- 9.- Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. Science, 1998;279(5349):393-6.
- 10.- Kendal AP, Cox NJ. Forecasting the epidemic potential of influenza virus variants based on their molecular properties. Vaccine, 1985;(3 Suppl):263-6.
- 11.- Eiros Bouza JM, Ortiz de Lejarazu R. Los virus gripales y su situación actual. Revista Médica, 2005; 59:88-91.



- 12.- Antigenic shift and drift. *Nature*, 1980;283(5747):524-5.
- 13.- Both GW, Sleight MJ Conservation and variation in the hemagglutinins of Hong Kong subtype influenza viruses during antigenic drift. *J Virol*. 1981;39(3):663-72.
- 14.- Scholtissek C. Molecular epidemiology of influenza. *Arch Virol Suppl*. 1997;13:99-103.
- 15.- Gachot B, Vachon F. Severe "malignant" influenza in the light of past history. *Med Mal Infect*. 2010 ; 40: 55-59.
- 16.- Scalera NM, Mossad SB. The first pandemic of the 21st century: a review of the 2009 pandemic variant influenza A (H1N1) virus. *Postgrad Med*, 2009; 121:43-47.
- 17.- Kurtz J, Manvell RJ, Banks J. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. *Lancet*, 1996;348(9031):901-2.
- 18.- Eiros Bouza JM. Síndrome Agudo Respiratorio Grave y Gripe Aviar. *An R Acad Nac Med (Madrid)*, 2004; 121:263-88.
- 19.- Eiros Bouza JM, Sánchez-Seco Fariñas MP. Enfermedades víricas emergentes. Punto de vista actual. *Revista de la Fundación de Ciencias para la Salud*, 2004;16: 55-60.
- 20.- McHardy AC, Adams B. The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus. *PLoS Pathog*, 2009; 5:e1000566.
- 21.- Alexander DJ. Ecological aspects of influenza A viruses in animals and their relationship to human influenza: a review. *J R Soc Med*, 1982;75(10): 799–811.
- 22.- Ortiz de Lejarazu Leonardo R, Eiros Bouza JM, Castrodeza Sanz J, Vega Alonso T, Mateo Ontañón S. Claves de la epidemiología y ecología de los virus gripales. En: Fernández Muñoz R, coordinador. *Plan de Formación en Gripe: Tomo VI. Ergón*. ISBN84-8473-175-8. Majadahonda, 2003; 79 pags.



- 23.- Sorrell EM, Ramirez-Nieto GC, Gomez-Osorio IG, Perez DR. Genesis of pandemic influenza. *Cytogenet Genome Res*, 2007;117(1-4):394-402.
- 24.- Ortiz de Lejarazu R, Eiros Bouza JM. Virus de la gripe: Virus circulantes y modificaciones pandémicas. En: De Juanes Pardo JR, ed. *Gripe: de la epidemia a la pandemia*. 2007. Gráficas Enar SA. ISBN 84-96277-09-7:25-49.
- 25.- Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog*, 2007 ;3(10):1470-6.
- 26.- Debiaggi M, Canducci F, Ceresola ER, Clementi M. The role of infections and coinfections with newly identified and emerging respiratory viruses in children. *Virol J*, 2012;9:247.
- 27.- Azziz-Baumgartner E, Cabrera AM, Chang L, Calli R, Kuszniarz G, Baez C, Yedlin P, Zamora AM, Cuezco R, Sarrouf EB, Uboldi A, Herrmann J, Zerbini E, Uez O, Rico Cordeiro PO, Chavez P, Han G, Antman J, Coronado F, Bresee J, Kosacoff M, Widdowson MA, Echenique H. Mortality, severe acute respiratory infection, and influenza-like illness associated with influenza A(H1N1)pdm09 in Argentina, 2009. *PLoS One*, 2012;7(10).
- 28.- Eiros Bouza JM, Castrodeza Sanz FJ, Ortiz de Lejarazu R. Virus de la Gripe H5N1. *Medicina Preventiva* 2007; vol XIII, Especial Congreso:73-75.
- 29.- Thanh TT, van Doorn HR, de Jong MD. Human H5N1 influenza: current insight into pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008;40(12):2671-4.
- 30.- Dunham EJ, Dugan VG, Kaser EK, Perkins SE, Brown IH, Holmes EC, Tauberger JK. Different evolutionary trajectories of European avian-like and classical swine H1N1. *Influenza A viruses*. *J Virol* 2009, 83 (11); 5485-94.
- 31.- Garten RJ, Davis CT, Russel CA et al. Antigenic and genetic characteristics of swine origin 2009 A H1N1 Influenza viruses circulating in Humans. *Science*. Disponible en <http://www.sciencemag.org/cgi/rapidpdf/1176225v1.pdf>



- 32.- Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J Infect Dis*, 2006; 194 Suppl 2:98-110.
- 33.- Eiros JM, Hernández B, Ortiz de Lejarazu R, Rodríguez Torres A. Aspectos etiológicos, epidemiológicos y terapéuticos de la gripe. *American Family Physician*, 2001; 8:46-55.
- 34.- Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013–2014 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol Rec*, 2013;88(10):101-14.
- 35.- Protocolo uso de pruebas diagnósticas para la nueva gripe pandémica A H1N1. Disponible en:
<http://www.msps.es/profesionales/saludPublica/gripeA/guiasProtocolosInf/pdf/ProtocoloPruebasDiag.pdf>.
- 36.- Centers for Diseases Control. Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) Virus---United States, 2009. *MMWR* 2009;58:826-29.
- 37.- Ghebremedhin B, Engelmann I, König W, König B. Comparison of the performance of the rapid antigen detection actim Influenza A&B test and RT-PCR in different respiratory specimens. *J Med Microbiol*, 2009;58:365-370.
- 38.- Eiros Bouza JM (Coordinador), Casas Flecha I, Ortiz De Lejarazu R, Eiros Bouza JM, Pérez Breña P, Pozo Sánchez F, Ruiz Carrascoso G, Tenorio Abreu A (Autores). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por virus respiratorios, 2008 (29). En: Cercenado E, Cantón R, eds. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 2ª ed. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2008. Disponible en <http://seimc.org/documentos/protocolos/microbiología/>
- 39.- Rohde G, Drosten C, Borg I, Hauptmeier B, Ringshausen F, Schultze-Werninghaus G et al. Detection of respiratory viruses--how, when, where and why?. *Pneumologie*, 2009;63:14-22.



- 40.- Freymuth F, Vabret A, Dina J, Petitjean J, Gouarin S. Techniques used for the diagnostic of upper and lower respiratory tract viral infections. *Rev Prat.* 2007;57:1876-82.
- 41.- Zou S, Han J, Wen L, Liu Y, Cronin K, Lum SH et al. Human influenza A virus (H5N1) detection by a novel multiplex PCR typing method. *J Clin Microbiol*, 2007;45:1889-92.
- 42.- Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*, 2009;360:2605-15.
- 43.- Kim SR, Ki CS, Lee NY. Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *J Virol Methods*, 2009;156:111-16.
- 44.- Raymond F, Carbonneau J, Boucher N, Robitaille L, Boisvert S, Wu WK, De Serres G, Boivin G, Corbeil J. Comparison of automated microarray detection with real-time PCR assays for detection of respiratory viruses in specimens obtained from children. *J Clin Microbiol*, 2009;47(3):743-50.
- 45.- He J, Bose ME, Beck ET, Fan J, Tiwari S, Metallo J et al. Rapid multiplex reverse transcription-PCR typing of influenza A and B virus, and subtyping of influenza A virus into H1, 2, 3, 5, 7, 9, N1 (human), N1 (animal), N2, and N7, including typing of novel swine origin influenza A (H1N1) virus, during the 2009 outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *J Clin Microbiol*, 2009; 47:2772-8.
- 46.- Mehlmann M, Bonner AB, Williams JV, Dankbar DM, Moore CL, Kuchta RD et al. Comparison of the MChip to viral culture, reverse transcription-PCR, and the QuickVue influenza A+B test for rapid diagnosis of influenza. *J Clin Microbiol*, 2007;45:1234-7.
- 47.- Kehl SC, Henrickson KJ, Hua W, Fan J. Evaluation of the Hexaplex assay for detection of respiratory viruses in children. *J Clin Microbiol*, 2001; 39:1696-701.



- 48.- Raymond F, Carbonneau J, Boucher N, Robitaille L, Boisvert S, Wu WK et al. Comparison of automated microarray detection with real-time PCR assays for detection of respiratory viruses in specimens obtained from children. *J Clin Microbiol*, 2009;47:743-50.
- 49.- Townsend MB, Dawson ED, Mehlmann M, Smagala JA, Dankbar DM, Moore CL et al. Experimental evaluation of the FluChip diagnostic microarray for influenza virus surveillance. *J Clin Microbiol*, 2006;44:2863-71.
- 50.- Ortiz de Lejarazu Leonardo R, Eiros Bouza JM, Castrodeza Sanz J, Vega Alonso T, Mateo Ontañón S. Claves de la epidemiología y ecología de los virus gripales. En : Fernández Muñoz R, coordinador. Plan de Formación en Gripe : Tomo VI. Ergón. Majadahonda, 2003; 79 pags.
- 51.- Eiros Bouza JM. Manejo de la gripe epidémica. En: Gripe realidad actual y amenaza futura. Grupos de Infecciosas de semFYC. Adalaia, Madrid, 2007:7-10.
- 52.- Goni N, Fajardo A, Moratorio G, Colina R, Cristina J. Modeling gene sequences over time in 2009 H1N1 Influenza A Virus populations.- *Virology*, 2009;6:215.
- 53.- McIntosh K, Halonen P, Ruuskanen O. Report of a workshop on respiratory viral infections: epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Infect Dis*, 1993;16:151-64.
- 54.- Eiros Bouza JM. Función de los laboratorios centrales de referencia en el diagnóstico serológico de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; Mongr 4:78-8.
- 55.- Ortiz de Lejarazu R, Eiros JM, Gracia I. Gripe y Viriasis Respiratorias. *Medicine. Tratado de Medicina Interna*. Elsevier, 2006; 9: 3820-9.
- 56.- Ndifon W, Dushoff J, Levin SA. On the use of hemagglutination-inhibition for influenza surveillance: surveillance data are predictive of influenza vaccine effectiveness. *Vaccine*. 2009 Apr 21;27(18):2447-52.



- 57.- Beveridge WI. The start of pandemics: site, season and spread. *Dev Biol Stand*, 1977 Jun 1-3;39:443-4.
- 58.-Rodríguez Torres A. *Epidemiología y ecología de la gripe A*. Valladolid: Sever-Cuesta, 1982.
- 59.-Kaplan MW, Webster RG. La epidemiología de la gripe. *Invest Ciencia*, 1978;17: 52-63.
- 60.- Hinsahaw VS, Bean WJ, Webster RG, Easterday BC. The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine. *Virology*, 1978;84: 51-9.
- 61.-Tautenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science*, 1997; 275:1793-6.
- 62.-Dowdle WR, Coleman MT. Properties of the Hong Kong influenza virus. 2. Antigenic relationship of the Hong Kong virus hemagglutinin to that other human influenza viruses. *Bull WHO*, 1969;41: 419-24.
- 63.- Pumarola A, Rodríguez Torres A, Beltran M. La gripe Hong Kong en Barcelona. *Med Trop* 1970;1-4:221-50.
- 64.- Pumarola A, Rodríguez Torres A. Anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación del virus gripal A2 en la población de Barcelona. *Med Clin (Barc)*, 1969;52:489-94.
- 65.- Kendal AP, Goldfield M, Noble GR, Dowdle WR. Identification and preliminary analisis of swine influenza-like virus isolated during an influenza outbreak at Fort Dix, New Jersey. *J Infect Dis*, 1977 (suppl):381-94.
- 66.- Rodríguez Torres A, Ortiz de Lejarazu R. Anticuerpos frente a la gripe porcina y humana en la población de Valladolid. *Med Clin (Barc)*, 1977;68:16-8.
- 67.- Kung HC, Jen KF, Yuan WC, Tien SF, Chu CM. Influenza in China in 1977: recurrence of influenza virus A subtype H1N1. *Bull WHO*, 1978;56:913-8.



- 68.-Zakstelskaja LJA, Yanko MA, Iscacenko V et al. Influenza in the USSR in 1977: recurrence of influenza virus A subtype H1N1. Bull WHO, 1978;56:918-22.
- 69.- Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R, Tenorio A, Casas I, Pozo F, Ruiz G, Pérez-Breña P. Diagnóstico microbiológico de las infecciones respiratorias virales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2009;27:168-77.
- 70.- Caliendo AM. Multiplex PCR and emerging technologies for the detection of respiratory pathogens. *Clin Infect Dis*, 2011;52 Suppl 4:326-30.
- 71.- Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin Infect Dis*, 2011;52 Suppl 4:284-9.
- 72.- Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet*, 2011;377:1264-75.
- 73.- Wunderink RG, Waterer GW. Update in pulmonary infections 2010. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011;184:186-90.
- 74.- Hayden FG. Rhinovirus and the lower respiratory tract. *Rev Med Virol*, 2004;14(1):17-31.
- 75.- Gern JE. Viral respiratory infection and the link to asthma. *Pediatr Infect Dis J*, 2004;23(1 Suppl):78-86.
- 76.- Freymouth F, Vabret A, Legrand L, Eterradosi N, Lafay-Delaire F, Brouard J, Guillois B. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J*, 2003;22(1):92-4.
- 77.- Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Côté S, Peret TC, Erdman DD, Anderson LJ. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis*, 2002;186(9):1330-4.



- 78.- Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis*, 2003;9(3):372-5.
- 79.- Gagneur A, Vallet S, Talbot PJ, Legrand-Quillien MC, Picard B, Payan C, Sizun J. Outbreaks of human coronavirus in a pediatric and neonatal intensive care unit. *Eur J Pediatr*, 2008;167(12):1427-34.
- 80.- Esper F, Ou Z, Huang YT. Human coronaviruses are uncommon in patients with gastrointestinal illness. *J Clin Virol*, 2010;48(2):131-3..
- 81.- Yoshida LM, Suzuki M, Nguyen HA, Le MN, Vu TD, Yoshino H, Schmidt WP, Nguyen TT, Tho Le H, Morimoto K, Moriuchi H, Dang DA, Ariyoshi K. Respiratory syncytial virus, its co-infection and paediatric lower respiratory infections. *Eur Respir J*. 2013.
- 82.- Ortiz de Lejarazu R, Rojo S, Bermejo Martín JF, Almansa R, Solis P, Tamames S, Vega T, Castrodeza J, Eiros JM. Tendencia y estacionalidad del virus respiratorio sincitial en Valladolid durante el periodo 1993-2010. *Acta Pediatr Esp* 2012. 70(8)
- 83.- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Respiratory syncytial virus activity--United States, July 2011-January 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2013;62(8):141-4.
- 84.- Staat MA, Henrickson K, Elhefni H, Groothuis J, Makari D. Prevalence of RSV-Associated Lower Respiratory Infection and Apnea in Infants Presenting to the Emergency Department. *Pediatr Infect Dis J*, 2013.
- 85.- Cunha BA, Corbett M, Mickail N. Human parainfluenza virus type 3 (HPIV 3) viral community-acquired pneumonia (CAP) mimicking swine influenza (H1N1) during the swine flu pandemic. *Heart Lung*, 2011;40(1):76-80.
- 86.- Eyigor H, Osma U, Eyigor M, Yilmaz MD, Gultekin B, Telli M, Ozturan A, Gultekin M. Detection of human bocavirus in children with upper respiratory tract infection by polymerase chain reaction. *Clin Lab*, 2013;59(1-2):139-42.



- 87.- Nemerow GR, Stewart PL, Reddy VS. Structure of human adenovirus. *Curr Opin Virol*, 2012;2(2):115-21.
- 88.- Informe semanal de la vigilancia de la Gripe, disponible en :WHO <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/updates/en/index.html>.
- 89.- Farkas DH, Drevon AM, Kiechle FL, DiCarlo RG, Heath EM, Crisan D. Specimen stability for DNA-based diagnostic testing. *Diagn Mol Pathol*, 1996;5(4):227-35.
- 90.- Panning M, Eickmann M, Landt O, Monazahian M, Olschläger S, Baumgarte S, Reischl U, Wenzel JJ, Niller HH, Günther S, Hollmann B, Huzly D, Drexler JF, Helmer A, Becker S, Matz B, Eis-Hübinger A, Drosten C. Detection of influenza A(H1N1)v virus by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 2009 ;14(36).
- 91.- Diseño de *primers* y sondas de CDC para la detección de gripe A/H1N1 2009 publicado por la OMS, disponible en <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimptpcr/en/index.html>).
- 92.- Català L, Rius C, García de Olalla P, Nelson JL, Álvarez J, Minguell S, et al. Transmisión de los primeros casos en España de influenza pandémica A/H1N1. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2012;30:60-3.
- 93.- Navarro-Marí JM, Mayoral-Cortés JM, Pérez-Ruiz M, Rodríguez-Baño J, Carratalá J, Gallardo-García V. Influenza a (H1N1) virus infection in humans: review to 30th October 2009. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2010;28(7):446-52.
- 94.- Delgado-Rodríguez M, Castilla J, Godoy P, Martín V, Soldevila N, Alonso J, Astray J, Baricot M, Cantón R, Castro A, González-Candelas F, Mayoral JM, Quintana JM, Pumarola T, Tamames S, Sáez M, Domínguez A; CIBERESP Cases and Controls in Pandemic Influenza Working Group. Prognosis of hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in Spain: influence of neuraminidase inhibitors. *J Antimicrob Chemother*, 2012;67(7):1739-45.



- 95.- Kaya S, Yilmaz G, Arslan M, Oztuna F, Ozlu T, Koksai I. Predictive factors for fatality in pandemic influenza A (H1N1) virus infected patients. *Saudi Med J*, 2012;33(2):146-51.
- 96.- Tham Nt, Hang Vt, Khanh TH, Viet do C, Hien TT, Farrar J, Chau Nv, van Doorn HR. Comparison of the Roche RealTime ready Influenza A/H1N1 Detection Set with CDC A/H1N1pdm09 RT-PCR on samples from three hospitals in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012;74(2):131-6.
- 97.- Nicolini A, Tonveronachi E, Navalesi P, Antonelli M, Valentini I, Melotti RM, Pigna A, Carrassi A, Righini P, Ferrari Bravo M, Pelosi P, Nicoli F, Cosentini R, Vaschetto R, Faenza S, Nava S. Effectiveness and predictors of success of noninvasive ventilation during H1N1 pandemics: a multicenter study. *Minerva Anestesiol*, 2012;78(12):1333-40.
- 98.- Cheung W, Myburgh J, Seppelt IM, Parr MJ, Blackwell N, Demonte S, Gandhi K, Hoyling L, Nair P, Passer M, Reynolds C, Saunders NM, Saxena MK, Thanakrishnan G; Influenza Pandemic ICU Triage (iPIT) Study Investigators. Development and evaluation of an influenza pandemic intensive care unit triage protocol. *Crit Care Resusc*, 2012;14(3):185-90.
- 99.- Yang ZF, Zhan YQ, Chen RC, Zhou R, Wang YT, Luo Y, Jiang M, Li JQ, Qin S, Guan WD, Lai KF, Wen HL, Liang ZW, Li L, Zhong NS. A prospective comparison of the epidemiological and clinical characteristics of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus and seasonal influenza A viruses in Guangzhou, South China in 2009. *Jpn J Infect Dis*, 2012;65(3):208-14.
- 100.- Paño-Pardo JR, Viasus D, Pachón J, Campins A, López-Medrano F, Villoslada A, Gutiérrez-Cuadra M, Pumarola T, del Toro MD, Oteo JA, Martínez-Montauti J, Gutiérrez-Aroca J, Segura F, Carratalà J; Novel Influenza A (H1N1) Study Group of Spanish Network for Research in Infectious Diseases. Pandemic 2009 A(H1N1) infection requiring hospitalization of elderly Spanish adults. *J Am Geriatr Soc*, 2012;60(4):740-4.



101.- Launes C, García-García JJ, Martínez-Planas A, Moraga F, Soldevila N, Astigarraga I, Arístegui J, Korta J, Quintana JM, Torner N, Domínguez A. Clinical features of influenza disease in admitted children during the first postpandemic season and risk factors for hospitalization: a multicentre Spanish experience. *Clin Microbiol Infect*, 2012;19(3):157-62.

102.- Launes C, García-García JJ, Martínez-Planas A, Moraga F, Astigarraga I, Arístegui J, Korta J, Salado C, Quintana JM, Soldevila N, Domínguez A; CIBERESP Cases and Controls in Pandemic Influenza Working Group, Spain. 2009 H1N1: risk factors for hospitalization in a matched case-control study. *Eur J Pediatr*, 2012;171(7):1127-31.

103.- Domínguez A, Alonso J, Astray J, Baricot M, Cantón R, Castilla J, Castro A, Delgado M, Godoy P, González-Candelas F, Martín V, Mayoral JM, Quintana JM, Perea E, Pumarola T, Soldevila N, Tamames S; Grupo de Trabajo del Proyecto CIBERESP de Casos y Controles sobre la Gripe Pandémica. [Risk factors of influenza (H1N1) 2009 hospitalization and effectiveness of pharmaceutical and nonpharmaceutical interventions in its prevention: a case-control study]. *Rev Esp Salud Publica*, 2011;85(1):3-15.

104.- González-Candelas F, Astray J, Alonso J, Castro A, Cantón R, Galán JC, Garin O, Sáez M, Soldevila N, Baricot M, Castilla J, Godoy P, Delgado-Rodríguez M, Martín V, Mayoral JM, Pumarola T, Quintana JM, Tamames S, Domínguez A; CIBERESP Cases and Controls in Pandemic Influenza Working Group. Sociodemographic factors and clinical conditions associated to hospitalization in influenza A (H1N1) 2009 virus infected patients in Spain, 2009-2010. *PLoS One*, 2012;7(3):e33139.

105.- Nguyen-Van-Tam JS, Openshaw PJ, Hashim A, Gadd EM, Lim WS, Semple MG, Read RC, Taylor BL, Brett SJ, McMenemy J, Enstone JE, Armstrong C, Nicholson KG; Influenza Clinical Information Network (FLU-CIN). Risk factors for hospitalisation and poor outcome with pandemic A/H1N1 influenza: United Kingdom first wave (May-September 2009). *Thorax*, 2010;65(7):645-51.



- 106.- Diagnóstico microbiológico de las infecciones por virus respiratorios SEIMC, 2ª Edición 2008, Protocolo de diagnóstico virológico H1N1) disponible en: www.msps.es.
- 107.- Chang ML, Jordan-Villegas A, Evans A, Bhore R, Brock E, Mejias A, Siegel JD. Respiratory viruses identified in an urban children's hospital emergency department during the 2009 influenza A(H1N1) pandemic. *Pediatr Emerg Care*, 2012 ;28(10):990-7.
- 108.- Lee IK, Liu JW, Wang L, Yang KD, Li CC, Eng HL. 2009 pandemic Influenza A (H1N1): clinical and laboratory characteristics in pediatric and adult patients and in patients with pulmonary involvement. *Influenza Other Respi Viruses*, 2012;6(6):e152-61.
- 109.- Myles PR, Semple MG, Lim WS, Openshaw PJ, Gadd EM, Read RC, Taylor BL, Brett SJ, McMenamin J, Enstone JE, Armstrong C, Bannister B, Nicholson KG, Nguyen-Van-Tam JS; Influenza Clinical Information Network (FLU-CIN) Predictors of clinical outcome in a national hospitalised cohort across both waves of the influenza A/H1N1 pandemic 2009-2010 in the UK. *Thorax*, 2012;67(8):709-17.
- 110.- Rhedin S, Hamrin J, Naucler P, Bennet R, Rotzén-Östlund M, Färnert A, Eriksson M. Respiratory viruses in hospitalized children with influenza-like illness during the H1n1 2009 pandemic in Sweden. *PLoS One*, 2012;7(12):e51491.
- 111.- Pérez-Ruiz M, Pedrosa-Corral I, Sanbonmatsu-Gámez S, Navarro-Marí M. Laboratory detection of respiratory viruses by automated techniques. *Open Virol J*, 2012;6:151-9.
- 112.- Navarro-Marí JM, Pérez-Ruiz M, Galán Montemayor JC, Marcos Maeso MÁ, Reina J, de Oña Navarro M, Cilla Eguiluz CG. Circulation of other respiratory viruses and viral co-infection during the 2009 pandemic influenza. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2012;30 Suppl 4:25-31.



- 113.- Bauernfeind S, Bruennler T, Ehrenstein B, Langgartner J, Wenzel JJ, Werner S, Lubnow M, Mueller T, Floerchinger B, Salzberger B. Pandemic and post-pandemic influenza A (H1N1) seasons in a tertiary care university hospital-high rate of complications compared to previous influenza seasons. *Infection*, 2013;41(1):145-50.
- 114.- Allam MF, Abd Elaziz KM. Influenza A(H1N1) pandemic: 2 years after. *J Prev Med Hyg*, 2012;53(1):2-3; discussion 3-4.
- 115.- Gutiérrez-Cuadra M, González-Fernández JL, Rodríguez-Cundin P, Fariñas-Álvarez C, San Juan MV, Parra JA, Carrascosa M, Fariñas MC. Clinical characteristics and outcome of patients with pandemic 2009 Influenza A(H1N1)v virus infection admitted to hospitals with different levels of health-care. *Rev Esp Quimioter*, 2012;25(1):56-64.
- 116.- Larrauri Cámara A, Jiménez-Jorge S, Mateo Ontañón Sd, Pozo Sánchez F, Ledesma Moreno J, Casas Flecha I; Spanish Influenza Surveillance System (SISS). Epidemiology of the 2009 influenza pandemic in Spain. The Spanish Influenza Surveillance System. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2012;30 Suppl 4:2-9.
- 117.- Antón A, Pozo F, Niubó J, Casas I, Pumarola T. Influenza A(H1N1)pdm09 virus: viral characteristics and genetic evolution. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2012;30 Suppl 4:10-7.
- 118.- Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J Infect Dis*, 2006;194 Suppl 2:S98-110.
- 119.- Tenorio-Abreu A, Eiros Bouza JM, Rodríguez Molins E, Bermejo Martín JF, Domínguez-Gil M, Vega Alonso T, Castrodeza Sanz J, de Lejarazu RO. Vigilancia de la gripe mediante el diagnóstico molecular. *Rev Esp Quimioter*, 2009;22(4):214-20.



- 120.- Tenorio-Abreu A, Eiros JM, Bermejo-Martín JF, Ortiz de Lejarazu R. Comparación de shell vial y una técnica de PCR múltiple en el diagnóstico de las infecciones respiratorias virales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2011;29(4):317-8.
- 121.- Varillas D, Bermejo-Martin JF, Almansa R, Rojo S, Nogueira B, Eiros JM, Rico L, Iglesias V, de Lejarazu RO. A new method for detection of pandemic influenza virus using High Resolution Melting analysis of the neuraminidase gene. *J Virol Methods*, 2011;171(1):284-6.
- 122.- Pozo F, Casas I, Ruiz G, Falcón A, Pérez-Breña P. La aplicación de métodos moleculares para el diagnóstico y estudio epidemiológico de infecciones respiratorias virales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2008;26 Suppl 9:15-25.
- 123.- Choudhary ML, Anand SP, Heydari M, Rane G, Potdar VA, Chadha MS, Mishra AC. Development of a multiplex one step RT-PCR that detects eighteen respiratory viruses in clinical specimens and comparison with real time RT-PCR. *J Virol Methods*, 2013;189(1):15-19.
- 124.- Ortiz de Lejarazu, Pumarola T. Gripe. En *Medicina Interna de Farreras/Rozman*. Elsevier. Madrid (España) 17ª edición, 2012.
- 125.- Ricart S, Marcos MA, Sarda M, Anton A, Muñoz-Almagro C, Pumarola T, Pons M, Garcia-Garcia JJ. Clinical risk factors are more relevant than respiratory viruses in predicting bronchiolitis severity. *Pediatr Pulmonol*, 2012; 48(5):456-63.
- 126.- Launes C, Garcia-Garcia JJ, Jordan I, Selva L, Rello J, Muñoz-Almagro C. Viral load at diagnosis and influenza A H1N1 (2009) disease severity in children. *Influenza Other Respi Viruses*, 2012;6(6):89-92.
- 127.- García-García ML, Calvo C, Pozo F, Villadangos PA, Pérez-Breña P, Casas I. Spectrum of respiratory viruses in children with community-acquired pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*, 2012;31(8):808-13.



128.- Marès J, Rodrigo C, Moreno-Pérez D, Cilleruelo MJ, Barrio F, Buñuel JC, González MP, González de Dios J, Aparicio M, Arístegui J, Hernández-Sampelayo T. Recomendaciones para el tratamiento de la gripe en pediatría (2009-2010) *An Pediatr (Barc)*. 2010.

129.- Hernández-Bou S, Novell CB, Alins JG, García-García JJ; Infectious Diseases Working Group, Spanish Society of Pediatric Emergencies. Hospitalized children with influenza A H1N1 (2009) infection: a Spanish multicenter study. *Pediatr Emerg Care*, 2013;29(1):49-52.

130.- Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R, Tenorio A, Casas I, Pozo F, Ruiz G, Pérez-Breña P. [Microbiological diagnosis of viral respiratory infections]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2009;27(3):168-77.

131.- Piralla A, Daleno C, Pariani E, Conaldi P, Esposito S, Zanetti A, Baldanti F. Virtual quantification of influenza A virus load by real-time RT-PCR. *J Clin Virol*, 2013;56(1):65-8.

132.- Yang W, Elankumaran S, Marr LC. Relationship between humidity and influenza A viability in droplets and implications for influenza's seasonality. *PLoS One*, 2012;7(10):e46789.

133.- Viasus D, Antón A, Pumarola T, Carratalà J. Influenza A(H1N1)pdm09: beyond the pandemic. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2012;30 Suppl 4:54-7.

134.- Viasus D, Cordero E, Rodríguez-Baño J, Oteo JA, Fernández-Navarro A, Ortega L, Gracia-Ahufinger I, Fariñas MC, García-Almodovar E, Payeras A, Paño-Pardo JR, Muñoz-Rubio E, Carratalà J; Novel Influenza A (H1N1) Study Group of the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Changes in epidemiology, clinical features and severity of influenza A (H1N1) 2009 pneumonia in the first post-pandemic influenza season. *Clin Microbiol Infect* 2012 Mar;18(3):E55-62.

135.- Vigilancia de la Gripe en España y la evolución de la pandemia por A H1N1 disponible en: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/Vigilancia_de_la_gripe_en_España_Evolucion_de_la_pandemia_por_AnH1N1_Temporada_2009-2010.pdf.

136.-Procedimientos y documentación de la Red Centinela Sanitaria disponible en: <http://www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/centinelas/red-centinela-sanitaria-castilla-leon>.

137.- García-García ML, Calvo C, Pozo F, Villadangos PA, Pérez-Breña P, Casas I. Spectrum of respiratory viruses in children with community-acquired pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*, 2012;31(8):808-13.

138.- del Rosal T, Baquero-Artigao F, Calvo C, Mellado MJ, Molina JC, Santos Mdel M, Cilleruelo MJ, Bueno M, Storch de Gracia P, Terol C, Roa MÁ, Piñeiro R, García López-Hortelano M, García-García ML, Rodríguez S, Penín M, Zarauza A, Alvarado F, de Blas A, Otheo E, Rodríguez A, Herreros ML, Tagarro A, Grande L, Ramos JT, Maté I, Muñoz C, Zafra MÁ, Romero-Gómez MP, Pérez-Fernández E, Delgado A, Casas I, Cabezas ME. Pandemic H1N1 influenza-associated hospitalizations in children in Madrid, Spain. *Influenza Other Respi Viruses*, 2011;5(6):e544-51.

139.- Angeles Marcos M, Camps M, Pumarola T, Antonio Martinez J, Martinez E, Mensa J, Garcia E, Peñarroja G, Dambrava P, Casas I, Jiménez de Anta MT, Torres A. The role of viruses in the aetiology of community-acquired pneumonia in adults. *Antivir Ther*. 2006;11(3):351-9.

140.- Camps Serra M, Cervera C, Pumarola T, Moreno A, Perelló R, Torres A, Jiménez de Anta MT, Marcos MA. Virological diagnosis in community-acquired pneumonia in immunocompromised patients. *Eur Respir J*, 2008;31(3):618-24.

141.- Ricart S, Marcos MA, Sarda M, Anton A, Muñoz-Almagro C, Pumarola T, Pons M, Garcia-Garcia JJ. Clinical risk factors are more relevant than respiratory viruses in predicting bronchiolitis severity. *Pediatr Pulmonol*, 2012; 48(5):456-63.

142- Eiros Bouza, JM^a; Bachiller Luque, MR; Ortiz de Lejarazu, R; Vega Alonso, T. Prevención de la gripe en la edad pediátrica . *An Pediatr (Barc)*, 2006;65:266-7.



143.- O'Callaghan-Gordo C, Díez-Padrisa N, Abacassamo F, Pérez-Breña P, Casas I, Alonso PL, Roca A. Viral acute respiratory infections among infants visited in a rural hospital of southern Mozambique. *Trop Med Int Health*, 2011;16(9):1054-60.

144.- Marcos MA, Ramón S, Antón A, Martínez E, Vilella A, Olivé V, Cillóniz C, Moreno A, Torres A, Pumarola T. Clinical relevance of mixed respiratory viral infections in adults with influenza A H1N1. *Eur Respir J*, 2011;38(3):739-42.

145.- Nisii C, Meschi S, Selleri M, Bordi L, Castilletti C, Valli MB, Lalle E, Lauria FN, Piselli P, Lanini S, Ippolito G, Di Caro A, Capobianchi MR. Frequency of detection of upper respiratory tract viruses in patients tested for pandemic H1N1/09 viral infection. *J Clin Microbiol*, 2010;48(9):3383-5.

146.- Cui SJ, Shi WX, Huang F, Pang XH, Deng Y. Co-infection cases of human common respiratory viruses in Beijing, 2010-2012. *Braz J Infect Dis*, 2013;17(2):281-2.

147.- Pretorius MA, Madhi SA, Cohen C, Naidoo D, Groome M, Moyes J, Buys A, Walaza S, Dawood H, Chhagan M, Haffjee S, Kahn K, Puren A, Venter M. Respiratory viral coinfections identified by a 10-plex real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assay in patients hospitalized with severe acute respiratory illness--South Africa, 2009-2010. *J Infect Dis*, 2012;206 Suppl 1:S159-65.

148.- Pino M, Kelvin DJ, Bermejo-Martin JF, Alonso A, Matías V, Tenorio A, Rico L, Eiros JM, Castrodeza J, Blanco-Quiros A, Ardura J, de Lejarazu RO. Nasopharyngeal aspirate cytokine levels 1 yr after severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Allergy Immunol*, 2009;20(8):791-5.

149.- de Castro IF, Guzmán-Fulgencio M, García-Alvarez M, Resino S. First evidence of a pro-inflammatory response to severe infection with influenza virus H1N1. *Crit Care*, 2010;14(1):115.

- 150.- Almansa R, Socias L, Sanchez-Garcia M, Martín-Loeches I, del Olmo M, Andaluz-Ojeda D, Bobillo F, Rico L, Herrero A, Roig V, San-Jose CA, Rosich S, Barbado J, Disdier C, de Lejarazu RO, Gallegos MC, Fernandez V, Bermejo-Martin JF. Critical COPD respiratory illness is linked to increased transcriptomic activity of neutrophil proteases genes. *BMC Res Notes*, 2012;5:401.
- 151.- Almansa R, Socias L, Andaluz-Ojeda D, Martín-Loeches I, Bobillo F, Blanco J, Rico L, Berezo JÁ, Estella Á, Sanchez-Garcia M, San José A, Herrero A, Justel M, Roig V, Del Olmo M, Rosich S, Rodriguez I, Disdier C, Eiros JM, Ortiz De Lejarazu R, Bermejo-Martin JF. Viral infection is associated with an increased proinflammatory response in chronic obstructive pulmonary disease. *Viral Immunol*, 2012;25(4):249-53.
- 152.- Paquette SG, Banner D, Zhao Z, Fang Y, Huang SS, León AJ, Ng DC, Almansa R, Martin-Loeches I, Ramirez P, Socias L, Loza A, Blanco J, Sansonetti P, Rello J, Andaluz D, Shum B, Rubino S, de Lejarazu RO, Tran D, Delogu G, Fadda G, Krajden S, Rubin BB, Bermejo-Martin JF, Kelvin AA, Kelvin DJ. Interleukin-6 is a potential biomarker for severe pandemic H1N1 influenza A infection. *PLoS One*, 2012;7(6):e38214.
- 153.- Bermejo-Martin JF, Martin-Loeches I, Rello J, Antón A, Almansa R, Xu L, Lopez-Campos G, Pumarola T, Ran L, Ramirez P, Banner D, Ng DC, Socias L, Loza A, Andaluz D, Maravi E, Gómez-Sánchez MJ, Gordón M, Gallegos MC, Fernandez V, Aldunate S, León C, Merino P, Blanco J, Martin-Sanchez F, Rico L, Varillas D, Iglesias V, Marcos MÁ, Gandía F, Bobillo F, Nogueira B, Rojo S, Resino S, Castro C, Ortiz de Lejarazu R, Kelvin D. Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza. *Crit Care*, 2010;14(5):R167.
- 154.- Capelastegui A, España PP, Bilbao A, Gamazo J, Medel F, Salgado J, Gorostiaga I, Lopez de Goicoechea MJ, Gorordo I, Esteban C, Altube L, Quintana JM; Poblational Study of Pneumonia (PSoP) Group. Etiology of community-acquired pneumonia in a population-based study: link between etiology and patients characteristics, process-of-care, clinical evolution and outcomes. *BMC Infect Dis*, 2012;12:134.



- 155.- Cilla G, Pérez-Trallero E. 2009 pandemic influenza A (H1N1), six months experience *Med Clin (Barc)*, 2010;135(1):21-2.
- 156.- Martínez-Baz I, Reina G, Martínez-Artola V, Fernández-Alonso M, Salcedo E, Mazón A, Castilla J; Red de Médicos Centinela de Gripe de Navarra. Influencia de los tiempos entre el inicio de síntomas, la toma de frotis nasofaríngeo y su procesamiento en laboratorio en la detección de gripe. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2012;30(1):11-4.
- 157.- González R, Balasso V, Uriona S, Rodrigo JÁ, Vaqué J, Campins M, Tórtola MT, Cebrián R, Jiménez J, Figueras C, Almirante B, Pérez-Hoyos S. Características de los pacientes y carga asistencial durante la pandemia de gripe A (H1N1) 2009 en el Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2011;29(8):593-600.
- 158.- Gasparini R, Bonanni P, Amicizia D, Bella A, Donatelli I, Cristina ML, Panatto D, Lai PL. Influenza epidemiology in Italy two years after the 2009-2010 pandemic: Need to improve vaccination coverage. *Hum Vaccin Immunother*, 2013;9(3).
- 159.- Salomão Junior JB, Gardinassi LG, Simas PV, Bittar CO, Souza FP, Rahal P, Zanetta DM. Human respiratory syncytial virus in children hospitalized for acute lower respiratory infection. *J Pediatr (Rio J)*, 2011;87(3):219-24.
- 160.- Gardinassi LG, Simas PV, Gomes DE, do Bonfim CM, Nogueira FC, Garcia GR, Carareto CM, Rahal P, de Souza FP. Diversity and adaptation of human respiratory syncytial virus genotypes circulating in two distinct communities: public hospital and day care center. *Viruses*, 2012;4(11):2432-47.
- 161.- Protocolo de diagnóstico de Virus Respiratorios disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos>.
- 162.- Pérez-Ruiz M, Pedrosa-Corral I, Sanbonmatsu-Gámez S, Navarro-Marí M. Laboratory detection of respiratory viruses by automated techniques. *Open Virol J*, 2012;6:151-9.



- 163- Pavia AT. What is the Role of Respiratory Viruses in Community-Acquired Pneumonia?: What is the Best Therapy for Influenza and Other Viral Causes of Community-Acquired Pneumonia? *Infect Dis Clin North Am*, 2013;27(1):157-75.
- 164.- Cilla G, Oñate E, Perez-Yarza EG, Montes M, Vicente D, Perez-Trallero E. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: High rate of viral coinfection. *J Med Virol*, 2008;80(10):1843-9.
- 165.- García-García ML, Calvo C, Pozo F, Villadangos PA, Pérez-Breña P, Casas I. Spectrum of respiratory viruses in children with community-acquired pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*, 2012;31(8):808-13.
- 166.- Camargo C, Guatura SB, Bellei N. Respiratory viral coinfection among hospitalized patients with H1N1 2009 during the first pandemic wave in Brazil. *Braz J Infect Dis*, 2012;16(2):180-3.
- 167.- Vega T, Lozano JE, Meerhoff T, Snacken R, Mott J, Ortiz de Lejarazu R, Nunes B. Influenza surveillance in Europe: establishing epidemic thresholds by the Moving Epidemic Method. Vega T, Lozano JE, Meerhoff T, Snacken R, Mott J, Ortiz de Lejarazu R, Nunes B. *Influenza Other Respi Viruses*. 2012.
- 168.- Centro de Gripe de la Organización Mundial de la Salud disponible en: <http://www.who.int/influenza/surveillance/en/index.html>.
- 169.- Horcajada JP, Pumarola T, Martínez JA, Tapias G, Bayas JM, de la Prada M, García F, Codina C, Gatell JM, Jiménez de Anta MT. A nosocomial outbreak of influenza during a period without influenza epidemic activity. *Eur Respir J*, 2003;21(2):303-7.
- 170.- Ruiz-Carrascoso G, Casas I, Pozo F, Pérez-González C, Reina J, Pérez-Breña P. Development and implementation of influenza a virus subtyping and detection of genotypic resistance to neuraminidase inhibitors. *J Med Virol*, 2010;82(5):843-53.
- 171.- Antón A, Pozo F, Niubó J, Casas I, Pumarola T. Influenza A(H1N1)pdm09 virus: viral characteristics and genetic evolution. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2012; 30 Suppl 4:10-7.



172.- Malakoff D. Avian influenza. Proposed H5N1 research reviews raise concerns. Science, 2012;338(6112):1271.

173.- Fauci AS. Research on highly pathogenic H5N1 influenza virus: the way forward. MBio, 2012;3(5).

174.- Guías de la buena práctica en el laboratorio de Microbiología disponible en: <http://www.seimc.org/control/>.