

Virus respiratorios identificados de pacientes hospitalizados en una institución de alta complejidad

Respiratory viruses identified from hospitalized patients in an institution of higher complexity

Luz Marina Viola¹, Robinson Pacheco², Fernando Rosso^{3,4}, Adriana Villegas¹

¹Departamento de Patología y Medicina. Laboratorio de Inmunología de Trasplantes e Inmunogenética, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia.

²Universidad Icesi, Facultad de Ciencias de la Salud, Cali, Colombia

³ Centro de Investigaciones Clínicas, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia

⁴ Departamento de Medicina Interna-Infectología, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia.

Correspondencia: Luz Marina Viola S. Departamento de Patología y Medicina. Laboratorio de Inmunología de Trasplantes e Inmunogenética, Fundación Valle del Lili, Av. Simón Bolívar. Carrera 98 No. 98-49, Santiago de Cali, Colombia. Teléfono: (572) 3319090 Ext 4262. Correo: luzmarina.viola@gmail.com - luz.viola@fvl.org.co

Recibido: 30 mayo 2019

Aceptado: 17 junio 2018

Publicado: 8 septiembre 2018

Palabras clave: virus, coinfección, PCR, Rinovirus, Influenza, Bocavirus, enfermedades tracto respiratorio, hospitalización, cuidados intensivos.

Keywords: viruses, coinfection, Polymerase Chain Reaction. Rinovirus, Influenza, Bocavirus, respiratory tract diseases, hospitalization, critical care

Citación: Viola LM, Pacheco R, Rosso F, Villegas A. Respiratory viruses identified from hospitalized patients in an institution of higher complexity. IJEPH. 1(2): e-011. Doi: 10.18041/2665-427X/ijeph.2.5056



UNIVERSIDAD LIBRE
Seccional Cali

ISSN: 2665-427X

Resumen

Introducción: Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) son un grupo de enfermedades con sintomatología respiratoria similar, causadas por bacterias o virus que se adquieren por contacto directo o a través del aire.

Objetivo: Determinar la prevalencia de virus respiratorios identificados por RT-PCR múltiplex y detección por microarreglos (CLART PneumoVir Genomica) en la Fundación Valle del Lili entre junio de 2013 y diciembre de 2014.

Métodos: Realizamos un estudio observacional descriptivo de corte transversal, se evaluaron registros de pacientes hospitalizados en la FVL entre junio de 2013 y diciembre de 2014. Las muestras fueron evaluadas por RT-PCR múltiplex y detección por microarreglos (CLART PneumoVir), se aplicó estadística descriptiva.

Resultados: De 161 muestras, 96 (60 %) fueron positivas. El servicio con la mayor proporción de pacientes positivos fue la Unidad de Cuidados Intensivos-UCI (56%). El 32 % de los aislamientos positivos se identificaron en pacientes mayores de 60 años. Los virus más frecuentemente detectados fueron: Rinovirus (30%), Influenza (H1N1/ 2009) (12 %) y Bocavirus (12 %). Influenza A (H1N1/2009) fue la cepa más comúnmente aislada entre los virus de la gripe (12%), seguido de un 11% (17 casos) con coinfección viral. No se identificó el patrón estacional.

Conclusión: La RT-PCR múltiplex y la detección por microarreglos para la identificación de los virus de mayor circulación en el mundo, son herramientas útiles, sensibles y rápidas. A diferencia de lo reportado por la literatura científica, en este estudio se observó mayor porcentaje de pruebas positivas en adultos y no se observó estacionalidad para ninguno de los virus evaluados.

Abstract

Introduction: Acute Respiratory Infections (ARI) are a group of diseases with respiratory symptoms similar caused by bacteria or viruses that are acquired by direct contact or through the air.

Objective: To determine the prevalence of detected respiratory viruses by using the test CLART PneumoVir in Fundación Valle del Lili since June 2013 to December 2014.

Methods: A cross sectional study was conducted, in patients admitted to a general hospital between June 2013 to December 2014. Samples were analysed through multiplex RT-PCR and detection by microarrays CLART PneumoVir). Descriptive statistics were used.

Results: Of 161 samples, 96 (60%) were positive. Isolation of viruses was higher in ICU patients (56%). 32 % of positive yields came from patients 60 years of age and older. The viruses most frequently detected were Rhinovirus (30%), Influenza (H1N1/2009) (12%) and Bocavirus (12%). Influenza A (H1N1/2009) was the most commonly isolated strain among Influenza viruses (12%), followed by 11% (17 cases) with viral coinfection. No seasonal pattern was identified. All patients received antibiotics.

Conclusion: The multiplex RT-PCR and detection by microarray are a tool useful, sensitive and faster for identification of virus circulation mayor in the world. Unlike what was reported in the scientific literature, this study mayor percentage of positive tests in adults was observed seasonality was observed and no para none evaluated the virus.

Contribución clave del estudio

Objetivo	Determinar la prevalencia de virus respiratorio, detectados por la prueba CLART® Pneumovir en la Fundación Clínica Valle del Lili, julio 2013 a junio 2014
Diseño del estudio	Estudio transversal observacional
Fuente de información	Se analizaron 185 muestras de hisopados y aspirados nasofaríngeos para la detección de virus respiratorios usando dos técnicas
Población / muestra	Se analizaron 125 muestras de hisopados y aspirados nasofaríngeos por la técnica CLART Pneumovir® platform y 60 muestras por Xpert® Flu (Cepheid)
Análisis estadísticos	Univariado para determinar el comportamiento de variables numéricas, se usó la prueba de Shapiro Wilk test . Análisis de tendencia temporal para determinar la frecuencia de cada aislado de virus
Principales hallazgos	De 161 muestras, 96 (60%) fueron positivas. En la UCI fue donde más se aislaron estos virus (56%). El 32% de los pacientes positivos tenían edad mayor a 60 años. Los virus con mayor detección fueron Rhinovirus (30%), Influenza (H1N1/2009) (12%) y Bocavirus (12%). Influenza A (H1N1/2009) fue la cepa que más se aisló entre los virus de influenza (12%), seguido por pacientes con coinfecciones virales 11% (17 casos). No se encontró un patrón estacional en la frecuencia de infecciones.

Introducción

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son un grupo de enfermedades que presentan una sintomatología respiratoria similar y son causadas por diversos microorganismos que pueden ser bacterias y virus. Son transmitidos por vía aérea o por vía directa en objetos contaminados con secreciones. Los virus son responsables entre el 80 y 90 % de los casos reportados de IRA, tanto en niños como en adultos (1). Los agentes causantes más frecuentes de IRA, son los llamados virus “clásicos” entre los que se encuentran los virus de la Influenza tipo A, B y C; Parainfluenza tipo 1, 2, 3 y 4 (PIV); Virus Sincitial Respiratorio humano (hVSR); Coronavirus humano (HCoV) OC43 y 229E; Adenovirus (AdV); Rinovirus (hRV), algunos Enterovirus (Echovirus-EV), y otros nuevos agentes causantes de IRA como el Metapneumovirus humano (hMPV); Bocavirus humano (HBoV); algunos mimivirus y Coronavirus humanos como el HKU1 (2).

Los principales virus causantes de IRA en la población infantil son el Virus Sincitial Respiratorio (VRS) y Parainfluenza tipo 3 en países de bajos ingresos (3-7), y son el agente etiológico del 20 al 25% de las neumonías y del 40-50% de bronqueolitis en niños hospitalizados (8).

Estos virus también son responsables de otras patologías como la gripe, la faringitis, traqueo-bronquitis y los resfriados (9). En los países con estaciones, estas infecciones son más frecuentes durante el invierno, en los países sin estaciones son más frecuentes durante la época de lluvias. Durante estas temporadas se convierten en una de las primeras causas de consulta y hospitalización en todas las edades (10,11) especialmente las causadas por el virus de la Influenza. En Estados Unidos, la IRA tiene una letalidad del 3% en menores de dos años, en Colombia llega al 5% (12) especialmente la causada por Influenza A; en adultos mayores a 65 años, algunas comorbilidades como inmunosupresión, deficiencias nutricionales, limitaciones físicas y mentales aumentan el riesgo de muerte a causa de la IRA (12).

La identificación del agente etiológico de la IRA es fundamental para el manejo clínico del paciente. Sin embargo, dada la amplia gama de agentes etiológicos se requiere evaluar los virus más prevalentes en el ambiente hospitalario. El desarrollo de técnicas moleculares para la amplificación de material genético viral a través de PCR múltiplex (CLART Pneumovir DNA array assay (Genómica, Coslada, Madrid, Spain)) permite evaluar oportunamente la presencia de los 19 virus más prevalentes en el mundo asociados a IRA, además permite detectar infecciones virales concomitantes (13-18). A pesar de la existencia de estas técnicas, en la mayoría de las ocasiones no se identifica el agente causal por lo que no se conoce con exactitud la prevalencia de los diferentes virus.

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de los virus respiratorios que son identificados por RT-PCR múltiplex y detección por microarreglos (CLART PneumoVir Genómica) en pacientes hospitalizados en la Fundación Valle del Lili entre junio de 2013 y diciembre de 2014.

Métodos

Diseño del estudio y población

Realizamos un estudio observacional descriptivo de corte transversal. Entre el 1 de junio de 2013 y 31 de diciembre de 2014, se incluyeron en el estudio pacientes de ambos sexos, de todas las edades que estuvieran hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos, urgencias y áreas de trasplantes de la Fundación Valle del Lili (FVL) a quienes se les sospechaba IRA, causada por alguno de los 19 virus que son detectados a través de la técnica RT-PCR (PCR reversa) múltiplex y detección por microarreglos (CLART® PneumoVir Genómica).

Se excluyeron aquellos pacientes sin información clínica o con información clínica incompleta.

Procedimientos

Las muestras fueron tomadas a través de hisopados y aspirados nasofaríngeos como está descrito en la Guía para la vigilancia por laboratorio del virus de la influenza y otros virus respiratorios del Instituto Nacional de Salud (19), preservadas en medio de transporte (UTMTM COPAN referencia 330C), conservadas a 4°C y remitidas inmediatamente al laboratorio para su procesamiento. Este procedimiento fue realizado para ambas plataformas, CLART® PneumoVir Genómica y Xpert® Flu (Cepheid).

Extracción de ácidos nucleicos, amplificación y detección

Los ácidos nucleicos (ADN/RNA) fueron extraídos de las muestras junto con un control negativo con el kit NucliSENS magnetic extraction reagents (Biomerieux referencia 200293) que utiliza el método Boom con partículas paramagnéticas de sílice. En resumen, se basa en la capacidad de la sílice para unir ADN y ARN en altas concentraciones de sal (20).

La amplificación se llevó a cabo mediante RT-PCR de un fragmento específico del genoma vírico de entre 120-330 pb, con el kit comercial CLART® PneumoVir que contiene dos tipos de mezclas de PCR, para cubrir todos los tipos y subtipos de virus. La PCR-1 para la amplificación de Coronavirus; Metapneumovirus (subtipos A y B); Parainfluenza virus 1, 2, 3 y 4 (subtipos A y B) y VRS-A. La PCR-2 para la amplificación de Adenovirus; Bocavirus; Enterovirus (Echovirus); Influenza virus A, B, C, e Influenza A H1N1/2009; Metapneumovirus, Rinovirus y VRS-B. Las mezclas de PCR también contiene un control interno de amplificación, para evitar resultados falsos negativos. La mezcla de PCR favorece la amplificación de los virus frente al control de amplificación (20,21).

La detección con CLART® PneumoVir se basa en la precipitación de un producto insoluble en aquellas zonas del arreglo en las que se produce la hibridación de los productos amplificados con las sondas específicas. Durante la RT-PCR, los productos amplificados se marcaron con biotina. Después de la amplificación, estos productos se hibridación con sus respectivas sondas específicas que están inmovilizadas en zonas concretas y conocidas del arreglo, tras lo que se incubó con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. El conjugado se unió a través de la estreptavidina con la biotina presente en los productos amplificados (que a su

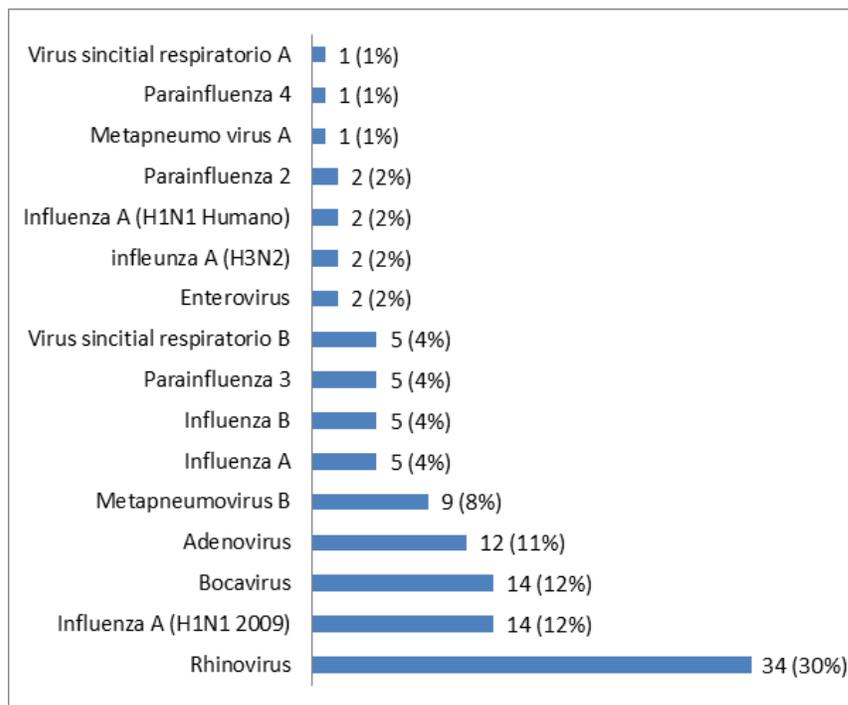


Figura 1. Frecuencia de infección por tipo de virus.

vez se encuentran unidos a sus sondas específicas) y la actividad peroxidasa provoca la aparición de un producto insoluble en presencia del sustrato o-dianisidina, con lo que se produce la precipitación de éste en las zonas del arreglo en las que ocurre la hibridación. La lectura se realizó en la plataforma CAR (Clinical Array Reader) mediante la lectura de densidad óptica, comparada a un algoritmo para cada virus. (20,21). La plataforma CLART® PneumoVir, es una prueba estandarizada por la casa comercial, la cual fue verificada antes de su implementación en el laboratorio.

El procesamiento de los datos obtenidos se realiza de manera automática por el CAR, a partir de cada uno de los análisis y se genera un informe escrito en el que se indicaron los virus amplificados obtenidos en cada una de las muestras (20,21,22).

Adicionalmente, 60 muestras fueron evaluadas por la tecnología Xpert® Flu (Cepheid) que identifica Influenza A (H1N1/2009) e Influenza B. Plataforma automatizada en la que la muestra se agregó a un cartucho especial cerrado junto con un control interno de procesamiento de la muestra (SPC), este cartucho fue insertado en el equipo GeneXpert®; dentro del cartucho un filtro captura la muestra y el SPC, las células fueron lisadas ultrasónicamente para la liberación del ADN; el ADN solubilizado se mezcló con las esferas de reactivos liofilizados, la amplificación por PCR en tiempo real y detección de fluorescencia son simultáneos, generando un resultado escrito, positivo o negativo para cada uno de los virus (23).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis univariado, para determinar el comportamiento de las variables numéricas se usó la prueba de Shapiro Wilk, aquellas con una $p > 0.05$ se consideraron con distribución normal y se presentaron con promedios y desviación estándar, y aquellas con distribución diferente a la normal se presentaron con mediana y rangos intercuartílicos

como medida resumen. Las variables categóricas se presentaron como proporciones. La prevalencia institucional de cada virus respiratorio se determinó como una proporción, tomando como numerador el número de pruebas CLART® Pneumovir positivas para cada virus y como denominador el total de las pruebas CLART® Pneumovir realizadas. Para evaluar el comportamiento de la frecuencia de los virus durante cada mes en el año, se realizó un análisis de tendencia temporal, identificando la frecuencia de cada virus aislado y comparando si hubo aumento o disminución de la frecuencia.

Este estudio se acogió a las normas internacionales de investigación de la CIOMS (Council for International Organizations of Medical Sciences), a la declaración de Helsinki y el código de Nuremberg, así como a la normativa colombiana consignada en el artículo 11 de la resolución 8430 de 1993. Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética en investigación biomédica de la Fundación Valle del Lili, según la carta de aprobación 797 de febrero de 2015.

Resultados

Durante el periodo de estudio, se evaluaron 161 pacientes con sospecha de IRA, quienes tenían una condición médica crítica, de los cuales 96 (60%) fueron positivos para al menos uno de los 19 virus incluidos en el panel. Se obtuvo un total de 114 pruebas positivas, los virus más frecuentemente detectados fueron: Rhinovirus en 34 ocasiones (30%), Influenza A (H1N1 2009), Bocavirus en 14 ocasiones (12%), y Adenovirus en 12 ocasiones (11%). En 11% de los pacientes se reportó una coinfección viral (positividad para dos o más virus), los más frecuentes observados en coinfección fueron Rhinovirus 11%, Bocavirus 9%, Adenovirus 6% e Influenza A (H1N1/2009) 2%. Ninguna de las muestras evaluadas fue positivas para Coronavirus, Influenza C o Parainfluenza 1 (Figura 1).

Los pacientes con edad mayor o igual a 61 años, fue el grupo etario con más casos positivos (32%), en este grupo se identificaron 12 de los 19 tipos de virus, seguido por el grupo de 15-45 años (25%) con 10 tipos de virus identificados. Mientras que en los menores de un año tuvo el menor porcentaje de detección de un 8% con sólo 5 tipos de virus (Tabla 1). Los servicios hospitalarios con mayor número de pacientes positivos fueron UCI y urgencias (Tabla 1).

De las 60 muestras que fueron evaluadas por Xpert® Flu y CLART® PneumoVir, en su mayoría fueron negativas para influenza A y B (Tabla 2). Sólo dos muestras fueron positivas por ambas plataformas (Xpert® Flu y CLART® PneumoVir), para Influenza A (H1N1/2009) e Influenza B. Sin embargo, de las 58 muestras (96.7%) que fueron negativas por Xpert® Flu, 6 (8.6%) resultaron positivas para Influenza A (4 para Influenza A (H1N1/2009) y 2 para Influenza A) por la plataforma CLART® PneumoVir (Tabla 2). De las 58 muestras que fueron reportadas como negativas por Xpert® Flu, 41 (70.7%) fueron positivas por la plataforma CLART® PneumoVir para al menos uno de los 19 virus evaluados por la plataforma y 17 (28.3%) muestras fueron negativas por ambas metodologías. No se observó estacionalidad para ninguno de los virus detectados.

Discusión

Este es el primer estudio realizado en pacientes de todas las edades, críticamente enfermos, hospitalizados en un centro de alta complejidad en el suroccidente colombiano, que describe la experiencia del uso de una plataforma que incorpora técnicas moleculares para la detección de los 19 virus más prevalentes en el mundo relacionados con IRA.

En nuestra población encontramos que los virus más prevalentes fueron Rhinovirus, Influenza A (H1N1 2009) y Bocavirus. Otros estudios realizados en diferentes países en los cuales se usó CLART PneumoVir presentaron diferencias en la prevalencia de los virus más frecuentes (7,24,25).

Con respecto a las co-infecciones el comportamiento en nuestra población de estudio es diferente a otras publicaciones. En el presente estudio se detectó un porcentaje de coinfección en el 11% de las muestras, siendo la combinación de virus más frecuentes Adenovirus y Rinovirus, mucho mas bajo que lo encontrado en una UCI en Francia (35%) (7) y 37% en Chile (26).

Nuestro estudio arrojó una prevalencia del 9% en la identificación de Metapneumovirus B, un poco más alto que en otras publicaciones utilizando la misma metodología, 2.7% en Chile (26), 3.7% en Grecia

(27), virus poco estudiados debido a que los métodos utilizados de rutina no lo incluían. Los primeros casos en Colombia, los describen en Medellín, donde se comienza a estudiar la presencia de este virus en nuestro país (28).

A diferencia de lo reportado por la literatura científica, en este estudio se observó un mayor porcentaje de pruebas positivas en adultos (29,30). Esta diferencia puede explicarse por el uso de otras plataformas para la tamización de virus que son más frecuentes en la población pediátrica de la FVL (31).

El envejecimiento de la población obliga a los servicios de la salud a asegurar recursos para cubrir las necesidades de la población de ancianos y es por ello, que conocer la frecuencia de los virus asociadas a IRA en adultos mayores de 60 años, es el primer paso para proponer estrategias de prevención. La demostración virológica es muy importante ya que la identificación viral específica permite iniciar una terapia antiviral adecuada cuando corresponda, evitar el uso innecesario de antibacterianos e implementar las medidas de control de infecciones entre los pacientes hospitalizados.

Las pruebas moleculares utilizadas son altamente sensibles para la identificación de los virus. La prueba CLART Pneumovir DNA array (Genomica, Coslada, Madrid, Spain) permitió identificar 19 virus más frecuentemente que están asociados a IRA, algunos de los cuales no fue posible identificar con la plataforma Xpert Flu. Con el uso de las pruebas multiplex se pueden detectar coinfecciones que podrían pasar desapercibidas con otras técnicas moleculares.

El tiempo para la que obtención de los resultados es de varias horas y esto pueden ser una limitante para que el clínico tome decisiones oportunas en los pacientes críticamente enfermos, y el costo de la prueba es superior al de otros métodos convencionales, lo que puede limitar su uso.

El aumento de la sensibilidad que permiten estas pruebas, ayudaría a realizar diagnósticos con mayor precisión y de forma mas rutinaria. Sobre todo en el curso de una infección en los que se presentan bajos niveles de los virus y que en estos casos se podrían pasar por alto cuando se usan pruebas no moleculares (29).

Conclusiones

Los virus más frecuentemente detectados en este estudio fueron: *Rhinovirus*, Influenza A (H1N1 2009), *Bocavirus* y *Adenovirus*.

Tabla 2. Comparativo muestras procesadas por ambas plataformas. Pacientes con sospecha IRA en la FVL tamizados por CLART Pneumovir y Xpert® Flu (Cepheid) entre junio de 2013 y diciembre de 2014 (n=60)

Virus	CLART Pneumovir			Xpert® Flu (Cepheid)		
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Influenza A (H1N1)	8	52	60	2	58	60
Influenza B	2	58	60	2	58	60
Otros virus	41	17	58	N/A	N/A	N/A

No se detectó ningún paciente con virus de Parainfluenza A y B durante este lapso de tiempo estudiado.

El mayor porcentaje de pacientes positivos fueron mayores de 60 años y de sexo femenino. La mayoría de los pacientes con prueba positiva se encontraban en el servicio de UCI.

La tecnología CLART®Pneumo Vir permite detectar y caracterizar la presencia de 19 virus humanos (tipos y subtipos) que causan infección respiratoria. Permite la detección de mínimas cantidades de ácidos nucleicos de diferentes virus en muestras de hisopado o lavado nasofaríngeo de manera rápida y altamente específica.

Agradecimientos:

Departamento de Patología y Medicina de laboratorio, Fundación Valle del Lili.

Conflicto de interés: Todos los investigadores manifiestan no tener conflictos de interés.

Financiación: Centro de Investigaciones Clínicas Fundación Valle del Lili, Cali-Colombia

Referencias

1. Debbia A, Schito GC, Zoratti A, Gualco L, Tonoli E, Marchese A. Epidemiology of major respiratory pathogens. *J Chemother*. 2001; 13 Spec 1(1):205-210. DOI: 10.1179/joc.2001.13.Suplemento2.205
2. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de vigilancia en salud pública. Infección respiratoria aguda (IRA). Códigos: 345, 348, 591,995. Versión 3; 2014.
3. Heyman PVV, Carper HT, Murphy DD, Platss-Mills TA, Patrie J, McLaughlin AP. Viral infections in relation to age, atopy, and season of admission among children hospitalized for wheezing. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114: 239-47.
4. Miguel C, Amela C. Neumonías en España 1982-1992. *Bol Epidemiol Semanal*. 1993; 1(7): 123-9.
5. Donowitz GR, Mandell GL. Neumonía aguda. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (eds). Principios y práctica de las enfermedades infecciosas. Editorial Médica Panamericana SA: Buenos Aires; 1997. pp: 682-702.
6. OPS. La salud en las Américas 2007. Volumen II-Paises. Publicación Científica y Técnica No. 622. Washington: OPS; 2002.
7. Cruz-Cañete M, Moreno-Pérez D, Jurado-Ortiz A, García-Martín FJ, López-Siles J, Olalla-Martín L. El virus de la gripe en pediatría. Un motivo de hospitalización. *Enfermedades Infecciosas Microbiol Clín*. 2007; 25(3): 177-183.
8. Frobert E, Escuret V, Javouhey E, Casalegno JS, Bouscambert-Duchamp M, Moulinier C, et al. Respiratory viruses in children admitted to hospital intensive care units: evaluating the CLART® Pneumovir DNA array. *J Med Virol*. 2011; 83(1): 150-155.

9. OMS. Vacunas contra la influenza. *Bol Epidemiol Semanal*. 2005; 80(33): 279-328.
10. OPS. Prevención y control de la influenza. *Rev Panam Salud Pública*. 2002; 12(1): 63-70.
11. Ramírez A, Mendoza A, Montoya J, Còtes K, López JD, Herrera D, et al. Mortalidad asociada con las temporadas de mayor circulación de los virus de la influenza en Bogotá, Colombia, 1997-2005. *Rev Panam Salud Pública*. 2009; 26(5): 435-9.
12. Herrera GA, Iwane MK, Cortese M, Brown C, Gershman K, Shupe A, et al. Influenza vaccine effectiveness among 50–64-year-old persons during a season of poor antigenic match between vaccine and circulating influenza virus strains: Colorado, United States, 2003–2004. *Vaccine*. 2007; 25(1): 154-160.
13. Cilla G, Onate E, Pérez-Yarza EG, Montes M, Vicente D, Pérez-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: 1843-9.
14. Bonzel L, Tenenbaum T, Schrotten H, Schildgen O, Schweitzer-Krantz S, Adams O. Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J*. 2008; 27: 589-94.
15. Noyola DE, Rodríguez-Moreno G, Sánchez-Alvarado J, Martínez-Wagner R, Ochoa-Zavala JR. Viral etiology of lower respiratory tract infections in hospitalized children in Mexico. *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23: 118-23.
16. Hustedt JW, Vázquez M. The changing face of pediatric respiratory tract infections: how human metapneumovirus and human bocavirus fit into the overall etiology of respiratory tract infections in young children. *Yale J Biol Med*. 2010; 83: 193-200.
17. Leung TF, To MY, Yeung AC, Wong YS, Wong GW, Chan PK. Multiplex molecular detection of respiratory pathogens in children with asthma exacerbation. *Chest*. 2010; 137: 348-54.
18. Van der Zalm MM, van Ewijk BE, Wilbrink B, Uiterwaal CS, Wolfs TF, van der Ent CK. Respiratory pathogens in children with and without respiratory symptoms. *J Pediatr*. 2009; 154: 396-400.
19. Instituto Nacional de Salud. Guía para la vigilancia por laboratorio del virus de la influenza y otros virus respiratorios. Dirección Redes en Salud Pública, Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia, Grupo de Virología; 2017.
20. Biomerieux. Guía rápida para el procesamiento muestras para virus respiratorios por MiniMAG. Versión 1.1; 2017
21. Genomica. Clinical Array Reader (CAR) Manual. Version 5. 2011. Disponible en: http://genomica.es/documents/manual_car_v5_feb11.pdf

22. Genomica. CLART® PneumoVir. Caracterización de virus causantes de infecciones respiratorias humanas mediante identificación genómica para diagnóstico in vitro. 2010. Versión 8; 6-8. Disponible en: <http://genomica.es/es/documents/CLARTPneumoVirV8Nov2010castellano.pdf>
23. Cepheid. Xpert-flu. Detection of Flu A and Flu B with 2009 H1N1. Disponible en: <https://www.cepheid.com/en/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/critical-infectious-diseases/xpert-flu>
24. Costa E, Rodríguez-Domínguez M, Clari MÁ, Giménez E, Galán JC, Navarro D. Comparison of the performance of 2 commercial multiplex PCR platforms for detection of respiratory viruses in upper and lower tract respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015; 82(1): 40-43. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.02.004.
25. Renois F, Talmud D, Huguenin A, Moutte L, Strady C, Cousson J, et al. Rapid detection of respiratory tract viral infections and co-infections in patients with influenza-like illnesses by use of RT-PCR DNA microarray systems. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(11): 3836-42. doi: 10.1128/JCM.00733-10
26. Martínez P, Cordero J, Valverde C, Unanue N, Dalmazzo R, Piemonte P, et al. Co-infección viral respiratoria en niños hospitalizados por infección respiratoria aguda y su impacto en la gravedad clínica. *Rev Chilena Infectol*. 2012; 29(2): 169-174.
27. Kouni S, Karakitsos P, Chranioti A, Theodoridou M, Chrousos G, Michos A. Evaluation of viral co-infections in hospitalized and non-hospitalized children with respiratory infections using microarrays. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19(8): 772-777.
28. Espinal DA, Hurtado IC, Arango AE, García J, Laguna-Torres VA, Jaramillo S. Human metapneumovirus in children: first cases in Colombia. *Biomédica*. 2012; 32(2): 174-178.
29. Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev*. 2008; 21(4): 716-747.
30. Li H, McCormac MA, Estes RW, Sefers SE, Dare RK, Chappell JD, et al. Simultaneous detection and high-throughput identification of a panel of RNA viruses causing respiratory tract infections. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(7): 2105-2109.
31. Ren L, Gonzalez R, Wang Z, Xiang Z, Wang Y, Zhou H, et al. Prevalence of human respiratory viruses in adults with acute respiratory tract infections in Beijing, 2005–2007. *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15(12): 1146-1153.

©Universidad Libre 2018. Licence Creative Commons CCBY-NC-ND-4.0. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

