



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i de Microbiologia

Facultat de Ciències

**EPIDEMIOLOGIA DE LES INFECCIONS RESPIRATÒRIES
VÍRIQUES A L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU:
ESTUDI RETROSPECTIU DE 17 ANYS, I AVALUACIÓ DE DOS
MÈTODES MOLECULARS PEL DIAGNÒSTIC VIROLÒGIC.**

Memòria de Tesi presentada per obtenir el títol de Doctor en Microbiologia per la
Universitat Autònoma de Barcelona

Laura Garcia Arroyo

Barcelona, 2015

Vist i plau dels Directors de la Tesi,

Dra. Núria Rabella Garcia

Dr. Ferran Navarro Risueño

Núria Rabella Garcia i Ferran Navarro Risueño, Professors Associats Mèdics del Departament de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEM:

Que la present tesis titulada **“Epidemiologia de les infeccions respiratòries víriques a l’Hospital de la Santa Creu i Sant Pau: estudi retrospectiu de 17 anys, i avaluació de dos mètodes moleculars pel diagnòstic virològic”** que presenta Laura Garcia Arroyo per optar al títol acadèmic de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona ha estat realitzada sota la nostra direcció i compleix amb els requisits necessaris per la seva tramitació i posterior defensa davant del tribunal corresponent.

I perquè així consti, firmem aquest document als efectes oportuns a Barcelona, el 4 de Setembre de 2015.

Dra. Núria Rabella Garcia

Dr. Ferran Navarro Risueño

Pel llarg camí

No volia començar els agraïments dient que no tenia prou paraules per descriure com em sento, però resulta que és cert. Per molt que escrigui, serà difícil poder agrair tot el treball que han fet per mi totes aquelles persones que m'han ajudat amb el desenvolupament d'aquesta tesis.

Al Dr. Pere Coll Figa, cap del servei de Microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, per permetre'm realitzar aquesta tesis doctoral i pel suport i consells rebuts.

A la meva directora de la tesis, la Dra. Núria Rabella per tot i em quedo curta. Pel temps, les idees, la saviesa, les correccions, les discussions, els diumenges, la familiaritat i els fruits secs... Però sobretot per confiar en mi, donar-me sempre suport i no perdre mai l'esperança de que aquest projecte era possible. Per ensenyar-me i fer-me veure que mai t'has de conformar ni rendir, i que sempre tot és millorable si es mira des d'un altre punt de vista.

Al meu director, el Dr. Ferran Navarro, per la confiança, els consells i el suport que he rebut. Per ensenyar-me i pressionar-me, per qüestionar les decisions i donar-me la possibilitat de millorar sempre.

A la Dra. Núria Prim Bosch per tot el temps i ajuda rebuts. Agrair-li la seva col·laboració en aquesta tesis és quedar-se curta, ha estat gràcies a la seva ajuda que el primer article publicat ha estat possible, i se'ns dubte ho serà per algun més. Se que ella diria que és que li agrada, però la seva ajuda ha estat molt més de la que es rebria per simple afició.

A Margarita del Cuerpo, per ser una amiga i una confident. Una gran persona que no només és experta científica, sinó que és experta en relacions personals. La seva dedicació i l'ajuda desinteressada que sempre m'ha proporcionat amb la recopilació de dades, han permès que recollís tota la informació necessària pel treball, sense les qual no hauria pogut desenvolupar aquesta tesis.

Als Drs. adjunts del laboratori de Microbiologia, la Dra. Beatriz Mirelis, la Dra. Carme Muñoz, el Dr. Ferran Sánchez i la Dra. Núria Margall, per ensenyar-me durant la rotació que vaig fer al laboratori pels diferents departaments del laboratori. Cadascun em va ensenyar a estimar encara més la microbiologia.

A tots els companys del laboratori de Microbiologia per ajudar-me sempre amb tot el que preguntava i animar-me per acabar, amb especial èmfasi per Neus Martí, Pilar Marin, Rosa Labeaga, Carme Roig i Mercè Herrero, per compartir tants moments i experiències.

A Carolyn Newey, coordinadora del servei de Suport Lingüístic de l'hospital per les seves correccions en anglès i pel criteri que sempre dona amb la seva feina.

Al Dr. Ignasi Gich del departament d'Epidemiologia Clínica de l'hospital per la seva inestimable ajuda amb els càlculs estadístics.

A tots els meus amics, per estar sempre que els he necessitat. Tinc la sort de tenir moltes persones especials a la meua vida. En especial als meus amics de la carrera: Nadia Braviz, Isaac Naval, Víctor Pelayo, Marc Escobar, Begoña Pérez, Juan Maldonado, Laura Garrido i Julio Palazón, que són les

persones més meravelloses, divertides i increïbles que he conegut. Que haig de dir d'ells que no sàpiguem, estiguem junts o separats per milers de kilòmetres, sempre puc comptar amb vosaltres i això no te preu. Els viatges, les experiències, els mil i un moments viscuts i compartits, per tots els que han sigut i seran.

A Núria Capdevila i Ingrid Benito, dues amigues amb les que la vida demostra que quan estàs destinat a coincidir amb algú, l'univers conspira perquè sigui possible.

I sempre, sense poder plasmar en paraules, tres persones molt especials que, conegudes en diferents moments de la vida, m'han donat tantíssim i mai els ho agrairé el suficient: Gemma Prats, Mònica Vidal i Joan Colás, sou més que amics, sou família.

A la meva família, en especial als meus pares, pels quals mai faré res malament i sempre estaran orgullosos de mi i això fa que sempre em feu creure en les meves possibilitats, us estimo i sou el més important que tinc.

A la resta de la meva família "postissa", gràcies per acceptar-me, donar-me suport i fer-me sentir una més. Heu ampliat els membres de qui puc dir família. Queralt, ets el més semblant a una germana de veritat.

I Marc, això és gràcies a tu. Saps que sobren les paraules i que sempre seràs la meva casualitat i el meu lloc per estar. I quan dintre d'uns anys algú em preguntí si després de tant de temps, la resposta serà *Always*.

A tothom, altre vegada, GRÀCIES.

I ara puc dir allò de: *Bravo!, voy a comer mayonesa.*

Resum

En aquesta tesi s'ha determinat l'epidemiologia dels principals virus respiratoris circulants en el nostre medi i s'ha avaluat l'aportació de la tecnologia molecular al diagnòstic de rutina de les infeccions respiratòries víriques.

Es van recollir les dades dels virus respiratoris detectats entre gener de 1997 i desembre de 2013, a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Es va analitzar la freqüència, la distribució estacional i la relació entre els virus detectats amb l'edat i el sexe dels pacients. Les mostres incloses van ser mocs nasofaringis, exsudats nasals i faringis, rentades broncoalveolars i biòpsies pulmonars i es van analitzar mitjançant tècniques d'immunocromatografia, immunofluorescència (IF), cultiu cel·lular (CC) i detecció d'àcids nucleics dels virus gripals.

De les 36.744 mostres estudiades, 13.201 (35,9%) van resultar positives per un o més virus. En total es van detectar 13.630 virus respiratoris, dels quals el RSV (29,4%) va ser el virus més detectat, el FLUAV (28,7%) el segon i l'AdV (14,7%) el tercer. La resta de virus respiratoris es van detectar amb una freqüència inferior al 10%: EV (9,3%), FLUBV (6,7%), hMPV (5,1%), RV (4,4%), PIV-3 (3%), PIV-1 (1,1%) i PIV-2 (<1%). Es van trobar 428 co-deteccions (3,2%).

Els RSV, FLUAV, AdV, EV i PIV-3 es van detectar durant tots els anys. La resta van presentar una distribució heterogènia al llarg dels anys. Els mesos amb més deteccions positives van ser els mesos d'hivern i els de menys, els mesos d'estiu. Alguns virus presentaven una distribució estacional en forma de pics en mesos concrets: el RSV durant els mesos de novembre a gener, el hMPV de febrer a maig, el FLUAV de desembre a març, el FLUBV de gener a març i el PIV-2 de setembre a desembre. La resta dels virus respiratoris es van detectar al llarg de tot l'any. Les co-deteccions es van trobar principalment entre octubre i març durant tots els anys. De manera destacada, durant la pandèmia de virus gripal de 2009/2010 el FLUAV va representar el 43% dels virus detectats mentre que el 57% corresponia a altres virus respiratoris.

En menors de 6 mesos, es va detectar almenys un virus respiratori en un 37,4% de les mostres; de 6 a 12 mesos en un 51,2%; entre 1 i 3 anys, en un 50,8%; entre 3 i 5 anys, en un 42,7% i entre 5 i 18 anys en un 32,2%. A partir d'aquesta edat el percentatge de positivitat era al voltant del 15%.

El 56,1% i el 43,9% dels virus detectats eren de mostres d'homes i dones, respectivament. Aquesta ràtio home:dona superior a 1 es va trobar en tots els grups d'edat excepte en els rangs de 18 a 40 anys.

Per determinar l'aportació de les tècniques de PCR al diagnòstic dels virus respiratoris, es van comparar dues tècniques moleculars: Seeplex® que utilitza la tecnologia DPO™ (*Dual Priming Oligonucleotide*) i CLART®, amb tecnologia de *microarrays*. Es van analitzar 80 mocs nasofaringis de pacients menors de 6 anys amb sospita d'infecció respiratòria vírica.

En la comparació entre els mètodes moleculars i els convencionals es va observar que els resultats variaven segons la tècnica. Es van obtenir 37, 40 i 62 mostres positives per IF/CC, Seeplex® i CLART®, respectivament. Seeplex® i CLART® van detectar 11 i 57 virus més que IF/CC, respectivament. Dels virus detectats només per PCR, el 72% corresponien a RV, hMPV, HCoV-OC43, PIV-4, FLUCV i HBoV. Mitjançant PCR es van trobar co-deteccions en 30 mostres i cap per IF/CC. El gran repte que planteja el diagnòstic molecular de les infeccions respiratòries víriques és poder determinar si el virus detectat és el causant del quadre clínic del pacient.

Summary

The present thesis aimed to determine the epidemiology of the main respiratory viruses circulating in our geographical area. The contribution of molecular techniques to the routine diagnosis of the infections caused by these viruses was also evaluated.

Data of the respiratory viruses detected at *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* between January 1997 and December 2013 were collected. The circulation of respiratory viruses, including frequency and seasonal distribution, was analysed. The relationship between the viruses detected and the age and sex of the patients was also evaluated. The clinical specimens analysed included nasopharyngeal aspirates, nasal and pharyngeal exudates, bronchoalveolar lavages and lung biopsies. The virological studies were performed by cell culture (CC), immunochromatography and immunofluorescence (IF); a nucleic acid amplification technique (NAAT) for detection of Influenza viruses was also used.

A total of 36,744 clinical specimens were studied. Of these, 13,201 (35.9%) were positive for one virus or more than one. Overall 13,630 respiratory viruses were identified: RSV (29.4%) was the most frequently detected, followed by FLUAV (28.7%) and AdV (14.7%). The other viruses were detected in a frequency under 10%: EV (9.3%), FLUBV (6.7%), hMPV (5.1%), RV (4.4%), PIV-3 (3%), PIV-1 (1.1%) and PIV-2 (<1%). A total of 428 co-detections were identified (3.2%).

RSV, FLUAV, AdV, EV and PIV-3 were detected every year. The other respiratory viruses had a heterogeneous distribution throughout the years under study. Overall the highest number of positive detections was obtained during the winter months and the fewest in summer. Some viruses followed a seasonal distribution showing a pick in definite months: RSV from November to January, hMPV from February to May, FLUAV from December to March, FLUBV from January to March, and PIV-2 from September to December. The remaining respiratory viruses under study were detected throughout the year. Co-detections were mainly found from October to March every year. Noteworthy during the influenza pandemic (2009-2010), FLUAV corresponded to only 43% of all the respiratory viruses.

Respiratory viruses were more frequently identified in children. Viral detection was obtained in 37.4%, 51.2%, 50.8%, 42.7% and 32.2% of the samples from children under 6 months of age, under 1 year,

between 1 and 3 years, between 3 and 5 years, and between 5 and 18 years, respectively. The average of positivity in adults was 15%.

Regarding the sex of the patients, 56.1% and 43.9% of viral detections corresponded to samples from men and women, respectively. The ratio men:woman over 1 was found in all age groups but young adults (ranging from 18 to 40 years).

To determine the contribution of NAATs to the diagnosis of respiratory viral infection, two molecular techniques were compared: Seeplex® based on the DPO™ system (Dual Priming Oligonucleotide) and CLART®, based on microarray technology. These techniques were also compared to conventional techniques (IF/CC). Eighty nasopharyngeal aspirates were collected from children under six years of age attended for acute respiratory illness. The main finding was that both NAATs used to detect respiratory viruses yielded different results. NAATs and IF/CC results also differed. The number of positive samples was 40, 62 and 37 for Seeplex®, CLART® and IF/CC, respectively. Seeplex® and CLART® detected 11 and 57 viruses more than IF/CC, respectively. Considering those viruses detected only by PCR, about 72% corresponded to RV, hMPV, HCoV-OC43, PIV-4, FLUCV, and HBoV. Co-detections were detected in 30 samples by NAATs whereas none was detected by IF/CC. The main challenge posed by molecular techniques in the diagnosis of respiratory virus infections is the difficulty in determining whether a virus detected is related to the current symptoms of the patient.

Índex

1. INTRODUCCIÓ	1
ELS VIRUS I LES INFECCIONS RESPIRATÒRIES	2
MANIFESTACIONS CLÍNiques DE LES INFECCIONS DEL TRACTE RESPIRATORI	3
Infeccions del tracte respiratori superior	4
Infeccions del tracte respiratori inferior	6
La grip	8
VIRUS RESPIRATORIS	9
Virus gripal A	9
Virus gripal B	18
Virus gripal C	21
Virus parainfluença	24
Virus respiratori sincicial	28
Metapneumovirus	31
Rinovirus	34
Enterovirus	38
Adenovirus	41
Bocaparvovirus	46
Coronavirus	49
Altres virus causants de malaltia respiratòria	53
DIAGNÒSTIC ETIOLÒGIC	56
Mostres: tipus, recollida i transport	56
Tècniques de detecció d'antigen	57
Tècniques d'aïllament víric	60
Tècniques de detecció d'àcids nucleics	65
Interpretació dels resultats	72
EPIDEMIOLOGIA	73
Programa de vigilància de la grip	73

2. ÀMBIT ACTUAL I OBJECTIUS	75
3. MATERIAL I MÈTODES	77
PERÍODE D'ESTUDI	77
ÀMBIT, PACIENTS I MOSTRES	77
Mostres d'estudi	78
Recollida i transport al laboratori	79
Recepció, emmagatzematge i processament de les mostres	79
DIAGNÒSTIC VIROLÒGIC CONVENCIONAL	80
Tècniques de detecció d'antigen	80
Tècniques d'aïllament en cultiu cel·lular	85
Detecció molecular de virus gripals	90
DIAGNÒSTIC MOLECULAR DE LA INFECCIÓ RESPIRATÒRIA EN MOSTRA PEDIÀTRICA	100
Extracció d'àcids nucleics	100
Detecció d'àcids nucleics pel sistema Seeplex®	102
Detecció d'àcids nucleics pel sistema CLART®	106
ANÀLISI DE DADES	110
Anàlisi epidemiològic	110
Anàlisi molecular comparatiu	111
Estudi estadístic	111
4. RESULTATS	113
OBJECTIU 1:	
CONÈIXER LA FREQUÈNCIA DELS DIFERENTS VIRUS RESPIRATORIS DETECTATS	117
OBJECTIU 2:	
CONÈIXER LA DISTRIBUCIÓ ESTACIONAL DELS DIFERENTS VIRUS RESPIRATORIS DETECTATS	119
OBJECTIU 3:	
CONÈIXER LA RELACIÓ ENTRE ELS VIRUS DETECTATS I L'EDAT I EL SEXE DELS PACIENTS	154

OBJECTIU 4:	
DETERMINAR LA FREQUÈNCIA D'ALTRES VIRUS RESPIRATORIS DURANT LA PANDÈMIA DE FLUAV H1N1 PDM09 _____	164
OBJECTIU 5:	
AVALUAR L'APORTACIÓ DE LES TÈCNiques MOLECULARS AL DIAGNÒSTIC DE RUTINA DE LES INFECCIONS RESPIRATÒRIES EN LA POBLACIÓ PEDIÀTRICA _____	167
5. DISCUSSIÓ _____	175
6. CONCLUSIONS _____	193
7. BIBLIOGRAFIA _____	195
8. ANNEXOS _____	215
ANNEX I _____	216
ANNEX II _____	218
ANNEX III _____	222

Taules

Taula 1. Classificació taxonòmica i nomenclatura dels principals virus respiratoris _____	3
Taula 2. Característiques diferencials entre una pandèmia i una epidèmia per virus gripal A _____	14
Taula 3. Classificació i nomenclatura actual de les principals espècies del gènere <i>Enterovirus</i> que afecten a l'esser humà _____	35
Taula 4. Classificació dels adenovirus d'acord amb el perfil epidemiològic i clínic _____	44
Taula 5 (1). Comparació de les principals NAAT disponibles comercialment per a la detecció de virus respiratoris _____	70
Taula 5 (2). Comparació de les principals NAAT disponibles comercialment per a la detecció de virus respiratoris _____	71
Taula 6. Línies cel·lulars emprades per l'aïllament víric _____	85
Taula 7. Material subministrat per a l'extracció dels àcids nucleics pel Sistema automatitzat <i>NucliSENS easyMAG (BioMérieux®)</i> _____	91
Taula 8. <i>Master-mix</i> per a la primera RT-PCR a temps real _____	94
Taula 9. <i>Master-mix</i> per al control intern <i>RnasAP</i> _____	94
Taula 10. Encebadors per a l'amplificació i identificació dels diferents virus gripals _____	95
Taula 11. Encebadors per a l'amplificació i identificació del control intern <i>RNasaP</i> _____	95
Taula 12. <i>Master-mix</i> per a la segona RT-PCR a temps real _____	96
Taula 13. Encebadors per a l'amplificació i tipificació dels diferents FLUAV _____	97
Taula 14. Materials i reactius del <i>Kit Xpert Flu A Panel (Cepheid®)</i> _____	98
Taula 15. Materials i reactius del <i>EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen®)</i> _____	101
Taula 16. <i>Master-mix</i> per a la retrotranscripció del mètode Seeplex® (Seegene) _____	103
Taula 17. <i>Master-mix</i> per a l'amplificació dels àcids nucleics del mètode Seeplex® (Seegene) _____	104
Taula 18. Materials i reactius per a l'amplificació del <i>kit CLART® PneumoVir (GENOMICA)</i> _____	107
Taula 19. Materials i reactius per a la visualització dels amplificats del <i>kit CLART® PneumoVir (GENOMICA)</i> _____	108
Taula 20. Distribució mensual de les mostres rebudes cada any durant el període d'estudi _____	114

Taula 21. Total de virus detectats i percentatge de cadascun d'ells _____	117
Taula 22. Combinació dels virus respiratoris (n=854) detectats en co-deteccions dobles (n=427) _____	118
Taula 23. Percentatge de cada virus sobre el total de virus de cada any d'estudi _____	119
Taula 24. Distribució mensual dels virus respiratoris detectats durant el període d'estudi _____	148
Taula 25. Relació dels diferents virus detectats segons el rang d'edat en mostres processades per estudi complet de virus respiratoris (n=33.696) _____	155
Taula 26. Relació dels virus gripals detectats per PCR segons el rang d'edat _____	157
Taula 27. Total de virus detectats segons els sexe del pacient i la ràtio total _____	162
Taula 28. Relació entre el sexe i els rangs d'edat _____	163
Taula 29. Virus respiratoris detectats amb les tècniques convencionals i moleculars durant el període pandèmic _____	164
Taula 30. Comparació entre les mostres i els virus respiratoris detectats durant la pandèmia de FLUAV H1N1 pdm09, i les mostres i els virus respiratoris detectats durant les temporades corresponents al mateix període de la resta d'anys _____	166
Taula 31. Total de virus detectats per cada tècnica en el total de mostres analitzades (n=80) _____	167
Taula 32. Total de virus detectats per cada tècnica tenint en compte el criteri de positivitat _____	169
Taula 33. Co-deteccions totals _____	170
Taula 34. Global de virus respiratoris detectats amb les tres tècniques d'estudi _____	171

Figures

Figura 1. Estructures anatòmiques que formen part del tracte respiratori superior _____	4
Figura 2. Relacions genètiques rellevants dels virus gripals A (1918-2009) _____	11
Figura 3. Estructura dels virions del virus gripal A _____	12
Figura 4. Estructura dels virions del virus gripal B _____	19
Figura 5. Estructura dels virions del virus gripal C _____	22
Figura 6. Estructura dels virions de la subfamília <i>Paramyxovirinae</i> , a la qual pertanyen els virus parainfluença _____	25
Figura 7. Estructura dels virions de la subfamília <i>Pneumovirinae</i> , a la qual pertanyen el virus respiratori sincicial i el metapneumovirus _____	29
Figura 8. Estructura dels virions del gènere <i>Enterovirus</i> , al qual pertanyen els rinovirus i els enterovirus _____	36
Figura 9. Estructura dels virions del gènere <i>Mastadenovirus</i> , corresponent a l'estructura bàsica dels adenovirus _____	42
Figura 10. Estructura dels virions del gènere <i>Bocaparvovirus</i> , corresponent a l'estructura bàsica dels bocaparvovirus _____	47
Figura 11. Estructura dels virions de la subfamília <i>Coronavirinae</i> , a la qual pertanyen els coronavirus _____	50
Figura 12. Patrons típics d'immunofluorescències _____	82
Figura 13. Patrons de resultats possibles en la prova d'immunocromatografia _____	84
Figura 14. Esquema del sistema DPO™ _____	102
Figura 15. Esquema de visualització dels resultats obtinguts per a una mostra pel mètode Seeplex® _____	105
Figura 16. Esquema del tub AT utilitzat al mètode CLART® _____	106
Figura 17. Esquema de visualització de uns resultats obtinguts per un array pel mètode CLART® _____	109
Figura 18. Distribució anual de les mostres totals i els positius detectats durant 1997-2013 _____	115

Figura 19. Distribució estacional de les mostres totals i els positius detectats durant 1997-2013	116
Figura 20. Distribució anual del número total de virus respiratoris detectats	120
Figura 21. Virus detectats cada mes de l'any 1997	121
Figura 22. Virus detectats cada mes de l'any 1998	122
Figura 23. Virus detectats cada mes de l'any 1999	123
Figura 24. Virus detectats cada mes de l'any 2000	124
Figura 25. Virus detectats cada mes de l'any 2001	125
Figura 26. Virus detectats cada mes de l'any 2002	126
Figura 27. Virus detectats cada mes de l'any 2003	127
Figura 28. Virus detectats cada mes de l'any 2004	128
Figura 29. Virus detectats cada mes de l'any 2005	129
Figura 30. Virus detectats cada mes de l'any 2006	130
Figura 31. Virus detectats cada mes de l'any 2007	131
Figura 32. Virus detectats cada mes de l'any 2008	132
Figura 33. Virus detectats cada mes de l'any 2009	133
Figura 34. Virus detectats cada mes de l'any 2010	134
Figura 35. Virus detectats cada mes de l'any 2011	135
Figura 36. Virus detectats cada mes de l'any 2012	136
Figura 37. Virus detectats cada mes de l'any 2013	137
Figura 38. Distribució dels RSV, FLUAV i FLUBV detectats. Es mostren la seqüència d'anys de 1997 fins 2005	140
Figura 39. Distribució dels RSV, FLUAV i FLUBV detectats. Es mostren la seqüència d'anys de 2005 fins 2013	141
Figura 40. Distribució dels AdV, EV i RV detectats. Es mostren la seqüència d'anys de 1997 fins 2005	142
Figura 41. Distribució dels AdV, EV i RV detectats. Es mostren la seqüència d'anys de 2005 fins 2013	143

Figura 42. Distribució dels PIV-1, PIV-2 i PIV-3 detectats. Es mostren la seqüència d'anys de 1997 fins 2005	144
Figura 43. Distribució dels PIV-1, PIV-2 i PIV-3 detectats. Es mostren la seqüència d'anys de 2005 fins 2013	145
Figura 44. Distribució dels hMPV i les co-deteccions detectades. Es mostren la seqüència d'anys de 2005 fins 2013 pels hMPV, i de 1997 fins 2013 per les co-deteccions	146
Figura 45. Distribució estacional del total de virus respiratoris detectats. Els virus i les mostres dels 17 anys d'estudi s'han agrupat per mesos i s'han ordenat de juliol a juny	149
Figura 46. Patrons individuals d'estacionalitat de cada virus respiratori	150
Figura 47. Patrons d'estacionalitat del FLUAV	152
Figura 48. Patrons d'estacionalitat de les co-deteccions	153
Figura 49. Relació entre les mostres rebudes i els positius detectats segons els diferents rangs d'edat establerts	154
Figura 50 (1). Relació entre els rangs d'edat i els virus detectats	158
Figura 50 (2). Relació entre els rangs d'edat i els virus detectats	159
Figura 51. Relació entre els virus detectats i el rang d'edat	161
Figura 52. Virus respiratoris detectats durant la pandèmia del FLUAV H1N1 pdm09	165
Figura 53. Virus respiratoris detectats segons el quadre clínic (ITRS o ITRI)	172
Figura 54. Distribució estacional dels virus respiratoris detectats segons el quadre clínic	173

Abreviacions

µl, microlitres

µg, micrograms

293T, línia cel·lular de ronyó embrionari humà

A-549, línia contínua de carcinoma pulmonar humà

AdV, adenovirus

AT, *Array Tube*

BAL, rentada broncoalveolar

BME, medi basal essencial

BSA, albúmina sèrica bovina

Caco-2, línia cel·lular d'adenocarcinoma de còlon humà

CAR, receptor de la superfície cel·lular

CC, cultiu cel·lular

CD46, CD80 i CD86, glicoproteïnes de la superfície cel·lular

CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*

CP, proteïnes víriques de la càpsida

D, dones

DC, solució de conjugació

DNA, àcid desoxiribonucleic

DNAc, DNA complementari

dNTP, desoxinucleòtid trifostat

DPO™, *Dual Priming Oligonucleotide*

dsDNA, DNA de cadena doble

E, proteïna d'embolcall viral

ECP, efecte citopàtic

ED, Edat desconeguda

EIA, enzimoimmunoanàlisis

EISS, *European Influenza Surveillance Scheme*

EV, enterovirus

F, proteïna vírica de fusió

FDA, Administració d'Aliments i Medicaments

FLUAV, virus gripal A

FLUBV, virus gripal B

FLUCV, virus gripal C

G, glicoproteïna vírica gran

H, homes

HA, hemaglutinina

HBoV, bocaparvovirus

HCoV, coronavirus

HDA, amplificació dependent d'helicasa

hDAF, receptor factor accelerador de la degradació humana

HE, hemaglutinina-esterasa

HEF, proteïna hemaglutinina-esterasa de fusió

HeLa, Línia contínua de carcinoma de cèrvix humà

HEP-2, Línia contínua de carcinoma de laringe humà

HHV-1, virus de l'herpes humà tipus 1

HHV-3, virus varicel·la-zòster o virus de l'herpes humà tipus 3

HHV-4, virus Epstein-Barr o virus de l'herpes tipus 4

HHV-5, citomegalovirus o virus de l'herpes tipus 5

HIV-1, virus de la immunodeficiència humana tipus 1

hMPV, metapneumovirus

HN, hemaglutinina-neuraminidasa

HPeV, parechovirus humans

HSCT, trasplantament de cèl·lules mare hematopoètiques

IC, immunocromatografia

ICTV, Comitè Internacional de Taxonomia del Virus

ID, identificació

IF, immunofluorescència

IFD, immunofluorescència directa

IFI, immunofluorescència indirecta

ITRI, infecció del tracte respiratori inferior

ITRS, infecció del tracte respiratori superior

L, polimerasa viral

LAMP, amplificació isotèrmica en bucle d'àcids nucleics

LLC-MK2, Línia contínua de ronyó de mico *rhesus*

M, proteïna de membrana viral

M1, proteïna vírica de matriu

M2, M42, BM2, NB i CM2, canals iònics vírics dels virus gripals

M2-1 i M2-2, factors de regulació de la transcripció vírics

MDCK, línia contínua de ronyó de gos

MEM, medi mínim essencial d'Eagle

MERS, síndrome respiratòria d'orient mig

mg, mil·ligrams

min, minuts

ml, mil·lilitres

MLPA, amplificació múltiple dependent d'una sonda lligada

mM, mili molar

MMT, medi manteniment amb tripsina

MPOC, malaltia pulmonar obstructiva crònica

MRC-5, Línia semicontínua diploide de pulmó embrionari humà

N, proteïna de la nucleocàpsida viral

NA, neuraminidasa

NAAT, tècnica de detecció d'àcids nucleics

NASBA, amplificació basada en seqüències d'àcids nucleics

ND, no detectable

NEG, negatiu

NEP, proteïna vírica d'exportació nuclear

NIID, *National Institute of Infectious Diseases for Japan*

NIMR, *National Institute for Medical Research for Europe*

nm, nanòmetre

NP, nucleoproteïna vírica

NS1, NS2 i NP-1, proteïnes víriques no estructurals

OMS (WHO), Organització Mundial de la Salut

P, fosfoproteïna vírica

PA, PB1 i PB2, complex de polimerases

pb, parets de bases

PBS, tampó fosfat sali

PCR, reacció en cadena de la polimerasa

PCR-m, PCR múltiple

PCR-tr, PCR a temps real

PIDIRAC, Pla d'informació de les infeccions respiratòries agudes a Catalunya

PIV, virus parainfluença

PMK, cèl·lules de ronyó de mico

pmols, pico mols

PRK, cèl·lules primàries de ronyó de conill

PS, penicil·lina-estreptomicina

RCA, amplificació per cercle rodant

RD, Línia contínua de rabdomiosarcoma embrionari humà

RE, solució revelatge

RNA, àcid ribonucleic

RNA_m, RNA missatger

rpm, revolucions per minut

RSV, virus respiratori sincicial

RT, retrotranscripció

RT-PCR, amplificació amb retrotranscripció

RV, rinovirus

S, proteïna viral espicular

SARS, síndrome respiratòria aguda greu

SDA, amplificació per desplaçament de cadena

SFB, sèrum boví fetal

SH, proteïna vírica hidròfoba

SH_b, solució d'hibridació

SV, shell-vial

SVGE, *Sistema de Vigilancia de la Gripe en España*

T, triangulacions (triangles en una cara icosaèdrica)

TP, proteïna terminal

TR, tampó de rentat

U, unitats

VP (VP1, VP2), proteïnes víriques

X, V i VII, proteïnes bàsiques que estableixen el DNA víric

INTRODUCCIÓ

Al món, les malalties infeccioses són les responsables de casi el 30% del total dels 56 milions de morts anuals. L'epidemiologia de les malalties infeccioses s'ocupa de les circumstàncies en què es produeixen tant la infecció com la malaltia en una població, i dels factors que influeixen en la seva freqüència, propagació i distribució ¹.

Les infeccions respiratòries són de les malalties més comuns que afecten als essers humans. En general, la gran majoria de les malalties respiratòries són causades per virus ¹ i tenen una ampla distribució mundial ². Aquestes infeccions poden donar lloc a diferents quadres clínics que van des del refredat comú, fins altres afectacions greus com la pneumònia, la bronquiolitis o la bronquitis.

Conèixer l'etiologia d'aquestes infeccions resulta essencial de cara a establir tractaments i vies d'actuació per als sanitaris i la població general.

ELS VIRUS I LES INFECCIONS RESPIRATÒRIES

Els virus són els paràsits intracel·lulars obligats més petits que es coneixen. Tots ells estan compostos d'un àcid nucleic i una capa de proteïnes, amb existència o no d'una lipoproteïna externa, així mateix no contenen enzims per desenvolupar el seu propi metabolisme, i per tant sempre necessiten d'una cèl·lula hoste per a multiplicar-se i seguir infectant. La partícula viral infectiva completa es denomina virió. La infecció es produeix quan degut a la unió entre el virus i un receptor específic, el virus s'adhereix a la cèl·lula i és capaç d'introduir-se al seu interior. Cada virus infecta un tipus cel·lular determinat depenent si està expressat el seu receptor o no. Un cop a l'interior cel·lular, els virus es repliquen, sent causa directa de dany cel·lular i malaltia. D'altra banda, poden ser les pròpies defenses de l'hoste les causants del dany cel·lular al intentar eliminar els virus.

Els virus constitueixen un model de complexitat biològica. Han desenvolupat diferents formes i estratègies per perdurar a la natura. El mètode taxonòmic de classificació es basa en les característiques morfològiques, les propietats estructurals, físiques, antigèniques i biològiques del virió ³.

Els virus també es poden agrupar segons les manifestacions clíniques que causen quan infecten a l'esser humà, com és el cas dels virus respiratoris. S'anomenen virus respiratoris aquells virus que després de la infecció, el quadre clínic es manifesta principalment al tracte respiratori. Els virus respiratoris afecten a tots els individus per igual, tant adults com a infants, però donen un quadre clínic diferent depenent del pacient i del seu estat immunitari. La infecció per aquests virus pot afectar tant al tracte respiratori superior com a l'inferior, pot ser subclínica o donar diferents quadres de malaltia, així com complicacions que requereixin ingrés hospitalari ⁴.

Una de les principals característiques clíniques de les infeccions respiratòries virals és la inespecificitat dels símptomes, ja que un mateix quadre clínic pot estar causat per diferents virus, i un virus concret pot causar diferents síndromes respiratòries ⁴. Així mateix, el grau d'afectació en la infecció respiratòria vírica inclou un rang molt variat de manifestacions clíniques, i només es disposa de tractament antivíric específic per alguns virus ⁵. Els virus causants d'infecció respiratòria formen part de diferents famílies i gèneres, amb morfologia, mida i genoma diferent segons cada virus. Aquesta gran varietat de virus possibles causants d'infecció respiratòria implica també una diversitat en les tècniques amb millor rendiment per diagnosticar cada possible agent etiològic. Els principals virus causants d'infecció respiratòria es mostren a la taula 1.

Taula 1

Classificació taxonòmica i nomenclatura dels principals virus respiratoris.

Família	Subfamília	Gènere	Espècie
<i>Orthomyxoviridae</i>		<i>Influenzavirus A</i>	virus gripal A (FLUAV)
		<i>Influenzavirus B</i>	virus gripal B (FLUBV)
		<i>Influenzavirus C</i>	virus gripal C (FLUCV)
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i>	virus parainfluença 1 i 3 (PIV-1, PIV-3)
		<i>Rubulavirus</i>	virus parainfluença 2 i 4 (PIV-2, PIV-4)
	<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	virus respiratori sincicial (RSV)
		<i>Metapneumovirus</i>	metapneumovirus (hMPV)
<i>Picornaviridae</i>		<i>Enterovirus</i>	enterovirus humà (EV) A, B, C i D
			rinovirus humà (RV) A, B i C
<i>Adenoviridae</i>		<i>Mastadenovirus</i>	adenovirus humà (AdV) A, B, C, D, E, F i G
<i>Parvoviridae</i>	<i>Parvovirinae</i>	<i>Bocaparvovirus</i>	bocaparvovirus de primat (HBoV) 1 i 2
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirinae</i>	<i>Alphacoronavirus</i>	coronavirus 229E (HCoV-229E) coronavirus NL63 (HCoV-NL63)
		<i>Betacoronavirus</i>	coronavirus HUK1 (HCoV-HUK1) síndrome respiratòria aguda greu (SARS-CoV) coronavirus OC43 (HCoV-OC43) ^a síndrome respiratòria d'orient mig (MERS-CoV)

^a La designació actual del HCoV-OC43 segons el comitè de taxonomia vírica, ICTV, és com a *betacoronavirus 1*.

MANIFESTACIONS CLÍNiques DE LES INFECCIONS DEL TRACTE RESPIRATORI

Les infeccions del tracte respiratori formen el conjunt de malalties infeccioses més freqüents de l'ésser humà ⁶. La majoria d'aquests processos són d'etiologia viral, es resolen amb tractament simptomàtic, i no és necessari l'ús d'antibiòtics. No obstant, en nounats, ancians i pacients amb alguna malaltia de base (cardiopaties, broncopaties cròniques, immunodeficiències, etc.), aquestes infeccions es poden complicar, donant lloc a quadres de gravetat variable, i de vegades la mort. Així mateix, el caràcter recurrent d'aquestes infeccions, fa que es repeteixin múltiples vegades al llarg de la vida, generant un cost sanitari elevat, sobretot degut al tractament de les complicacions i a l'ús inadequat d'antibiòtics,

així com importants repercussions socioeconòmiques degut a les incapacitats laborals temporals que ocasionen ⁶.

Infeccions del tracte respiratori superior

La majoria de les infeccions respiratòries del tracte superior (ITRS) són de caràcter lleu i els pacients no solen necessitar d'ingrés hospitalari. Poden ser tant subclíniques com donar simptomatologia de refredat comú. La majoria no requereixen de tractament específic, no obstant, els analgèsics/antipirètics (per exemple, paracetamol) i, en alguns casos, els descongestionants nasals es solen utilitzar per la reducció de les molèsties i dels símptomes ⁵.

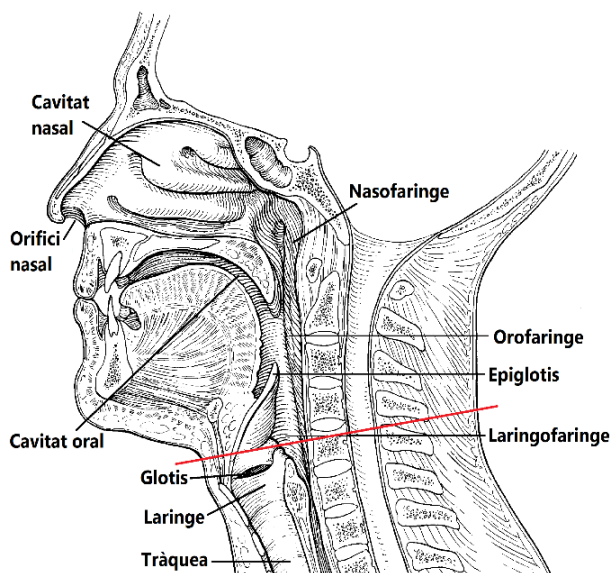


Figura 1

Estructures anatòmiques que formen part del tracte respiratori superior. S'ha dividit mitjançant una línia de color vermell: les estructures anatòmiques per sobre de la línia formen el tracte respiratori superior, mentre que les estructures anatòmiques que es troben per sota de la línia formarien part del tracte respiratori inferior

En aquest treball hem considerat com pertanyents al tracte respiratori superior aquelles estructures anatòmiques situades per sobre de la glòtis. A la figura 1 es mostren la divisió les estructures anatòmiques que hem considerat part del tracte respiratori superior.

Els principals quadres clínics lligats a la infecció del tracte respiratori superior s'expliquen a continuació.

Refredat comú. Es tracta d'una malaltia lleu, autolimitada i molt freqüent. És una de les principals causes d'absentisme laboral i escolar. L'etiologia és molt variada, però sobretot sol ser vírica. S'han identificat més de 200 agents causals diferents ^{7,8}. Com a quadre clínic, predominen la congestió nasal i la rinorrea, sense febre. Pot començar amb mal de gola, que seguidament s'acompanya per secrecions

nasals, esternuts i tos. No sol necessitar de diagnòstic etiològic tret de quan es fan estudis epidemiològics.

Faringitis aguda. Afecta a la zona de la nasofaringe i/o orofaringe. Tot i que es tracta d'una malaltia de caràcter lleu i autolimitada, el seu impacte a la salut pública és molt important, ja que representa un motiu comú de consulta mèdica i prescripció antibiòtica. Pot estar causada tant per bacteris com és el cas del *Streptococcus pyogenes* com per virus, respiratoris. Els virus causen aproximadament el 40% dels casos ⁹.

El quadre clínic causat pels diferents agents etiològics no presenta gairebé diferències. El símptoma més característic és el mal de gola, que sol anar acompanyat de malestar general, conjuntivitis, tos o rinorrea. El diagnòstic és clínic i per conèixer l'agent etiològic és necessari la col·laboració del laboratori especialment si es vol confirmar la presència del *Streptococcus pyogenes*.

Epiglotitis. Es tracta d'un procés infecciós greu que dona lloc a la inflamació de l'epiglotis i de les estructures que l'envolten. De caràcter agut, pot arribar a provocar asfíxia per obstrucció de les vies respiratòries. Els símptomes principals són febre, deglució dolorosa i afectació de l'estat general del malalt. L'etiologia sol ser bacteriana, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* i *Moraxella catarrhalis*, entre d'altres ¹⁰. El diagnòstic etiològic és important i necessari i el tractament antibiòtic imprescindible.

Otitis mitjana aguda. Es tracta de la inflamació de l'oïda mitjana, i es caracteritza per la presència de líquid a l'oïda, juntament amb l'aparició de símptomes locals o generals d'inici ràpid, on el símptoma principal es una otàlgia aguda. És una malaltia molt freqüent en nens petits i de difícil diagnòstic ¹¹. Fins fa poc l'etiologia es considerava principalment bacteriana (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*), tot i que es creia que era freqüent la coinfecció amb virus respiratoris. Estudis recents han reportat que els virus respiratoris poden ser els únics causants en un 58-90% dels casos simptomàtics i en un 28-52% de casos asimptomàtics ¹².

Es tracta d'una malaltia que sol aparèixer principalment lligada a un episodi de refredat comú o faringitis aguda. És un dels principals motius de consulta mèdica en l'atenció primària, ja que segueix necessitant de prescripció antibiòtica.

Sinusitis. És la inflamació dels sins paranasals, que sol anar acompanyada de congestió nasal, dolor o pressió facial i rinorrea purulenta. És freqüent el mal de cap, la tos i la pèrdua parcial de l'olfacte. Es produeix a causa d'una obstrucció del flux de les secrecions dels sins, generalment de manera secundària a la inflamació de la mucosa nasal. Si l'obstrucció es manté, es pot produir una sobreinfecció bacteriana ¹³.

En la seva etiologia intervenen totes les possibles causes d'inflamació de la mucosa, destacant sobretot els processos infecciosos vírics i els al·lèrgics. La sobreinfecció bacteriana es pot donar per *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* i *Moraxella catarrhalis*. El diagnòstic és clínic, en casos amb complicacions és necessari un diagnòstic radiològic i el tractament és antibiòtic.

Infeccions del tracte respiratori inferior

En aquest treball hem considerat com pertanyents al tracte respiratori inferior aquelles estructures anatòmiques situades per sota de la glotis. El tractament i l'atenció de la infecció del tracte respiratori inferior (ITRI) depenen de l'avaluació de la gravetat del pacient i s'adequa a cada cas en particular. Altres factors de risc i/o malaltia preexistent (com per exemple, malaltia pulmonar crònica o antecedents familiars) també influeixen en el maneig de la malaltia ⁵. Aquestes infeccions prenen especial importància en certs grups d'edats com és el cas dels nounats o persones de la tercera edat, així com pels grups de pacients amb la immunitat compromesa. Els principals quadres clínics lligats a la infecció del tracte respiratori inferior s'expliquen a continuació.

Laringitis aguda. Es tracta de la inflamació de la mucosa de la laringe i de les cordes vocals. Els signes que causa són disfonia i tos irritativa i seca, sense febre. És una malaltia de curs lleu i autolimitada, de duració aproximada de 3 dies. Els agents etiològics més comuns són els virus respiratoris, tot i que en alguns casos pot estar causada per bacteries com *Moraxella catarrhalis* i *Haemophilus influenzae*, o per causes químiques, com el tabac o substàncies químiques que inflamen la mucosa de la laringe ¹⁴. El diagnòstic és clínic i el tractament simptomàtic.

Laringotraqueobronquitis aguda o crup. Es tracta d'una inflamació de l'espai subglòtic causada per una obstrucció aguda de la laringe o de la tràquea. Afecta normalment als nens i produeix un quadre característic d'estridor inspiratòria, tos i ronquera que habitualment comença durant la nit i de forma brusca. Sol seguir a un refredat i l'etiologia és habitualment vírica ¹⁴. El diagnòstic es basa en el quadre

clínic i s'ha de diferenciar d'altres processos d'obstrucció del tracte respiratori superior com l'epiglotitis causada per bacteris.

Bronquitis aguda. Es caracteritza per la inflamació de la mucosa bronquial, i s'ha de diferenciar de la bronquitis crònica i la pneumònia. Es considera que una bronquitis és aguda quan té menys de 90 dies de durada ¹⁵. En nens i adults prèviament sans, l'etiologia vírica és la més freqüent. Si es produeixen complicacions, poden estar associades a la sobreinfecció bacteriana, sobretot en pacients amb alguna patologia de base. Els signes principals són la tos ronca i l'expectoració. Depenent del grau de la lesió epitelial, la duració de la malaltia es pot allargar diverses setmanes, entre 6 i 8 ¹⁶.

Bronquitis crònica. Es defineix com la malaltia que causa tos i expectoració la majoria de dies durant més de 3 mesos l'any i durant més de dos anys consecutius ¹⁶. Les causes més comuns són químiques, com el tabac, i es troba inclosa dins de l'afectació coneguda com malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC). Aquesta malaltia crònica cursa amb episodis d'agudització. En aquests casos, tot i que són més freqüents les causes no infeccioses o les causes bacterianes, aproximadament el 30% estan causades per virus respiratoris ¹⁷.

Bronquiolitis. Es tracta d'una malaltia infecciosa aguda que afecta les vies respiratòries inferiors, causant l'obstrucció dels bronquíols. Ocorre preferentment en nens menors de 2 anys, on la incidència és màxima entre els 3 i els 6 mesos d'edat. És la causa més comú d'hospitalització de nadons en els països desenvolupats ⁷. La malaltia es pot presentar amb tos, vòmits, dificultat respiratòria, sibilàncies, retracció de músculs intercostals i dificultat per a la respiració i l'alimentació. L'agent etiològic més freqüent és el RSV, el qual es troba en més del 80% dels nens menors de 2 anys amb bronquiolitis. Els altres virus respiratoris són menys freqüents i s'han descrit casos causats per bacteris com *Mycoplasma pneumoniae* i *Chlamydia pneumoniae* ¹⁸.

Pneumònia. Es tracta d'una inflamació pulmonar aguda, sense participació bronquial, caracteritzada per l'ocupació dels alvèols per un exsudat que es consolida i dona al pulmó una consistència semblant a la del fetge (hepatització). L'etiologia és variable segons l'edat del pacient, el lloc d'adquisició de la malaltia (comunitat, hospital), i la presència d'una malaltia de base com la diabetis o la bronquitis crònica, entre d'altres. En nens són més freqüents les infeccions per virus respiratoris i per *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* i *Haemophilus influenzae*. En adults, la majoria de casos són

originats per *Streptococcus pneumoniae* i per *Mycoplasma pneumoniae*. En el cas dels pacients immunodeprimits, a més dels agents ja anomenats, el citomegalovirus en pot ser també una causa ¹⁹.

Els símptomes són variats depenent de l'etiologia de la pneumònia. La pneumònia causada per virus respiratoris es considera pneumònia atípica i es caracteritza per tos seca o escassament productiva, absència de dolor pleurític, predomini de les manifestacions extrapulmonars (mal de cap, miàlgies, etc.), condensació radiològica que habitualment és de tipus no lobular i s'observa una dissociació clínic-radiològica.

La grip

La grip és una malaltia infecciosa aguda de les vies respiratòries, que pot afectar tant al tracte superior com al tracte inferior. La grip és un important problema de salut, tant per els costos econòmics i socials que origina com per les complicacions que pot ocasionar, i la mortalitat que pot provocar directament o indirectament. La proporció de població afectada durant les epidèmies anuals a nivell mundial oscil·la entre el 5 i 10% en adults, i del 20% a 30% en nens. Aquesta malaltia pot ser causa d'hospitalització i mort sobretot en els grups d'alt risc (nens molt petits, ancians i malalts crònics). Aquestes epidèmies anuals causen a tot el món uns 3 a 5 milions de casos de malaltia greu i unes 250.000 a 500.000 morts ²⁰.

El quadre clínic es caracteritza per un inici brusc, amb un període d'incubació breu, entre 24 i 72 hores. Pot ser causat per diferents virus respiratoris. El quadre gripal comença amb una sensació distèrmica elevada i calfreds. Les principals manifestacions són febre generalment alta (entre 38 i 39,5°C), fins i tot es poden produir pics febrils de 40-41°C, mal de cap, malestar general i símptomes respiratoris. Sol causar també anorèxia i fortes miàlgies que afecten sobretot a les extremitats. Si existeix tos, sol ser no productiva, pot haver-hi congestió nasal i en alguns casos afonia. La malaltia dura entre 1 i 8 dies, tot i que l'astènia i la tos poden persistir de una a dues setmanes després d'haver patit la malaltia ²¹.

VIRUS RESPIRATORIS

A continuació es detallen els principals virus causant d'infecció respiratòria. S'ha seguit un enfocament taxonòmic basat en l'esquema del 2014 del Comitè Internacional de Taxonomia del Virus (ICTV) ²².

L'ICTV utilitza la categoria "família", "gènere" i "espècie". Segons l'ICTV, "una espècie de virus es defineix com una classe politètica de virus que constitueix un llinatge replicable i ocupen un nínxol ecològic particular". Dins d'una espècie pot haver un o més membres que, depenent de com es defineixen, es coneixen com a variants, soques, tipus, serotips, etc.

Utilitzarem el nom informal dels virus al títol, seguit d'una descripció de les seves característiques i dels quadres clínics que causen. Els virus recentment descoberts s'inclouen agrupats en un apartat comú, ja que la seva relació amb la malaltia respiratòria encara s'està investigant.

VIRUS GRIPAL A

Generalitats

Els virus gripals A (FLUAV) pertanyen a la família *Orthomyxoviridae*, gènere *Influenzavirus A* (veure taula 1). El reservori natural dels FLUAV són les aus aquàtiques salvatges, tot i que també poden infectar una gran varietat d'hostes, com són altres aus domèstiques, porcs, cavalls, mamífers marins (foques), visons i humans. En humans són causants d'infecció respiratòria aguda, i de la malaltia coneguda com a grip. Les infeccions causades per aquests virus provoquen un gran absentisme laboral i escolar, i representen un problema de salut pública degut al gran nombre de consultes mèdiques, recursos i hospitalitzacions en tots els grups d'edat ²³. Aquests virus poden ser causants d'infeccions en forma de brots epidèmics resultants de la circulació de les soques estacionals, o poden causar pandèmies, resultants de l'aparició d'un nou virus per al qual la població posseeix poca o cap immunitat ²¹.

Antecedents històrics

Gairebé al llarg de tota la història s'han descrit malalties similars a la grip, no obstant el primer registre complet data del segle XVI. Les diferents pandèmies causades pel FLUAV registrades, daten des del 1918. Per tal d'entendre completament les pandèmies, és necessari disposar del virus que l'ha causat,

un fet que no va ocórrer fins l'any 1957. El virus pandèmic de l'any 1918 es va reconstruir utilitzant una aproximació "arqueo-virològica". Els subtipus o la composició genètica dels virus pandèmics circulants abans d'aquest any encara es desconeixen ²⁴. Tots els virus pandèmics des de l'any 1918 contenen segments de gens derivats del virus d'aquest any, i per tant es pot considerar que els últims 90 anys formen part d'una gran "era pandèmica" ²⁴.

El primer virus gripal es va aïllar dels pollastres a partir de la pesta aviària al 1901. L'any 1918 una gran pandèmia de grip coneguda com "grip espanyola", causada per un FLUAV amb composició antigènica H1N1, va arribar a causar més de 50 milions de morts a nivell mundial. L'any 1931 es va aïllar un virus gripal porcí, i finalment, l'any 1933, es va aïllar el primer virus gripal humà. Poc després es van iniciar les investigacions per desenvolupar una vacuna contra la grip. La següent pandèmia de grip registrada va sorgir l'any 1957, causada per un descendent lineal del virus pandèmic del 1918, la nova soca de FLUAV presentava una composició antigènica H2N2 i va causar més d'un milió de morts a nivell mundial. Aquest any es va poder recuperar per primera vegada un virus pandèmic. La següent pandèmia es va registrar l'any 1968 causada per una soca amb composició antigènica H3N2. L'any 1977, es va registrar una pandèmia causada novament per una soca H1N1, i aquesta vegada a diferència de les anteriors la soca que circulava fins aquell moment no va desaparèixer i per tant des de 1977 hi ha co-circulació de dues soques de FLUAV.

Finalment, l'última pandèmia de grip registrada va ser la pandèmia de l'any 2009 causada per la circulació d'una soca amb composició antigènica H1N1 completament diferent a la que circulava fins llavors. Les diferents pandèmies de grip registrades i els diferents virus causants es mostren a la figura 2 ²⁴.

Estructura vírica

Es tracta de virus embolcallats i pleomòrfics, on els virions són generalment esfèrics, tot i que també poden ser filamentosos, amb un diàmetre aproximat de 80-120 nm. L'embolcall del virus prové de la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste. El genoma és RNA de cadena senzilla amb polaritat negativa i fragmentat en 8 segments. Els 8 segments del genoma codifiquen 12-14 proteïnes depenent de la soca ^{25, 26}. La mida dels segments varia entre 890 fins a 2.341 nucleòtids. La mida total del genoma és d'aproximadament 13,5 kilobases.

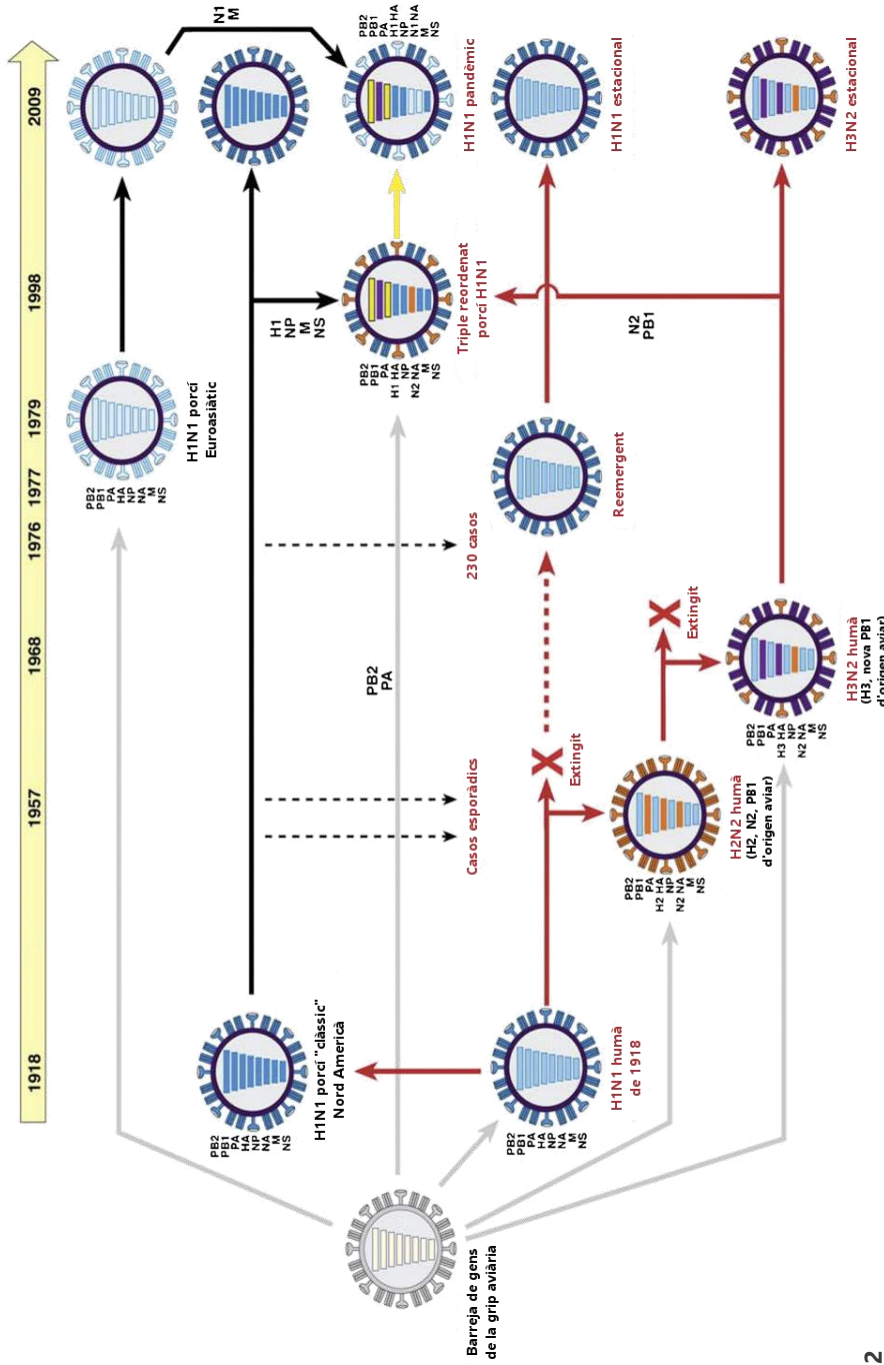


Figura 2

Relacions genètiques rellevants dels virus gripals A (1918-2009). Adaptada de Taubenberger ²⁴.

Les fletxes grises mostren la derivació de l'herència genètica d'un o més segments dels gens del virus gripal A aviar (es desconeix el moment i el mecanisme d'emergència en cada cas). La fletxa vermella discontinua indica un període sense circulació de H1N1 en humans. Les fletxes vermelles contínues indiquen els camins evolutius dels diferents llinatges de virus gripals humans; les fletxes negres sòlides, provinents del virus gripal porcí tipus A, i la fletxa groga provinent d'un altre llinatge porcí, donen origen al virus gripal H1N1 pandèmic. Els descendents amb fletxes negres discontinues, representen infeccions zoonòtiques humanes amb virus de la grip A porcí.

De l'embolcall lipídic li sobresurten dos tipus diferents de glicoproteïnes, l'hemaglutinina (HA) i la neuraminidasa (NA). L'HA és un trímer responsable del reconeixement i unió als receptors cel·lulars i intervé en la fusió i penetració del virus a dins la cèl·lula. Constitueix el 40% de les proteïnes del virus. Cada virió conte entre 350 i 400 unitats d'aquesta proteïna, és per això que es tracta d'un dels principals antigens del virus. Els anticossos produïts front aquesta proteïna tenen funció neutralitzant.

La NA és un tetràmer que participa en el transport del virus a través de la mucina present en el tracte respiratori, ja que hidrolitza els polisacàrids dels inhibidors presents a la mucosa ^{27, 28}, permetent l'arribada del virus a la superfície de les cèl·lules epitelials del tracte respiratori. També és l'encarregada de l'alliberació dels virions, ja que destrueix el receptor mitjançant una activitat sialidasa per afavorir la disseminació de les partícules virals. Constitueix el 5% de les proteïnes totals del virus, i la proporció és d'una NA per cada 7 o 8 HA a la superfície del virió. Els anticossos produïts front aquesta proteïna són parcialment neutralitzants (veure figura 3).

Els FLUAV són un conjunt de virus que es classifiquen en base a les propietats antigèniques de les HA i NA. Actualment, s'han trobat 17 HA i 10 subtipus de NA a la natura ²⁹. Tots els subtipus d'HA dels FLUAV es troben a les aus, tres subtipus en els éssers humans (H1, H2, H3), dos en els porcs (H1, H3), i dos en els cavalls (H3, H7) ³⁰. La nomenclatura tradicional dels virus gripals A inclou, l'animal del que s'ha aïllat el virus, excepte quan és del home; el lloc geogràfic; l'ordre d'aïllament; l'any i la HA i NA que conté. Exemple: A/swine/California/04/2009 H1N1.

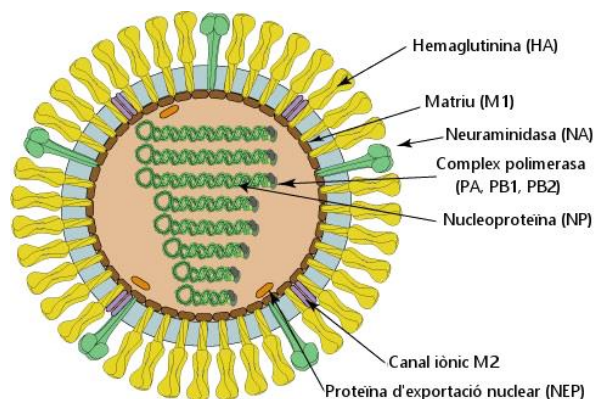


Figura 3

Estructura dels virions del virus gripal A. Adaptat de *Viralzone*. (<http://viralzone.expasy.org/>)

El genoma del FLUAV codifica també diferents proteïnes internes, com la proteïna de membrana M1 que rodeja la nucleocàpsida i està lligada a l'embolcall i la proteïna de membrana M2, que actua com un canal iònic. Estudis recents han trobat una nova proteïna viral la M42 amb un ectodomini antigènic diferent a la M2 que també actuaria com a canal iònic en algunes soques del FLUAV ²⁶.

També codifica la nucleoproteïna (NP) que rodeja al genoma, i el complex de polimerases PA, PB1 i PB2, les quals estan implicades en la transcripció del RNA missatger i en la replicació del RNA viral. En algunes soques s'ha trobat també una altra proteïna anomenada PB1-F2, implicada en la inducció de mort cel·lular ²⁵ (veure figura 3).

Finalment, codifica dues proteïnes no estructurals, la proteïna NS1 i la proteïna nuclear d'exportació (NEP), també anomenada NS2. Ambdues proteïnes estan codificades al mateix gen, però el producte principal, la proteïna no estructural NS1, es tradueix a partir d'un RNAm complet, mentre que la NS2 és traduïda d'un RNAm *spliced* (tall-unió). La NS1 té varies funcions, una d'elles és unir-se al dsRNA víric per evitar que sigui reconegut pel sistema immune de l'hoste ³¹. La NS2 facilita la sortida de les ribonucleoproteïnes víriques des del nucli de les cèl·lules infectades al citoplasma ³² (veure figura 3).

La infecció s'inicia pel reconeixement per part del virus dels receptors de l'àcid siàlic presents en la superfície cel·lular de l'epiteli traqueobronquial, per mitjà de l'HA. Prèviament la NA afavoreix la infectivitat del virus permetent el seu transport a través de la mucina del tracte respiratori, ja que trenca aquesta mucina i permet la penetració del virus ²⁷. Els virus entren dins la cèl·lula per endocitosi, i un cop a l'interior la M2 és l'encarregada de la decapsidació del virus iniciant així el cicle de replicació i posterior propagació. La replicació vírica es dona a l'interior del nucli cel·lular i la síntesis de les proteïnes al citoplasma. Finalment els virions s'alliberen per acció de la NA ³³.

Epidemiologia

En les aus aquàtiques salvatges es troben tots els FLUAV. Els FLUAV que infecten l'home són de distribució universal i circulen amb una estacionalitat marcada. En general els FLUAV causen epidèmies anuals que generalment duren de tres a vuit setmanes. Les epidèmies es produeixen gairebé tots els anys, en països amb climes temperats, els casos es donen sobretot durant l'època d'hivern. En països amb clima tropical, els casos d'infeccions es donen principalment durant l'època de pluges i les estacions més humides (de maig a setembre) ²¹. D'altra banda, són virus capaços de causar pandèmies que poden donar lloc a infeccions fora dels mesos epidèmics.

Els virus gripals canvien constantment, donant lloc a la formació de noves soques capaces de causar la infecció en l'esser humà. Una de les formes de canvi és la "deriva antigènica" (canvis antigènics menors) causada per mutacions en les regions del genoma que codifica les HA i/o NA, i que comporta variacions

antigèniques. Aquests canvis fan que les noves soques presentin petites diferències antigèniques respecte a les anteriors, i per tant no són reconegudes completament pel sistema immune donant lloc a les epidèmies anuals i fins i tot, fent possible la infecció repetida en una mateixa temporada epidèmica. Aquesta és la raó per la qual la composició de la vacuna de la grip es revisa cada any per adaptar-la al virus que circula.

L'altre forma de canvi coneguda és el "salt antigènic" (canvis antigènics majors), derivat de la recombinació de gens entre dos virus gripals diferents. La co-infecció d'una cèl·lula hoste amb dos FLUAV diferents pot originar una progènie viral on el genoma contingui segments dels dos virus "parentals", donant lloc a nous subtipus del virus amb diferent HA i/o NA. Aquesta situació també es pot donar entre un FLUAV animal i un d'humà. Aquests canvis conformen noves soques que no són reconegudes pel sistema immune i són l'origen de les pandèmies ³⁴. A la taula 2 es mostra les dues formes en les que es produeix la circulació dels virus gripals.

Taula 2

Característiques diferencials entre una pandèmia i una epidèmia per virus gripal A.

TIPUS	CAUSES	ESTAT IMMUNITARI DE LA POBLACIÓ	RESULTATS
Pandèmia de FLUAV	"Salt antigènic" resultat de l'aparició d'un nou subtipus o d'un reciclat dels FLUAV	Immunitat parcial en ancians si s'ha produït d'una soca "reciclada", i poca o cap immunitat si prové d'una soca nova	En general, altes taxes d'atac, amb altes taxes de morbiditat i mortalitat a tot el món, especialment durant la primera fins la tercera onada de la infecció
Epidèmia de FLUAV	"Deriva antigènica" de les soques existents de FLUAV	Reacció creuada amb els anticossos de gran part de la població induïda per variants antigèniques recents; poca o cap immunitat en nadons	Taxes d'atac variable, es donen infeccions esporàdiques, brots o epidèmies amb morbiditat i mortalitat variable. Els nens petits són especialment vulnerables

Adaptada de Nicholson ²¹.

Mecanismes i rutes de transmissió

En els essers humans i mamífers en general, la transmissió principal és per via aèria mitjançant aerosols i per contacte amb superfícies contaminades i autoinoculació. En humans, la infecció afecta al tracte respiratori, normalment superior. La proteïna HA dels virus gripals reconeix els receptors de l'àcid siàlic

present a les cèl·lules de la mucosa del tracte respiratori, amb una unió específica amb la configuració alfa-2,6-àcid siàlic permetent que s'iniciï el cicle infectiu. Aquests receptors amb enllaços alfa-2,6-àcid siàlic predominen a les cèl·lules epitelials de la tràquea dels humans ³⁵.

Entre les aus la transmissió és per via fecal-oral i a través de l'aigua contaminada. En casos excepcionals alguns virus gripals aviaris poden transmetre's a l'home a partir d'un contacte molt estret amb els animals. En els casos en que s'ha produït contagi entre les aus i els humans, es creu que ha estat per la unió dels virus a un receptor diferent, amb enllaços alfa-2,3-àcid siàlic, propi de l'epiteli intestinal dels ànecs, i que també està present a les cèl·lules epitelials dels alvèols humans, fent possible el contagi entre espècies ³⁵.

Clínica i simptomatologia

Els FLUAV són causants d'infecció respiratòria, amb una gran diversitat de manifestacions clíniques essent la grip el quadre clínic més reconegut. La malaltia és autolimitada i els pacients immunocompetents tarden generalment de 7 a 10 dies a curar-se totalment, tot i que la tos pot persistir durant més de dues setmanes. En pacients immunodeprimits i especialment en nens poden presentar-se complicacions greus.

Les complicacions més freqüents són sinusitis, otitis mitjana, nàusees i vòmits, especialment en nens. També es poden donar complicacions de caràcter més greu com bronquitis aguda, pneumònia o exacerbacions de malalties pulmonars cròniques ³⁶. S'han realitzat estudis comparatius entre les manifestacions clíniques causades pels virus gripals, i tot i que no s'han observat diferències remarcables, si s'ha vist que en les infeccions causades per FLUAV, els pacients són més propensos a tenir rinorrea ^{37, 38}.

Altres virus gripals A

Virus gripals aviaris: No tots els virus gripals aviaris causen malalties en els éssers humans. No obstant això, alguns poden infectar els humans i causar malaltia greu. Els dos virus gripals aviaris més coneguts són els FLUAV H5N1 i els FLUAV H7N9 que circulen en les aus de corral ³⁹.

Els primers casos d'infecció per FLUAV H5N1 en humans es van detectar a mitjans de 1997 a Hong-Kong. Fins llavors, es considerava un subtipus patògen exclusiu d'aus. Aquests casos es van produir en

nens i adults joves amb un contacte estret i continuat amb poblacions d'aus de corral infectades. Es va dur a terme un sacrifici massiu d'aus per evitar la seva propagació. No obstant, el virus va tornar a reaparèixer en anys posteriors de manera aïllada en diferents tipus d'aus, fins que a l'agost de 2003, va ressorgir a l'Àsia i es va mantenir l'epidèmia de grip aviària fins febrer del 2006⁴⁰. Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS) la mortalitat humana causada pel FLUAV H5N1 pot arribar fins al 60% dels casos infectats⁴¹.

El FLUAV H7N9 es va detectar per primera vegada l'any 2013 tant en humans com en aus de corral. L'OMS va informar d'infeccions humanes causades per un nou virus gripal aviari A (H7N9) a la Xina. La majoria dels humans infectats per aquest virus han patit una malaltia respiratòria greu i en alguns casos ha causat la mort. Les investigacions sobre aquests virus han demostrat que la infecció s'ha donat després de tenir contacte amb aus de corral infectades o ambients contaminats. Actualment no s'ha trobat evidència de sostinguda expansió del virus H7N9 de persona a persona⁴².

Virus gripal A H1N1 pdm09. A l'abril de 2009, l'OMS va informar d'un nou virus de la grip A, causant de grip en humans a Mèxic i que es va estendre a 30 països en només tres setmanes. Aquesta ràpida expansió del nou virus va portar a la situació d'alerta pandèmica, i l'OMS va decretar el període pandèmic des d'abril del 2009 fins maig del 2010. L'anàlisi filogenètica de la nova soca pandèmica, va revelar un quàdruple origen, ja que contenia gens derivats del virus humà, del virus aviar, del virus porcí clàssic i del virus porcí euroasiàtic (veure figura 2)²³.

En la majoria dels casos la infecció cursava com una infecció respiratòria autolimitada, no obstant també es podien donar complicacions greus. La malaltia es manifestava preferentment en adults joves i nens. Els casos més greus es van registrar en persones amb alguna malaltia de base prèvia a la infecció pel virus⁴³.

La nomenclatura d'aquest virus és diferent a la resta de virus gripals degut a la controvèrsia causada quan es va detectar ja que en aquell moment ja estava circulant un FLUAV H1N1 diferent. L'OMS va estandarditzar la nomenclatura d'aquest virus i el va anomenar FLUAV H1N1 pdm09. Actualment, el FLUAV H1N1 pdm09 s'ha convertit en un virus estacional d'humans.

Diagnòstic

El diagnòstic de la infecció per virus gripals es fa mitjançant la detecció del virus. Inicialment es realitzava l'aïllament del virus en ous de gallina embrionats. No obstant, és un sistema car i laboriós de mantenir que ha estat substituït pel cultiu cel·lular. Amb aquest sistema, l'aïllament dels virus gripals es produeix principalment en les línies cel·lulars MDCK i PMK en tubs convencionals o en shell-vial. També s'han utilitzat co-cultius de diferents línies cel·lulars ⁴⁴.

Els mètodes de detecció d'antigen, tals com la immunofluorescència o la immunocromatografia, s'utilitzen àmpliament per la detecció ràpida del virus gripals.

Actualment existeixen diferents tipus de PCR amb capacitat per detectar múltiples virus respiratoris i de tipificar diferents soques de virus gripals ⁴⁵.

Profilaxis i tractament

La vacunació és la mesura principal per la prevenció de les complicacions degudes a la infecció pels virus gripals i per mitigar l'impacte de les epidèmies i pandèmies. La vacuna antigripal es formula cada any a partir de les principals soques circulants. Aquesta vacuna és trivalent, i conté els dos subtipus principals circulants de FLUAV i el llinatge principal circulant del FLUBV ³⁷. La vacuna es recomana sobretot per persones de la tercera edat, dones embarassades, persones amb qualsevol malaltia causant d'immunosupressió, i a les persones o grups que poden transmetre la grip i per tant suposen un risc, com són els professionals de la salut, treballadors en institucions i persones que realitzen serveis essencials per la comunitat.

Pel que fa al tractament, existeixen diferents antivirals contra les infeccions per FLUAV. Un dels grups d'antivirals més utilitzats són els aminoadamantans, inhibidors de la proteïna M2, en especial l'amantadina i rimantadina. No obstant, l'elevat nombre de casos de FLUAV que han desenvolupat resistència, en especial el virus FLUAV H1N1 pdm09 i el virus estacional FLUAV H3N2, han fet que es reduís el seu ús com a tractament i profilaxis. Actualment el grup d'antivirals més utilitzats són els inhibidors de la neuraminidasa, com per exemple el zanamivir (Relenza®) inhalable, l'oseltamivir (Tamiflu®) oral i el peramivir (Rapivab®) administrable per via intravenosa. Aquests són els antivirals

front els virus gripals d'ús recomanat ³⁶. En fase experimental s'està utilitzant el favipiravir, que inhibeix la RNA polimerasa RNA-depenent.

VIRUS GRIPAL B

Generalitats

Els virus gripals B (FLUBV) pertanyen a la família *Orthomyxoviridae*, gènere *Influenzavirus B* (veure taula 1). Són una causa important d'infecció respiratòria aguda i es caracteritzen per causar epidèmies arreu del món.

Les infeccions per FLUBV es limiten gairebé exclusivament als éssers humans, tot i que s'han reportat algunes infeccions esporàdiques en animals salvatges, especialment en foques ³⁶. No es coneix que es produeixi recombinació de material genètic entre les diferents soques.

Antecedents històrics

Els FLUBV es van aïllar per primera vegada al 1940 de mostres pediàtriques. Les soques que es van identificar es van anomenar llinatge Victoria (*B/Victoria/2/87*). No obstant a partir de la dècada de 1980, van aparèixer unes noves soques de FLUBV, antigènicaament diferents de les conegudes fins aleshores. Aquest segon llinatge, es va anomenar Yamagata (*B/Yamagata/16/88*), i durant la dècada dels 90 van reemplaçar als virus del llinatge Victòria a la majoria de regions del món, excepte a l'Àsia oriental, on el llinatge Victòria va continuar circulant.

Finalment, a partir de l'any 2002 els virus del llinatge Victòria van ressorgir a Amèrica del Nord i Europa, i des d'aleshores els dos llinatges co-circulen a tot el món ^{37, 46}.

Estructura vírica

Són virus pleomòrfics, els virions són generalment esfèrics, però també poden ser filamentosos. Es tracta de virus embolcallats d'un diàmetre aproximat de 80-120 nm. L'embolcall lipídic prové de la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste. El genoma és RNA monocatenari de polaritat negativa i fragmentat en 8 segments. La mida total del genoma és d'aproximadament 13,5 kilobases. El genoma

codifica 11 proteïnes. Les més importants antigènica parlant són les glicoproteïnes hemaglutinina (HA) i neuraminidasa (NA) (veure figura 4).

L'HA és responsable del reconeixement i unió als receptors cel·lulars i intervé en la fusió i penetració del virus a dins la cèl·lula, mentre que la NA participa en el transport del virus a través de la mucina del tracte respiratori i té acció sobre l'alliberació del virus ^{27, 28}.

El genoma també codifica diferents proteïnes internes, com la proteïna de membrana M1 que rodeja la nucleocàpsida, les proteïnes de membrana BM2 i NB que formen canals proteics, la nucleoproteïna NP, el complex de polimerases PA, PB1 i PB2, que estan implicades en la transcripció i replicació del RNA viral (veure figura 4).

Finalment, codifica dues proteïnes no estructurals, la proteïna NS1 i la proteïna nuclear d'exportació (NEP), també anomenada NS2. Ambdues proteïnes estan codificades al mateix gen, però el producte principal, la proteïna no estructural NS1, es tradueix a partir d'un RNAm complet, mentre que la NS2 és traduïda d'un RNAm *spliced* (tall-unió). La NS1 té varies funcions, una d'elles és unir-se al dsRNA víric per evitar que sigui reconegut pel sistema immune de l'hoste ³¹. La NS2 facilita la sortida de les ribonucleoproteïnes víriques des del nucli de les cèl·lules infectades al citoplasma ³² (veure figura 4).

La infecció s'inicia pel reconeixement per part del virus dels receptors de l'àcid siàlic de les cèl·lules de l'epiteli traqueobronquial, el mateix que els virus gripals A, en la superfície cel·lular i la unió de l'HA. Els virus entren dins la cèl·lula per endocitosis, i un cop alliberats inicien el cicle de replicació i posterior propagació. Finalment, la NA destrueix les unions siàliques dels receptors i allibera el virions per afavorir la seva disseminació i expansió a altres cèl·lules.

Les mutacions en el gen que codifica l'HA

són les responsables dels dos llinatges principals diferents, representats per les soques Victoria i

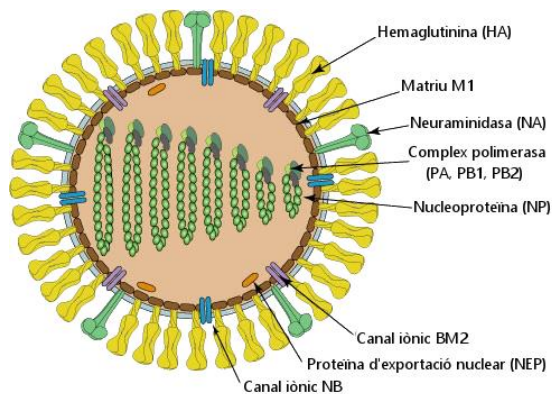


Figura 4

Estructura dels virions del virus gripal B. Adaptat de *Viralzone*. (<http://viralzone.expasy.org/>)

Yamagata ⁴⁷. Els dos llinatges actuals contenen la NA del llinatge Yamagata, suggerint que la taxa de mutació de la NA és menor ³⁸.

Epidemiologia

Els FLUBV tenen una distribució universal i causen epidèmies generalment als mesos d'hivern ³⁷. La freqüència de casos de FLUBV és variable segons els anys. Els estudis epidemiològics recents han demostrat que el FLUBV contribueix a una major càrrega mundial d'infeccions del que es creia inicialment. En les temporades epidèmiques, co-circulen dels dos llinatges arreu del món ³⁸.

Poden infectar a tots els grups d'edat, no obstant s'ha trobat que la morbiditat és més gran en nens, sobretot en edat escolar i en persones de la tercera edat ⁴⁸.

Mecanismes i rutes de transmissió

La principal via de propagació del virus és la via aèria, especialment per aerosols, tot i que també es pot transmetre per contacte amb superfícies contaminades i autoinoculació ⁴⁸.

Clínica i simptomatologia

Els FLUBV són causants d'infecció respiratòria. S'han realitzat estudis comparatius entre les manifestacions clíniques causades pels virus gripals, i tot i que no s'han observat diferències remarcables, si s'ha vist que en les infeccions causades per FLUBV, els pacients són més propensos a tenir miàlgia, mal de coll o ronquera i que per contra solen tenir menys rinorrea que els infectats per FLUAV ^{37,38}.

Les complicacions de la infecció per FLUBV poden ser lesions del miocardi, les quals s'observen en gairebé el 70% dels casos mortals i altres com són la encefalitis, símptomes gastrointestinals, o la miositis ³⁸.

Diagnòstic

El diagnòstic dels virus gripals es pot fer mitjançant l'aïllament viral en cultius cel·lulars. La línia cel·lular MDCK és la més idònia per al seu aïllament i la seva multiplicació. Els mètodes de detecció d'antigen, tals com la immunofluorescència o la immunocromatografia, s'utilitzen àmpliament per la detecció

ràpida del virus gripals ⁴⁴. Actualment existeixen diferents tipus de PCR amb capacitat per detectar panells de virus respiratoris i de tipificar diferents soques de virus gripals ⁴⁵.

Profilaxis i tractament

La vacunació és el mitjà principal per a la prevenció de les complicacions degudes a la infecció pels virus gripals i per reduir l'impacte de les epidèmies. El FLUBV està inclòs dintre de la vacuna trivalent que es formula cada any. La tria de la soca que formarà part de la vacuna es correspon normalment al FLUBV que circula principalment. No obstant, actualment està disponible des de la tardor de 2013 als Estats Units, una vacuna tetravalent, és a dir amb dues soques del FLUBV, una de cada llinatge, que podria ajudar a reduir la malaltia per FLUBV. Aquesta vacuna encara no està disponible a Europa ⁴⁹.

Pel que fa al tractament, els FLUBV són resistent a l'amantadina i la rimantadina, degut a que la proteïna BM2 ofereix una resistència estructural a aquests antivírics, impedit-ne la unió al canal iònic ³⁸. Per contra els inhibidors de la NA: zanamivir, l'oseltamivir (Tamiflu®) i peramivir si són antivirals recomanats per al tractament o la quimioprofilaxis de la infecció per FLUBV. En el cas del favipiravir, s'ha estudiat com a possible antiviral també contra els FLUBV, ja que inhibeix la RNA polimerasa RNA-dependent ⁵⁰.

VIRUS GRIPAL C

Generalitats

Els virus gripals C pertanyen a la família *Orthomyxoviridae*, gènere *Influenzavirus C* (veure taula 1). El virus gripals C tenen com a hoste únic els essers humans i causen infecció respiratòria, tant en el tracte superior com en l'inferior ⁵¹.

Antecedents històrics

El FLUCV es va aïllar per primera vegada al 1947, en un estudi realitzat amb mostres de pacients que presentaven símptomes d'infecció respiratòria ⁵². No va ser fins al 1950 quan es va descriure com un nou virus gripal ⁵³. No obstant, tot i que han passat gairebé 60 anys des de que va ser aïllat per primera vegada, hi ha pocs estudis sobre les característiques clíniques de la infecció, en comparació amb la resta de virus gripals, segurament per les dificultats per aïllar-los ⁵⁴.

Estructura vírica

Es tracta de virus embolcallats, generalment esfèrics tot i que també poden ser filamentosos. Els virions tenen una mida aproximada de 80-120 nm de diàmetre. El genoma és RNA monocatenari, de polaritat negativa i segmentat en 7 fragments. El genoma té una mida total d'aproximadament 10 kilobases i codifica 9 proteïnes. L'embolcall prové de la membrana de la cèl·lula hoste, del qual li sobresurten espícules d'una glicoproteïna, la hemaglutinina-esterasa de fusió HEF. La proteïna HEF té tres funcions principals: reconèixer el receptor cel·lular, intervenir en la fusió viral, i destruir el receptor per alliberar els virions⁵⁵ (veure figura 5).

El genoma codifica també diferents proteïnes internes: la proteïna de membrana M1, la proteïna CM2 que forma canals proteics, la nucleoproteïna NP, el complex de polimerases PA, PB1 i PB2, implicades en la transcripció del RNA missatger i en la replicació del RNA viral. Finalment, codifica dues proteïnes no estructurals, la NS1 i la proteïna nuclear d'exportació (NEP), també anomenada NS2. Ambdues proteïnes estan codificades al mateix gen, però el producte principal, la proteïna no estructural NS1, es tradueix a partir d'un RNAm complet, mentre que la NS2 és traduïda d'un RNAm *spliced* (tall-unió). La NS1 té varies funcions, una d'elles és unir-se al dsRNA víric per evitar que sigui reconegut pel sistema immune de l'hoste³¹. La NS2 facilita la sortida de les ribonucleoproteïnes víriques des del nucli de les cèl·lules infectades al citoplasma³² (veure figura 5).

La infecció pel virus comença amb la unió del virus als receptors de la cèl·lula hoste mitjançant la HEF. Aquesta glicoproteïna reconeix l'àcid siàlic de les cèl·lules epitelials traqueobronquials i s'uneix al receptor de l'àcid 9-*O*-acetil-*N*-acetilneuramínic (Neu5,9Ac2), receptor diferent del que utilitzen la resta de virus gripals⁵⁵. El virus entra dins la cèl·lula per endocitosis i inicia la replicació i posterior disseminació.

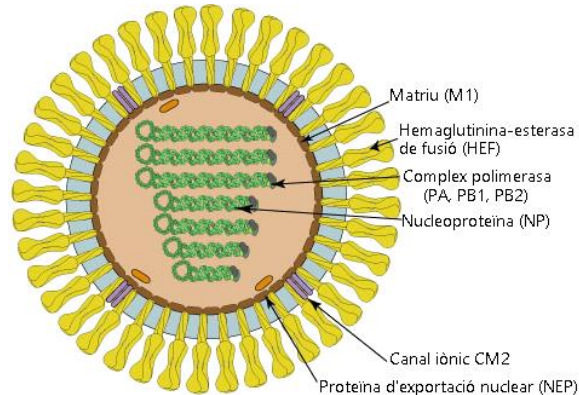


Figura 5

Estructura dels virions del virus gripal C. Adaptat de *Viralzone*. (<http://viralzone.expasy.org/>)

Epidemiologia

Els estudis epidemiològics que s'han realitzat demostren que el FLUCV té una distribució universal i habitualment es presenta els mesos d'hivern, com la resta de virus gripals. D'altra banda s'ha vist que la majoria d'essers humans han adquirit anticossos front el virus en les primeres etapes de la vida, i també s'ha documentat com a causa etiològica de brots epidèmics a les escoles i la comunitat; per tant, la infecció per aquest virus és comú a la infància i el seu paper com causant de malaltia respiratòria no s'ha de subestimar ^{51, 54}.

Mecanismes i rutes de transmissió

La principal manera de propagació del virus és la via aèria, especialment per aerosols. També es pot transmetre per contacte amb superfícies contaminades i autoinoculació.

Clínica i simptomatologia

La infecció per FLUCV es manifesta com un quadre respiratori de vies altes, sense una elevada repercussió sistèmica i que en general és de caràcter lleu ⁵⁶. Els símptomes més comuns inclouen febre, tos i rinorrea. Poden donar també infecció del tracte respiratori inferior causant bronquitis, bronquiolitis i pneumònia.

Els estudis han demostrat que el FLUCV afecta sobretot a nens menors de 6 anys i que les complicacions es donen sobretot en els menors de 2 anys. En adults, la infecció sol cursar asimptomàtica o com una malaltia respiratòria lleu. No obstant, hi ha un cas registrat d'encefalopatia aguda causada pel virus de la grip C ⁵¹.

Diagnòstic

El FLUCV està infradiagnosticat en comparació amb la resta de virus gripals. Aquests virus tenen una taxa de recuperació baixa en les línies cel·lulars comunament utilitzades per l'aïllament dels virus gripals, especialment les MDCK, degut a que aquestes línies no expressen el receptor Neu5,9Ac2 on s'uneix el virus ⁵⁵.

No s'han desenvolupat mètodes de detecció d'antigen per al diagnòstic degut a la manca d'anticossos monoclonals disponibles. Les tècniques moleculars basades en la PCR semblen ser actualment el sistema més assequible per la detecció del virus, tot i que hi hagi pocs estudis en aquesta direcció ⁵¹.

Profilaxis i tractament

Actualment no hi ha cap vacuna disponible, ni s'han descrit antivirals actius front les infeccions pels virus gripals C ⁷. En el cas del favipirarir, s'ha estudiat com a possible antiviral també contra els virus gripals C, ja que inhibeix la RNA polimerasa RNA-depenent ⁵⁰.

VIRUS PARAINFLUENÇA

Generalitats

Els virus parainfluença són espècies de la família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, classificats en dos gèneres, el gènere *Respirovirus* on trobem els virus parainfluença humans tipus 1 i 3 (PIV-1, PIV-3) i el gènere *Rubulavirus* que inclou els virus parainfluença humans tipus 2 i 4 (PIV-2, PIV-4) (veure taula 1).

Els 4 virus parainfluença són causants d'infecció del tracte respiratori inferior en nens petits, i que sovint tornen a infectar a nens grans i adults produint afectació del tracte respiratori superior. La majoria de les característiques estructurals i biològiques són similars entre els 4 virus, però cada un d'ells s'ha adaptat per infectar als éssers humans en diferents edats i causar diferents malalties ^{57, 58}.

Antecedents històrics

El virus parainfluença van ser descoberts per primera vegada a finals de 1950, quan es van trobar tres virus diferents recuperats de nens amb crup. Es van separar fàcilment dels virus gripals, ja que no es multiplicaven en ous embrionats i no compartien característiques antigèniques amb els virus de la grip. Posteriorment l'any 1959, es va trobar un quart virus que també reunia aquests criteris de classificació, finalment es va crear un nou grup taxonòmic anomenat virus parainfluença. Actualment es classifiquen

en quatre tipus: parainfluença tipus 1 (PIV-1), parainfluença tipus 2 (PIV-2), parainfluença tipus 3 (PIV-3) i parainfluença tipus 4 (PIV-4). El tipus 4 a la vegada es subdivideix en dos subtipus PIV-4a i PIV-4b.

Estructura vírica

Es tracta de virus embolcallats, de forma esfèrica i amb una nucleocàpsida de simetria helicoidal levogira amb una mida aproximada de 150 nm de diàmetre. El genoma és RNA de cadena simple i polaritat negativa, d'aproximadament 15 kilobases.

S'han trobat virions amb polaritat positiva, però es creu que no són infecciosos. L'embolcall procedeix de la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste. El genoma codifica diferents proteïnes. La nucleoproteïna (N o NP). Dues proteïnes una fosfoproteïna (P) i una polimerasa (L), ambdues amb funció replicasa. Aquestes dues proteïnes interactuen amb la proteïna de matriu (M), la qual dirigeix la inserció i agregació de les nucleocàpsides acabades a la membrana de la cèl·lula

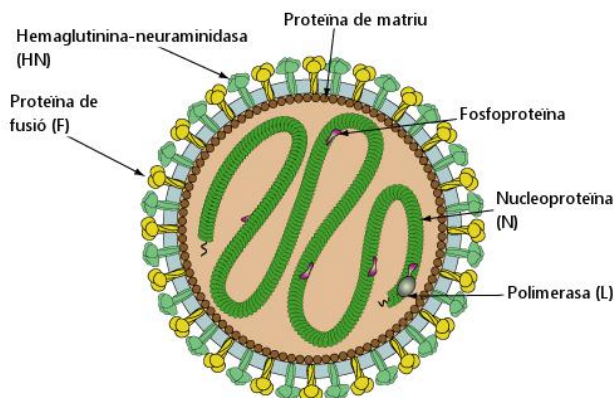


Figura 6

Estructura dels virions de la subfamília *Paramyxovirinae*, a la qual pertanyen els virus parainfluença. Adaptat de *Viralzone*. (<http://viralzone.expasy.org/>)

infectada ⁵⁸. A l'embolcall víric hi ha dos proteïnes: una proteïna amb doble funció, coneguda com hemaglutinina-neuraminidasa (HN), responsable de la unió del virus als receptors, i una segona proteïna, de fusió (F), responsable de la penetració del virus al citoplasma cel·lular (veure figura 6).

Els quatre PIV es diferencien segons la composició antigènica i les manifestacions clíniques que causen ^{57, 58}.

Epidemiologia

Els virus parainfluença són ubics i presenten una variació estacional, essent menys freqüents durant els mesos d'estiu. El PIV-1 causa infeccions bianuals sobretot durant la tardor. El PIV-2 també causa

infeccions bianuals que es poden donar junt amb el PIV-1 o en els anys alterns, durant la tardor i principis d'hivern. Entre aquests dos virus el tipus 1 és més freqüent que el 2, i la major incidència d'ambdós es produeix als 2-3 anys d'edat. D'altra banda, el tipus 3 és endèmic tot l'any, amb un pic a la primavera i és el més prevalent, ja que aproximadament el 50% dels nens s'infecten durant el primer any de vida i, de fet, sembla ser l'únic virus parainfluença capaç d'infectar als nens menors de 6 mesos. Per tant s'estima que als 5-6anys de vida el 95% dels nens tenen anticossos contra els virus. Després dels 7 anys les infeccions cursen habitualment de manera subclínica. Per contra, hi ha pocs estudis publicats amb aïllament i epidemiologia del PIV-4. Aquests pocs casos semblen afectar de manera equitativa a nens menors d'1 any, nens en edat preescolar i escolar i adults. Els estudis de seroprevalença han reportat que del 60 al 84% dels nadons tenen anticossos després del naixement (es creu que són d'origen matern). Aquests nivells baixen a 7 a 9% en nens de 7 a 12 mesos d'edat i es mantenen baixos durant diversos anys abans d'augmentar a un 50% en 3 a 5 anys d'edat. Posteriorment, aquests nivells d'anticossos front PIV-4 segueixen augmentant durant tota la infància, fins arribar al 75-95% en adults ⁵⁸.

Mecanismes i rutes de transmissió

La transmissió dels virus parainfluença és per contacte amb superfícies contaminades i autoinoculació o per via aèria a través de la inhalació de secrecions contaminades ⁵⁸.

Clínica i simptomatologia

Els PIV-1 i PIV-2 solen causar infeccions que afecten la laringe i la tràquea. El PIV-1 és la causa principal de crup en nens i el PIV-2 s'assembla al PIV-1 en quant a les manifestacions clíniques, però causa una malaltia menys greu. El PIV-3 està més associat a infeccions del tracte respiratori inferior com són la bronquitis, bronquiolitis i broncopneumònia, i només és superat pel RSV com a causa d'infecció en nadons menors de 6 mesos d'edat. Finalment, en el cas dels PIV-4 (a i b) causen infeccions que es detecten amb poca freqüència ja que s'associen amb malaltia respiratòria lleu en el tracte respiratori superior de nens i adults.

El temps d'incubació és de 2-6 dies i es pot seguir excretant el virus durant 7-11 dies. La clínica comença amb rinitis i faringitis durant uns dies, i també es pot patir afonia i estridor respiratòria. Pot donar-se febre moderada, que generalment dura de 2-3 dies. La majoria de nens es recuperen sense problemes

del crup després de 24 o 48 hores, tot i que si hi ha afectació de bronquitis o pneumònia, la febre i la tos duren més temps. Les reinfeccions pel mateix serotip o per un altra parainfluença són freqüents, però la simptomatologia sol ser més lleu. No obstant, en pacients immunodeprimits les infeccions poden donar lloc a infeccions greus i perllongades ⁵⁹.

Diagnòstic

En la majoria d'estudis que s'utilitza l'aïllament en cultiu cel·lular a partir de mostres clíniques, es fa servir la línia cel·lular LLC-MK2, ja que s'ha demostrat com una de les línies més sensibles per a la detecció. Les tècniques d'immunofluorescència també s'han adaptat per a la detecció d'antígens dels virus parainfluença, però els resultats són variables i els rangs de sensibilitat varien segons el virus. Els millors resultats s'han donat sempre amb el PIV-3 ⁵⁸. D'altra banda, els mètodes moleculars també han demostrat ser una eina vàlida per a la detecció d'infeccions causades per virus parainfluença ^{60, 61}, en especial pel virus parainfluença 4, ja que el seu aïllament en cultiu cel·lular és generalment ineficient ⁶².

Profilaxis i tractament

Els anticossos materns ofereixen protecció contra els PIV-1 i PIV-2 en nens menors de 4 mesos, però no pel PIV-3. A partir dels 4 mesos la incidència d'infeccions greus augmenta i és màxima dels 3 als 5 anys, mentre que, finalment disminueix amb el inici de l'edat escolar, i és gairebé inexistent durant la vida adulta.

Tot i que s'han estudiat possibles vacunes, els resultats d'immunització han estat menors que els observats amb una infecció natural. Actualment el desenvolupament d'una vacuna viable està enfocat a la utilització de soques vives atenuades o a la utilització de parts de les proteïnes víriques (sobretot la HN i la F), tot i que encara no han estat provades en humans ⁵⁸.

Actualment no hi ha medicaments antivirals disponibles front una infecció per virus parainfluença. Diversos estudis *in vitro* avalen la utilització d'alguns antivirals, tot i que encara no s'ha demostrat la seva eficàcia clínica. L'amantadina, tindria certa activitat virustàtica a concentracions molt altes. De la mateixa manera, la ribavirina, tindria efecte tant *in vitro* com *in vivo* contra els virus parainfluença ⁵⁸. També s'estudien altres compostos i fàrmacs, com són el zanamivir (inhibidors de la neuraminidasa), la puromicina (inhibidors de la síntesi de proteïnes), derivats del benzotiazol (inhibidors de la síntesi d'àcid

nucleic), entre d'altres, tot i que encara cap d'aquests compostos ha demostrat tenir aplicacions clíniques. Així mateix, s'han realitzat estudis amb l'interferó (alfa i gamma) que demostren un efecte immunoestimulador que podria protegir contra les infeccions per paramixovirus ⁵⁸.

VIRUS RESPIRATORI SINCICIAL

Generalitats

El virus respiratori sincicial (RSV) és l'agent etiològic més important d'infecció de les vies respiratòries baixes en infants i nens petits. Pertany al gènere *Pneumovirus* de la família *Paramyxoviridae* i subfamília *Pneumovirinae* (veure taula 1). És la principal causa de la bronquiolitis i pneumònia en lactants i nens petits.

Antecedents històrics

El virus respiratori sincicial va ser aïllat per primera vegada d'un ximpanzé amb una malaltia semblant al refredat comú al 1956. Poc després, el virus es va recuperar de mostres de nens petits amb malaltia greu del tracte respiratori inferior. Des de l'inici de la seva detecció en nens petits ara ja fa més de 30 anys, el RSV s'ha convertit en el principal virus causant de infecció del tracte respiratori inferior en els nens més petits, i tot i que s'ha estudiat durant molts anys, encara no es coneixen del tot els mecanismes epidemiològics que fan que infecti arreu del món. Actualment s'estudia el desenvolupament d'una vacuna segura i eficaç per tal de poder reduir la morbiditat i mortalitat ⁶³.

Estructura vírica

Són virus embolcallats i pleomòrfics, tot i que solen tenir una forma esfèrica irregular. Tenen una nucleocàpsida de simetria helicoidal levogira amb una mida aproximada de 100-350 nm de diàmetre amb uns filaments llargs d'uns 60-200 nm de diàmetre i de fins a 10 µm de llargada. El genoma està format per RNA de cadena simple, no segmentat, de polaritat negativa i longitud aproximada de 15 kilobases. Conté 10 gens separats, que codifiquen 11 proteïnes, 9 proteïnes estructurals i 2 no estructurals. L'embolcall lipídic prové de la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste, i conté tres glicoproteïnes de superfície: una glicoproteïna gran (G), una proteïna de fusió (F), i una proteïna

hidròfoba (SH). A la cara interna de l'embolcall es troba una proteïna no glicosilada de matriu (M). Així mateix, la nucleocàpsida té quatre proteïnes, una nucleoproteïna (N), una fosfoproteïna (P), dos factors de regulació de la transcripció (M2-1 i M2-2), i una polimerasa (L). Finalment, el virió té dos proteïnes no estructurals (NS1 i NS2) les quals actuen interferint en la resposta primària de l'interferó- α/β ^{64, 65} (veure figura 7).

La infecció s'inicia per la unió de la proteïna G a la superfície de la cèl·lula hoste. Donat que els virions no tenen cap proteïna amb funció hemaglutinina ni neuraminidasa, tota la unió recauria sobre aquesta proteïna i posteriorment la fusió es donaria a través de la proteïna F.

El RSV es classifica en subgrups, A i B, segons les diferències antigèniques de les proteïnes, especialment en la proteïna G.

Epidemiologia

Una de les característiques més remarcables de l'epidemiologia del RSV és que presenta un patró d'infecció i unes manifestacions clíniques molt regulars. Tenen una distribució universal, i causen infeccions cada any als grans centres urbans d'arreu del món. En les zones temperades, les infeccions es donen principalment al final de la tardor i l'hivern, o inclòs principis de primavera, però mai durant l'estiu, mentre que a les zones tropicals, les infeccions es produeixen durant l'estació de pluges ⁶³.

Mecanismes i rutes de transmissió

Diversos estudis han demostrat que el principal mètode de propagació és a través de gotes grans o per mitjà de la contaminació per material infectat. La infecció per contacte directe requereix o bé d'un contacte molt proper amb nens infectats o bé d'una contaminació de les mans amb superfícies on es trobin les secrecions respiratòries infectades, i el posterior traspàs entre els dits a la mucosa nasal o conjuntival ⁶³.

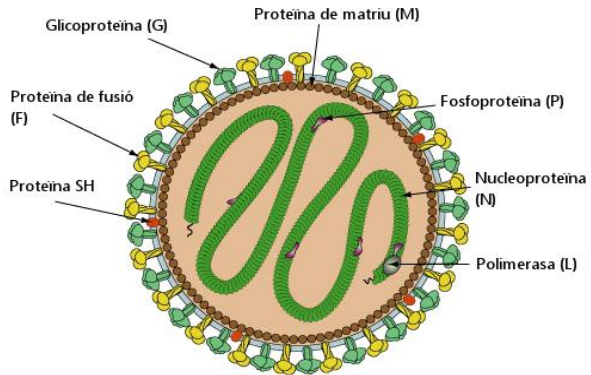


Figura 7

Estructura dels virions de la subfamília *Pneumovirinae*, a la qual pertanyen el virus respiratori sincicial i el metapneumovirus. Adaptat de *Viralzone*. (<http://viralzone.expasy.org/>)

Clínica i simptomatologia

La infecció del RSV s'associa amb una gran varietat de manifestacions clíniques que van des de símptomes lleus semblants al refredat comú fins a malalties greus del tracte respiratori inferior, com bronquiolitis o pneumònia. El virus infecta i es multiplica a les cèl·lules ciliades del tracte respiratori i a les cèl·lules de l'epiteli alveolar. El temps d'incubació és de 3-6 dies. Els primers símptomes són els de infecció de vies altes, tos i rinorrea, tant en nens com en adults. La bronquiolitis només es desenvolupa en nens petits, generalment menors de 12 mesos. L'afectació de les vies respiratòries baixes ocorre durant la primera setmana de la malaltia. Es manifesta clínicament amb panteixos, i es pot donar cianosis en casos greus amb apnea. Entre el 25% i el 40% dels nens infectats presenten els símptomes de bronquiolitis o pneumònia durant la infecció primària. Aproximadament el 20% dels nens amb bronquiolitis desenvolupen una otitis mitjana ⁶⁶.

En joves i adults la infecció es presenta com un refredat comú, tot i que els pacients de la tercera edat i els immunodeprimits poden desenvolupar pneumònia (10-20%) amb resultats a vegades letals (2-5%) ⁶⁷.

Diagnòstic

El diagnòstic específic de la infecció per RSV es realitza mitjançant l'aïllament del virus en cultiu o la detecció d'antígens virals. Les línies cel·lulars que resulten més idònies per l'aïllament del RSV en cultiu cel·lular són les HEP-2, l'A-549 o les HeLa, no obstant és un virus extremadament làbil, lo qual afecta al seu aïllament ⁴⁵. La detecció d'antigen per immunofluorescència és el mètode amb la sensibilitat més elevada. Així mateix, els mètodes d'immunocromatografia també presenten una elevada sensibilitat, tot i que s'ha vist que funcionen millor en mostres de nens que no pas les d'adults ⁶⁸.

Els mètodes moleculars també ofereixen una elevada sensibilitat per al diagnòstic, i actualment estan disponibles diferents panells de virus respiratoris per PCR múltiple que inclouen el RSV ⁴⁵.

Profilaxis i tractament

No existeix una vacuna eficaç contra la infecció per RSV. Els anticossos materns no protegeixen de la infecció i tampoc la pròpia infecció protegeix de possibles reinfeccions, però si disminueix la gravetat dels símptomes.

Existeixen dos antivirals aprovats per l'Administració d'Aliments i Medicaments dels Estats Units (FDA, per les seves sigles en anglès: *Food and Drug Administration*) com a tractament i prevenció del RSV, la ribavirina, un anàleg de la guanosina, i el palivizumab, un anticòs monoclonal. La ribavirina està aprovada com a tractament per la bronquiolitis en nens hospitalitzats. Actua principalment com un inhibidor de la RNA polimerasa, i que també té efecte immunomodulador. No obstant, actualment no es recomana utilitzar la ribavirina de forma rutinària en nens amb bronquiolitis perquè els estudis no demostren una reducció de la mortalitat i té un cost elevat ⁷. El palivizumab està aprovat com a preventiu de la infecció per RSV en nens hospitalitzats i persones d'alt risc.

Actualment s'estan desenvolupant altres antivirals contra la infecció del RSV: El RSV-604, una benzodiazepina oral que inhibeix la proteïna N del RSV; el TMC353121, un inhibidor de la fusió; el MDT-637, també conegut com VP-14637, un altre inhibidor de la fusió; i l'ALN-RSV01, un RNA d'interferència sintètic, que actuaria evitant l'expressió gènica del virus. Tots aquests compostos estan en fase de desenvolupament i proves. Així mateix, també s'ha desenvolupat com a preventiu el motavizumab, un anticòs monoclonal de nova generació més potent que el palivizumab ⁷.

METAPNEUMOVIRUS

Generalitats

Els metapneumovirus (hMPV) pertanyen a la família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* i es classifiquen dins del gènere *Metapneumovirus* (veure taula 1). Són virus causants d'infecció respiratòria del tracte superior i inferior amb diferent grau d'afectació, sobretot en nens ⁶⁹.

Antecedents històrics

Es va descriure per primera vegada a Holanda a l'any 2001, a partir de mostres respiratòries recollides durant un període de 20 anys i observades per microscopi electrònic. Actualment s'ha identificat en tot el món com un causant d'infecció respiratòria, sent el responsable d'aproximadament del 2 al 12% de les infeccions del tracte respiratori inferior en nens menors de 5 anys ⁷⁰.

Estructura vírica

Són virus embolcallats, de forma esfèrica i amb una nucleocàpsida de simetria helicoidal levogira amb una mida aproximada de 150 nm. El genoma, una única molècula de RNA monocatenari, de polaritat negativa i longitud aproximada de 13 kilobases, inclou 8 gens que codifiquen 9 proteïnes diferents. L'embolcall lipídic procedeix de la membrana cel·lular de la cèl·lula hoste, el qual està cobert en el seu interior per la proteïna de la matriu M, i conté tres glicoproteïnes de superfície: les espícules de glicoproteïnes: de la proteïna G d'adhesió, la proteïna F de fusió i la proteïna SH amb característiques hidròfobes. El RNA viral està associat a la nucleoproteïna N, la fosfoproteïna P i la polimerasa L, i probablement també estaria associat als factors M2-1 i M2-2, els quals formarien la simetria helicoidal de la nucleocàpsida (veure figura 7) ⁷⁰.

La infecció s'inicia per la unió de les proteïnes de superfície als receptors cel·lulars i mitjançant la fusió de la membrana del virus amb les membranes cel·lulars ⁷¹.

Entre els hMPV humans es reconeixen dos genotips, els A i B. Tots dos genotips poden co-circular simultàniament, però durant una epidèmia, generalment domina un sol genotip. Cada un d'aquests genotips es divideix en dos subgrups, els A1, A2, B1 i B2. Aquesta classificació es basa principalment en la variabilitat de la seqüència de la proteïna d'unió (G) i de la proteïna de fusió (F) presents a la superfície del virus. No obstant, no s'ha demostrat cap rellevància clínica entre la malaltia causada pels diferents subgrups ⁶⁹.

Epidemiologia

Els hMPV tenen una distribució universal, ja que estan presents a tots els continents, i tenen una activitat principal a finals d'hivern i primavera ⁷⁰.

La majoria dels nens han estat exposats al hMPV als 5 anys, edat en la que es troba una seroprevalença del 100% ⁶⁹. No obstant, la resposta immune no proporciona una immunitat completa contra la infecció i es poden donar reinfeccions. En adults immunocompetents la proporció de les infeccions per hMPV varia entre el 3 i el 7,1%, i en les infeccions nosocomials aquests percentatge d'infeccions augmenta fins al 4,3-13,2% ⁶⁹.

Mecanismes i rutes de transmissió

El hMPV presenta un tropisme preferent per les cèl·lules epitelials ciliades del tracte respiratori humà. Es creu que el hMPV es transmet per via respiratòria o per contacte amb superfícies contaminades i autoinoculació, especialment a través de la saliva, gotes o aerosols de partícules grans ⁶⁹.

Clínica i simptomatologia

S'estima que el període d'incubació de la malaltia causada per hMPV és entre 4 i 6 dies i que el virus es segueix excretant durant un període de 5 dies a 2 setmanes ⁷⁰. En casos d'infecció nosocomial, s'ha estimat un període d'incubació entre 4 i 9 dies ⁶⁹. L'espectre de la malaltia pot variar des d'infeccions lleus del tracte respiratori superior, com la faringitis, a quadres greus del tracte respiratori inferior, com bronquiolitis o pneumònia. Els primers símptomes són els de infecció de vies altes: tos i rinorrea, tant en nens com en adults. La bronquiolitis només es desenvolupa en nens petits, generalment menors de 5 anys d'edat i en persones de la tercera edat. En pacients immunodeprimits pot causar pneumònia. L'afectació de les vies respiratòries baixes ocorre durant la primera setmana de la malaltia. Es manifesta clínicament amb panteixos, sibilacions, dificultat per respirar, ronquera, tos en els nens, i en els adults agreujament de l'asma i cianosis amb apnea.

En joves i adults prèviament sans, la infecció pot ser asimptomàtica o manifestar-se com un refredat comú, amb símptomes lleus, incloent tos, mocs o congestió nasal, mal de coll i febre ⁶⁹.

Diagnòstic

El diagnòstic específic de la infecció per hMPV es pot realitzar mitjançant l'aïllament del virus en cultiu. Les línies més idònies pel seu aïllament són les LLC-MK2 i les Vero. No obstant, la multiplicació en cultiu és lenta, ja que l'efecte citopàtic sol aparèixer a les dues setmanes de la inoculació.

Existeixen també tècniques de diagnòstic ràpid per detecció d'antigen, en especial la immunofluorescència. Així mateix, també es pot detectar per mètodes moleculars, ja que actualment existeixen molts equips de panells de virus respiratoris per PCR múltiple disponibles comercialment que detecten hMPV ⁷⁰.

Profilaxis i tractament

Actualment no existeix una vacuna específica contra les infeccions per hMPV. S'han realitzat diversos estudis per desenvolupar vacunes basades en virus inactivats, virus vius atenuats, proteïnes recombinants o proteïnes del DNA víric; però el principal inconvenient és la dificultat d'induir una resposta immune forta i de llarga durada ⁷⁰.

Com a tractament, no existeix una sola solució terapèutica, no obstant, en diversos estudis s'ha determinat que la majoria de les molècules antivirals eficaces contra el RSV, també servien en casos d'infecció per hMPV. La ribavirina i les immunoglobulines, sobretot el palivizumab, serien els tractaments més acceptats ⁷⁰.

RINOVIRUS

Generalitats

Els rinovirus (RV) pertanyen a la família *Picornaviridae*, gènere *Enterovirus* (veure taula 1). El seu nom prové de que principalment les infeccions que causa estan localitzades a l'epiteli nasal. Estan considerats com un dels agents etiològics més importants causants d'infecció de les vies respiratòries superiors en nens i adults.

Antecedents històrics

Els rinovirus van ser descoberts en la dècada de 1950. Els estudis epidemiològics realitzats van demostrar que eren els responsables d'una gran quantitat de les malalties respiratòries agudes, sobretot en l'entorn familiar i escolar. Tot i que han passat gairebé 60 anys, encara s'està estudiant una possible "cura" per a aquest virus del refredat comú ^{72, 73}.

Inicialment, els RV estaven classificats sota el gènere *Rhinovirus*, i es van identificar fins a 100 serotips diferents de RV. Posteriorment i mitjançant la seqüenciació de les diferents parts del virus, es van dividir dues espècies: els RV-A (amb 74 serotips) i les RV-B (amb 25 serotips), en base a criteris de seqüències filogenètiques. L'any 2008, es van retirar com a un gènere de la família *Picornaviridae* i es van reclassificar dins del gènere *Enterovirus* ⁷⁴. L'any 2006, gracies al desenvolupament de les tècniques

moleculars, es va identificar una nova espècie, el RV-C, però no va ser fins al 2009 que va ser acceptada pel Comitè Internacional de Taxonomia de Virus ⁷³. Les diferents espècies que inclou actualment el gènere *Enterovirus* es mostren a la taula 3.

Taula 3

Classificació i nomenclatura actual de les principals espècies del gènere *Enterovirus* que afecten a l'esser humà.

Gènere	Espècie	(sero)tipus que inclou l'espècie
<i>Enterovirus</i>	<i>enterovirus A</i>	coxsackievirus A2 (CV-A2), CV-A3 ~ CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, enterovirus A71 (EV-A71), EV-A76, EV-A89 ~ EV-A92, EV-A114, EV-A119 ~ EV-A121.
	<i>enterovirus B</i>	coxsackievirus B1 (CV-B1), CV-B2 ~ CV-B6, CV-A9, echovirus 1 (E-1), E-2 ~ E-9 (inclòs. CV-A23), E-11 ~ E-21, E-24 ~ E-27, E-29 ~ E-33, enterovirus B69 (EV-B69), EV-B73 ~ EV-B75, EV-B77 ~ EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107 i EV-B111.
	<i>enterovirus C</i>	poliovirus (PV) 1, PV-2, PV-3, coxsackievirus A1 (CV-A1), CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19 ~ CV-A22, CV-A24, EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116, EV-C117 i EV-C118.
	<i>enterovirus D</i>	EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111. El RV-87 es va reclassificar com EV-D68.
	<i>rinovirus A</i>	rinovirus (RV) A1, A2, A7 ~ A13, A15, A16, A18 ~ A25, A28 ~ A34, A36, A38 ~ A41, A43, A45 ~ A47, A49 ~ A51, A53 ~ A68, A71, A73 ~ A78, A80 ~ A82, A85, A88 ~ A90, A94, A96, A100 ~ A109.
	<i>rinovirus B</i>	rinovirus (RV) B3 ~ B6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B48, B52, B69, B70, B72, B79, B83, B84, B86, B91 ~ B93, B97, B99, B100 ~ B106.
	<i>rinovirus C</i>	55 tipus de RV-C (C1-C55).

Adaptada de *Picornaviridae.com* (<http://www.picornaviridae.com/>).

Estructura vírica

Són virus petits, de forma esfèrica i simetria icosaèdrica, amb un diàmetre d'uns 30 nm. El genoma és RNA monocatenari, d'aproximadament 7,2-8,5 kilobases, amb polaritat positiva i una càpsida proteica, sense embolcall. Hi ha una copia de RNA per cada partícula viral. La part central del genoma codifica les diferents proteïnes virals, mentre que els extrems del genoma són seqüències no codificants amb funció d'ajuda en la replicació i traducció.

La càpsida està formada per 60 capsòmers, cada un format per 3 proteïnes comuns a tots el picornavirus, unides a una quarta proteïna comú, les proteïnes víriques VP1-4, on la VP1 és la més immunògena. Les VP1, 2 i 3 són externes, i formen la diversitat antigènica del virus, mentre que la VP4 és interna i ancora el nucli de RNA a la càpsida. Les proteïnes externes serveixen per la unió a les

cèl·lules, en especial al VP1. Existeix també una única còpia per cada partícula viral d'una proteïna coneguda com la VPg que és necessària per la síntesis del RNA (veure figura 8).

Actualment existeixen 3 espècies de RV, A, B i C (veure taula 3). Aquesta classificació es basa en les diferències en l'especificitat del receptor i la seqüència de nucleòtids de les quatre VP ^{72, 73}.

Epidemiologia

Els RV causen malaltia respiratòria a tot el món i durant tot l'any. Les infeccions per RV són endèmiques, però es donen amb més freqüència durant la tardor i la primavera en climes temperats. Amb la nova identificació del RV-C, es va estudiar la seva epidemiologia en diferents regions geogràfiques, i també va mostrar una distribució universal i que infectaven durant tot l'any, tot i que amb una incidència màxima durant la tardor i l'hivern ^{73, 75, 76}.

Els RV causen aproximadament entre la meitat i dos terços dels refredats comuns. La freqüència d'infecció és major en nens i disminueix amb l'edat. Els nens en edat escolar es consideren el principal focus d'infecció, tant per altres nens com per als adults. Així mateix, en nens s'ha relacionat als RV com una causa molt freqüent d'infecció asimptomàtica. En nens menors de 4 anys d'edat, la infecció asimptomàtica es donaria en un 12-32% dels casos ⁷³.

Mecanismes i rutes de transmissió

El virus es transmet principalment per via aèria a través d'aerosols o per contacte amb superfícies contaminades i autoinoculació.

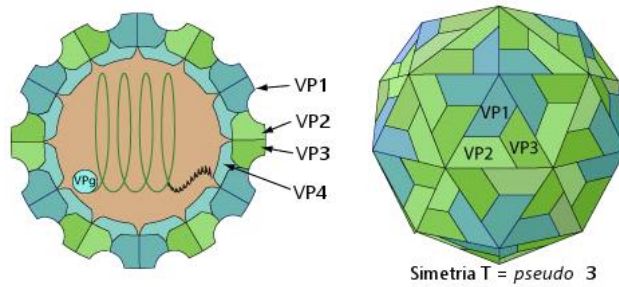


Figura 8

Estructura dels virions del gènere *Enterovirus*, al qual pertanyen els rinovirus i els enterovirus. Adaptat de *Viralzone* (<http://viralzone.expasy.org/>).

La simetria és $T = pseudo\ 3$. La capsòmera icosaèdrica es compon de 12 capsòmers pentamèrics i 20 capsòmers hexamèrics, amb un total de 180 proteïnes a la capsòmera. Aquestes capsòmeres no tenen la simetria $T=3$, a causa de que la unitat bàsica es compon de tres proteïnes diferents, per tant, l'estructura és un *pseudo* $T=3$.

Donat que són virus sense embolcall, són molt estables i resisteixen a la inactivació per dissolvents orgànics. Tot i així, els RV són més sensibles als pH àcids que els EV. En condicions experimentals, poden sobreviure de dies a hores en un ambient d'interior, i a temperatura ambient sobre la pell unes dues hores ^{72, 73}.

Clínica i simptomatologia

El temps d'incubació és de 2-3 dies, i el període de durada dels símptomes és de 7 a 14 dies, temps durant el qual es continua excretant el virus. Els símptomes més freqüents són rinorrea, congestió nasal, mal de coll, tos, mal de cap, febre moderada i malestar general. La malaltia cursa de manera autolimitada en hostes immunocompetents.

A banda del refredat comú, els RV també són causa de diferents tipus d'infeccions respiratòries. En les infeccions del tracte respiratori superior, són també causa comú de sinusitis i d'otitis mitjana aguda, especialment en nens. En el cas de les infeccions de les vies respiratòries inferiors, els RV són la segona causa més freqüent de bronquiolitis en nens hospitalitzats, i també estan associats amb la pneumònia adquirida en la comunitat, on en nens causa entre el 18 i el 26% dels casos i en adults el 5% ⁷³.

Diagnòstic

El mètode de diagnòstic de referència és l'aïllament en cultiu cel·lular. Ara bé, aquest mètode no detecta tots els RV coneguts. Per altra banda, la detecció d'antigen no és un mètode pràctic per al diagnòstic, ja que no existeix un antigen comú per a tots els RV diferents.

Molts RV i especialment els RV-C no es multipliquen en les diferents línies cel·lulars i els que són capaços de multiplicar-se necessiten a més un medi que es mantingui a un pH neutre, ja que són sensibles als àcids. No obstant, la recuperació de les soques resulta important per a l'estudi de les característiques del virus i la patogènesi de la malaltia ⁷³.

Actualment, els mètodes moleculars són les proves més capaces de detectar els diferents RV existents i han permès la detecció dels RV-C ^{74, 75}.

Profilaxis i tractament

Actualment no hi ha cap vacuna disponible front les infeccions per RV.

Durant els últims anys s'han desenvolupat diversos antivírics per al tractament i profilaxis de les infeccions causades per RV. Les investigacions es centren sobretot en l'interferó alfa, en inhibidors de la unió i la penetració vírica i en inhibidors de la proteasa viral. Respecte a l'interferó alfa, s'ha utilitzat com a prevenció o tractament de les infeccions ⁷.

Es va dissenyar el tremacamra, una forma soluble del receptor que utilitza el virus per adherir-se a la cèl·lula hoste, com a inhibidors de la unió i entrada del virus, i posteriorment es va desenvolupar el pleconaril, el qual impedeix la fusió de la nucleocàpsida amb la cèl·lula hoste. Per últim, s'han desenvolupat fàrmacs com el rupintrivir, un inhibidor de la proteasa essencial per a la replicació del virus ⁷. Malgrat tot, els efectes secundaris o la baixa efectivitat fan que aquests antivírics encara no estiguin aprovats per la FDA.

ENTEROVIRUS

Generalitats

El enterovirus (EV) formen part de la família *Picornaviridae*, gènere *Enterovirus* (veure taula 1) i són alguns dels virus més comuns que infecten als éssers humans i als animals a tot el món. Tot i que la majoria de les infeccions per EV humans solen ser asimptomàtiques, estan associats a diversos síndromes clínics que van des de malalties febrils lleus, a malalties greus i potencialment mortals, com la meningitis, encefalitis, miopericarditis, paràlisi flàccida aguda i malaltia similar a la sèpsia neonatal ⁷⁷.

Antecedents històrics

Els enterovirus humans es van descobrir arran de les investigacions efectuades per conèixer l'etiologia de la poliomièlitis. Els primers EV humans que es van aïllar de mostres de femtes, van ser per una banda els virus anomenats coxsackie al 1948 i al 1955 els echovirus. El criteri de classificació inicial es feia en base a les seves característiques antigèniques i les característiques de cultiu, però amb el descobriment de nous tipus d'EV humans cada vegada era més difícil basar la classificació segons aquests criteris.

Amb el descobriment de nous tipus d'EV no classificables per aquest sistema i el desenvolupament de les tècniques moleculars, des de 1974 els nous EV s'anomenen numèricament i es classifiquen segons la seva seqüència genòmica ⁷⁴. Les diferents espècies que inclou actualment el gènere *Enterovirus* es mostren a la taula 3.

Estructura vírica

Els EV són virus petits sense embolcall, de forma esfèrica i simetria icosaèdrica amb una mida aproximada de 30 nm. Estan formats únicament per un genoma de RNA de cadena simple, polaritat positiva i longitud aproximada de 7,2-8,5 kilobases. Hi ha una còpia de RNA per cada partícula viral. La part central del genoma codifica les proteïnes virals VP1, VP2, VP3 i VP4, mentre que els extrems del genoma són seqüències no codificants amb funció d'ajuda en la replicació i traducció. Les VP1, 2 i 3 són externes, i serveixen per la unió a les cèl·lules, mentre que la VP4 és interna i ancora el nucli de RNA a la càpsida. La càpsida està formada per 60 capsòmers, cada un format per les 3 proteïnes externes (VP1, 2 i 3), units a la VP4 interna. Existeix també una única còpia per cada partícula viral d'una proteïna coneguda com la VPg que és necessària per la síntesis del RNA (veure figura 8) ⁷⁸.

Actualment estan definides quatre espècies d'EV que afecten a l'home, EV A, B, C i D (veure taula 3). Els (sero)tipus tenen diferents patrons temporals de circulació i poden estar associats amb diferents malalties ⁷⁷.

Epidemiologia

Els EV tenen una distribució universal. En zones amb climes temperats s'observen més infeccions durant l'estiu i la tardor, en canvi en zones tropicals i subtropicals les infeccions ocorren al llarg de tot l'any ²³. ⁷⁹. S'ha estimat que els EV infecten gairebé mil milions de persones arreu del món cada any ⁴⁵.

Els nens s'infecten amb més freqüència que els adults, especialment els nens menors de 10 anys. Sembla ser que l'edat té una forta associació amb clínica associada: les infeccions per EV del sistema nerviós central (SNC) es donen amb més freqüència en els nens de 5 a 15 anys d'edat, la miocarditis en pacients de 20 a 40 anys d'edat, les infeccions greus (incloent miocarditis, malaltia del SNC i la sèpsia neonatal) en nounats i lactants, i les manifestacions musculars i la febre en nens menors de 5 anys d'edat ⁷⁹.

Mecanismes i rutes de transmissió

En general, els EV són estables a temperatura ambient i només s'inactiven a 50-55°C. Conserven la capacitat d'infecció a pH entre 3-9 i són molt resistents a tractaments amb enzims proteolítics i dissolvents lipídics.

Els EV humans, tenen l'home com a reservori exclusiu. La transmissió principal es la via fecal-oral, però també es poden transmetre per via respiratòria a través d'aerosols, especialment durant la fase aguda de la infecció, així com per la via materno-fetal²³. D'altra banda, donat que els EV poden sobreviure en les superfícies, es creu que el contacte amb superfícies contaminades i posterior autoinoculació, també podria ser una via de transmissió.

Clínica i simptomatologia

La majoria de les infeccions causades per EV cursen com asimptomàtiques. Presenten tropisme per les cèl·lules del tracte gastrointestinal, on causen la infecció primària, que posteriorment es pot arribar a disseminar. Els nens infectats sovint presenten símptomes d'infecció respiratòria, coneguda com "refredat d'estiu"⁴⁵. Són la causa més comú del síndrome febril inespecífic, que es caracteritza per una febre alta sense focus, amb una duració mitja d'uns tres dies, i que pot estar acompanyada de vòmits, diarrea i exantema. En la infecció respiratòria, el temps d'incubació és de 4-7 dies i la clínica característica és la tos. Alguns serotips poden arribar a causar bronquitis aguda, bronquiolitis i pneumònia⁷⁸.

Diagnòstic

Els EV es poden detectar mitjançant el cultiu cel·lular convencional o el shell-vial. Encara que es multipliquen bé en gran varietat de línies cel·lulars, no hi ha línia una cel·lular que pugui detectar tots els (sero)tipus a la vegada, és per això que es requereix normalment una combinació de 3 a 4 línies cel·lulars diferents per intentar detectar tots els serotips possibles. Segons la línia cel·lular on s'aïlla el virus, és necessària la diferenciació entre EV i els RV. Els mètodes moleculars ofereixen la possibilitat de detectar els diferents EV existents. Actualment hi ha proves moleculars comercials disponibles per al diagnòstic, especialment dirigides al gènere *Enterovirus*, i no totes diferencien entre els RV i els EV²³.

Profilaxis i tractament

Actualment no existeixen vacunes front els EV (excepte pels poliovirus), degut a la gran varietat de serotips que existeixen. Degut a la principal via de transmissió dels EV, evitar el contacte amb persones infectades sembla ser la profilaxis més recomanable per als nadons i els pacients immunodeprimits.

No existeix un tractament antiviral específic front les infeccions per EV. Les immunoglobulines s'han utilitzat en casos de miocarditis causada per EV, en les infeccions neonatals i en immunodeprimits en casos d'afectació neurològica ⁷⁸. També s'ha administrat com a profilaxis per reduir el risc de paràlisi en pacients amb infeccions greus per EV. En desenvolupament està també l'ús d'interferó beta també pel tractament de pacients amb miocarditis viral causada per una infecció d'EV. Així mateix, una combinació d'ambdós fàrmacs s'ha utilitzat per tractar a pacients amb fibromiàlgia i infecció per EV.

ADENOVIRUS

Generalitats

Els adenovirus (AdV) pertanyen a la família *Adenoviridae* i al gènere *Mastadenovirus* (veure taula 1). Són virus que infecten a mamífers, dels quals 63 serotips diferents infecten habitualment a l'home. Els adenovirus humans es divideixen en 7 espècies o subgrups: A fins G que comprenen els 63 serotips. En humans, són causants de malalties com infeccions respiratòries, gastroenteritis, conjuntivitis i cistitis, i malaltia febril en els nens petits. Tenen especificitat d'hoste i només infecten una sola espècie d'animal vertebrat durant tot el seu cicle vital.

Antecedents històrics

Es van aïllar adenovirus humans per primera vegada en 1953 a partir de les amígdals, d'on deriva el nom, i de les secrecions respiratòries dels nens i soldats, tot i que no va ser fins al 1976 que es va definir la família *Adenoviridae*. Inicialment es va dividir en dos gèneres, els *Mastadenovirus* (que infecten mamífers, inclosos els éssers humans) i els *Aviadenovirus* (que infectaven aus), i més tard, es van crear dos nous gèneres, els *Atadenovirus* (que infecten rèptils i bestiar) i els *Siadenovirus* (que infecten granotes i galls d'indis). La classificació inicial dels adenovirus es basava en la seva capacitat de ser

neutralitzats per un antiserum animal específic. La classificació actual està basada en la serologia i la seqüenciació genòmica ^{80, 81}.

Estructura vírica

Els AdV són virus sense embolcall, amb una nucleocàpsida de simetria icosaèdrica (20 cares triangulars amb 12 vèrtexs i 30 arestes) d'aproximadament 70-100 nm de diàmetre, que contenen una sola molècula de DNA bicatenari no segmentat de 30-38 kilobases. El genoma codifica 40 proteïnes. Respecte a la nucleocàpsida, cada cara triangular conté unes unitats proteiques anomenades hexons (per la seva forma d'hexàmer) que cobreixen la superfície de la cara pel centre i els costats (12 hexons per cara, 240 per partícula vírica), mentre que al vèrtex de la cara les proteïnes tenen forma pentagonal i s'anomenen pentons. Dels vèrtexs, i per tant dels pentons, sobresurten unes projeccions (fibres) que varien de mida segons el serotips de virus ⁸¹. El genoma codifica també la proteïna terminal (TP) que serveix com a iniciador de la replicació, les proteïnes bàsiques X, V i VII semblants a les histones que estableixen el DNA víric i una proteasa viral que ajuda a la maduració dels virions (veure figura 9).

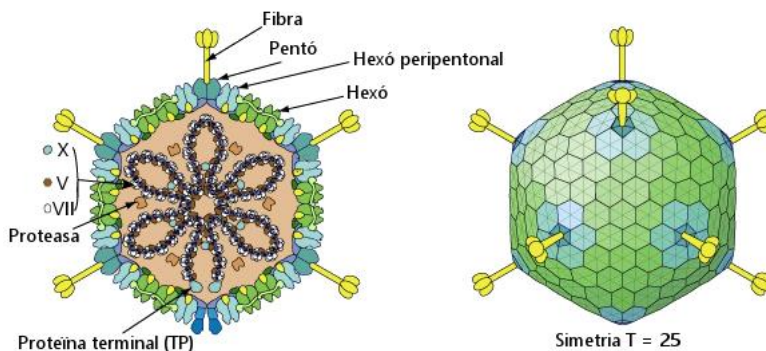


Figura 9

Estructura dels virions del gènere *Mastadenovirus*, corresponent a l'estructura bàsica dels adenovirus. Adaptat de *Viralzone*. (<http://viralzone.expasy.org/>).

La simetria és T=25. La capsida icosaèdrica es compon de 12 capsòmers pentamèrics i 240 capsòmers hexamèrics, amb un total de 1.500 proteïnes a la capsida.

Tant la base dels pentons com les fibres serveixen al virus per a la unió amb la cèl·lula hoste, iniciant el procés d'infecció. Els AdV de diferents espècies i grups utilitzen diferents tipus de receptors cel·lulars per entrar a l'interior de la cèl·lula. En especial, s'ha estudiat la unió als receptors CAR i a les glicoproteïnes CD46, CD80 i CD86, per part dels AdV dels grups C, B i D ⁸¹.

Un cop a l'interior, s'allibera la càpsida viral al citoplasma i es transporta cap al nucli on s'iniciarà la multiplicació viral. Els virions s'assemblen dins del nucli i finalment són alliberats per lisi cel·lular.

Epidemiologia

Els AdV tenen una distribució geogràfica universal. Es tracta d'uns virus molt ubics, que s'han recuperat de totes les zones del món on s'han buscat. Les infeccions per AdV són endèmiques, tot i que poden manifestar-se com brots epidèmics. Les infeccions respiratòries es donen amb més freqüència a finals de l'hivern, a la primavera i a principis de l'estiu en les zones amb climes temperats, tot i que causen infecció durant tot l'any ⁸⁰. La majoria dels nens han estat exposats a diversos tipus d'AdV quan comencen l'escola i pràcticament el 100% de les persones adultes han estat en contacte amb algun tipus d'AdV ⁸¹.

Mecanismes i rutes de transmissió

Els AdV són estables front agents físics i químics i condicions de pH adverses, el que els confereix una llarga supervivència fora de les cèl·lules hoste i gran potencial de propagació. També són capaços de sobreviure a la congelació amb una mínima pèrdua d'infectivitat. Aquestes característiques fa que tinguin una fàcil transmissió, especialment a les guarderies, col·legis, hospitals, campaments i centres militars ^{80, 81}.

Els AdV causants de gastroenteritis es transmeten via fecal-oral; els causants d'infecció respiratòria es transmeten principalment per aerosols o contacte amb superfícies contaminades i autoinoculació; i en el cas de la conjuntivitis, les principals vies de transmissió són l'aigua contaminada, sobretot en piscines, i a través de material oftalmològic contaminat. Els casos de transmissions neonatals, es donen per la infecció del nadó al passar pel canal vaginal en el moment del part. També s'han descrit infeccions en trasplantaments de fetge o ronyó ⁸¹.

Clínica i simptomatologia

Els diferents serotips que afecten als humans i les diferents malalties que causen es mostren a la taula 4.

Taula 4

Classificació dels adenovirus d'acord amb el perfil epidemiològic i clínic.

Grup	Serotip	Perfil epidemiològic i clínic
A	12, 18, 31	Infecció intestinal asimptomàtica en nens
	61	Gastroenteritis aguda
B	3, 7, 16, 50	Epidèmies en nens i adults joves. Faringitis i pneumònia de vegades greus (3 i 7)
	14, 21, 55	Epidèmies d'infecció respiratòria
	11, 34, 35	Cistitis hemorràgica i infecció renal asimptomàtica
C	1, 2, 5, 6, 57	Infecció endèmica en els nens petits. Adenofaringitis - adenitis mesentèrica - infecció latent del teixit limfoide
D	8, 9, 19, 37, 53, 54, 56	Queratoconjuntivitis epidèmica
	10, 13, 15, 17, 20, 22-30, 32, 33, 36, 38, 39, 42-49, 51, 63	Infecció asimptomàtica
	58	Infecció respiratòria en pacients amb VIH
	59	Infecció intestinal en pacients amb VIH
E	4	Brots esporàdics d'infecció respiratòria
F	40, 41	Brots de gastroenteritis en nens
G	52	Gastroenteritis aguda

Adaptada de Feghoul,⁸¹.

Els AdV causen infeccions variades, es donen sobretot a les vies respiratòries, als ulls, al tracte gastrointestinal i amb menys freqüència al tracte urinari i al fetge. En alguns casos també s'han descrit infeccions al pàncrees, el miocardi i al sistema nerviós central. En pacients immunocompetents, la majoria de les infeccions per AdV són subclíniques. La malaltia causada es defineix segons el tropisme que presenten les diferents espècies.

Els AdV del grup B (serotips 3, 7, 14, 16, 21, 50 i 55), C i E són els principals responsables de les infeccions respiratòries. Els del grup D causen principalment infeccions als ulls. Els del grup A, F i G causen principalment les gastroenteritis associades als AdV i els del grup B (serotips 11, 34 i 35) donar infeccions ronyó i tracte urinari. Encara que la majoria de les infeccions per AdV són benignes, poden ocórrer infeccions fatals, especialment en pacients immunodeprimits (veure taula 4).

En el cas de la infecció respiratòria, el temps d'incubació dura generalment entre 5 i 10 dies. Els pacients són contagiosos durant tota la fase simptomàtica, però poden seguir eliminant virus temps després de la infecció. Els símptomes més comuns són febre, congestió nasal, mal de gola i tos. Tot i que un 50% d'aquestes infeccions cursen de manera asimptomàtica, en nens, alguns casos es poden presentar complicacions amb quadres de tos no productiva que recordarien a la tos ferina.

Aquests virus prenen especial importància en el cas de la malaltia respiratòria aguda que ocorre en forma d'epidèmies entre els militars. Els símptomes es presenten com una faringitis febril (sovint incloent adenitis) amb símptomes de mal de coll i tos, de vegades rinitis aguda, mal de cap i mal de pit, símptomes que es poden confondre amb la faringitis estreptocòccia i la mononucleosis. Les complicacions amb pneumònia són poc freqüents. Els serotips principals causants d'aquesta malaltia són els AdV 4 i 7 ⁸¹.

Diagnòstic

L'aïllament del virus en cultiu cel·lular proporciona l'evidència més concloent d'infecció i ofereix l'oportunitat de determinar l'espècie. Tots els serotips d'AdV, excepte 40 i 41, s'aïllen fàcilment en cultius de cèl·lules d'origen humà, especialment A-549, Hep-2 i HeLa. La detecció d'antígens d'AdV, s'utilitza sobretot per al diagnòstic de les infeccions respiratòries i la gastroenteritis, tot i que al ser menys sensible que el cultiu, no està recomanada per al diagnòstic en pacients immunodeprimits. Les tècniques de PCR poden detectar tots els serotips, degut a que els encebadors es dirigeixen contra les regions conservades dels hexons ⁸¹.

Profilaxis i tractament

A causa de l'elevada prevalença de la malaltia respiratòria aguda en els reclutes militars, al 1970 l'exèrcit dels Estats Units va desenvolupar vacunes orals vives contra els serotips 4 i 7. Amb la introducció de la vacuna, es van reduir tan significativament la morbiditat i la mortalitat causada per aquests serotips, que al 1996 es va abandonar la producció considerant que ja no circulaven els serotips causants. No obstant, una re-aparició dels brots epidèmics va fer que al 2011 es desenvolupés una segona generació de la vacuna oral, dirigida a militars d'entre 17 i 50 anys. Actualment no hi ha vacuna disponible front les infeccions per AdV per a les poblacions no militars ⁸¹.

Les infeccions per AdV causen una resposta immune amb anticossos capaços de protegir contra reinfeccions d'un mateix serotip, i degut a que la majoria de les infeccions tenen caràcter lleu, el tractament es reserva generalment per a pacients immunodeprimits i en casos d'infeccions greus.

No existeix encara un antiviral específic per tractar les infeccions per AdV. La majoria de tractaments es basen en l'ús d'antivirals que s'utilitzen per altres infeccions, com la ribavirina, ganciclovir, vidarabina o el cidofovir. El cidofovir, un anàleg de la citosina amb alta afinitat per la DNA polimerasa vírica, és l'antivíric més actiu en estudis *in vitro*. Els estudis més recents s'enfoquen amb l'ús de profàrmacs que es transformen en cidofovir al metabolitzar-se i que permeten una administració oral ⁸¹.

BOCAPARVOVIRUS

Generalitats

Els bocaparvovirus (HBoV) pertanyen a la família *Parvoviridae* i al gènere *Bocaparvovirus* (veure taula 1). Infecta principalment a humans, gats i gossos, on en el cas dels humans tenen tropisme per les cèl·lules del tracte respiratori. Actualment, es coneixen com causants d'infeccions al tracte respiratori principalment en nens menors de 5 anys d'edat ^{82, 83}. Actualment es reconeixen dues espècies diferents: bocaparvovirus de primat 1 i 2.

Antecedents històrics

El HBoV es va descriure per primera vegada l'any 2005 a Suècia ⁸⁴. Es va aïllar, mitjançant mètodes moleculars, de mostres de moc nasofaringi obtingudes de nens amb infecció del tracte respiratori inferior. Actualment la seva detecció està inclosa en molts estudis d'infecció respiratòria degut a l'augment de l'ús de mètodes moleculars pel diagnòstic d'aquestes infeccions.

Estructura vírica

Es tracten de virus petits, sense embolcall, amb una nucleocàpsida isomètrica d'un diàmetre aproximat de 18 a 26 nm, que contenen una sola molècula de DNA de cadena senzilla, polaritat negativa i una longitud d'aproximadament 5,5 kilobases. El genoma viral codifica proteïnes estructurals i no

estructurals. Els gens de les proteïnes no estructurals representen regions conservades, mentre que els gens que codifiquen per proteïnes de la càpsida (CP) tenen una major variabilitat ⁸³.

Les proteïnes no estructurals són dues, les NS1 i NP-1, però es desconeix el seu paper exacte, tot i que es creu que la NS1 podria participar en la replicació del virus ⁸². Les proteïnes estructurals també són dues: les proteïnes virals 1 (VP1) i 2 (VP2), idèntiques en seqüència, i que només es diferencien en la regió final de la VP1, anomenada regió única de VP1 (VP1u). Aquesta regió té activitat fosfolipasa i és important per la infecció viral, ja que afavoreix l'entrada al nucli dins la cèl·lula hoste ^{82, 83}. L'activitat immunògena estaria determinada per les proteïnes VP1 i VP2 (veure figura 10).

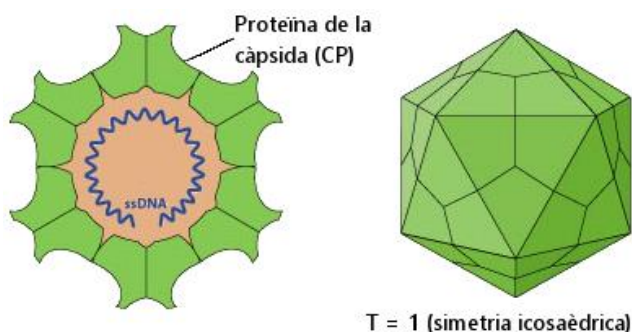


Figura 10

Estructura dels virions del gènere *Bocaparvovirus*, corresponent a l'estructura bàsica dels bocaparvovirus. Adaptat de *Viralzone*. (<http://viralzone.expasy.org/>).

La simetria és T=1. La càpsida icosaèdrica es compon de 12 capsòmers pentamèrics, amb un total de 60 proteïnes a la càpsida.

Es desconeix amb exactitud el procés de replicació dels HBoV. Els estudis realitzats amb animals suggereixen que aquests virus causen infecció a l'epiteli respiratori i a l'epiteli intestinal, així com als òrgans limfàtics ⁸².

Epidemiologia

Tenen distribució universal, s'ha detectat a països d'Europa, Àsia, Oceania i Amèrica. Mostren una distribució estacional principalment durant l'hivern i primavera. No obstant, la veritable incidència i estacionalitat encara són desconegudes ⁸³. La prevalença de la infecció respiratòria per HBoV varia de 2,7 a 19%, principalment en nens menors de 2 anys d'edat ⁸³. Els casos d'infecció primària, es donen normalment en lactants i nens menors de 5 anys. Els HBoV també s'han detectat en persones asimptomàtiques, nens i adults, tant en el tracte respiratori com el en tracte gastrointestinal ^{82, 83}.

Mecanismes i rutes de transmissió

Els principals estudis realitzats han demostrat la presència de HBoV en mostres del tracte respiratori, en mostres fecals, en mostres sanguínies i urinàries ⁸³. Es desconeixen les vies reals de transmissió dels HBoV. Segons els llocs on es replica el virus, es creu que les vies de contagi principals serien la transmissió aèria per aerosols, la transmissió per contacte amb superfícies contaminades i autoinoculació, i la transmissió fecal-oral ⁸².

Clínica i simptomatologia

Es desconeix el període d'incubació del virus. En el cas de la malaltia respiratòria, els símptomes es presenten com una infecció del tracte respiratori superior amb tos, febre, conjuntivitis, rinitis aguda, faringitis, laringitis i otitis; o com una infecció del tracte respiratori inferior amb símptomes de pneumònia, obstrucció bronquial, bronquiolitis i tos. En pacients asmàtics podria causar descompensació ⁸³.

Degut a que en molts estudis es va detectar el HBoV amb un alt percentatge de coinfecció amb altres virus respiratoris i amb algunes bactèries, inicialment es va replantejar el seu rol com a veritable causant d'una infecció. Actualment, en estudis més recents, s'ha determinat que les infeccions agudes per HBoV estan associades amb la presència del DNA viral en sang, i que per tant el seu diagnòstic no ha de ser únicament per la PCR en mostres respiratòries, sinó que s'hauria d'acompanyar d'una prova serològica ^{83, 85}.

Diagnòstic

La detecció dels HBoV es realitza amb mètodes moleculars, ja que les línies cel·lulars habituals no permeten la seva multiplicació. A més fins al moment no s'han desenvolupat tècniques per la detecció d'antígens d'aquests virus ⁸².

Profilaxis i tractament

Actualment no hi ha cap vacuna disponible, ni s'han descrit antivirals actius front les infeccions per HBoV ⁷.

CORONAVIRUS

Generalitats

Els coronavirus (HCoV) pertanyen a la família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae* (veure taula 1). Es tracta d'un grup de virus grans que poden causar diferents malalties en l'esser humà, des d'un refredat comú fins a malalties més greus. També poden causar diferents malalties en animals, com gastroenteritis, alteracions hepàtiques i neurològiques. Actualment es coneixen 6 tipus de coronavirus humans, diferenciats en dos gèneres, el gènere *Alphacoronavirus* amb els HCoV-229E i els HCoV-NL63; i el gènere *Betacoronavirus* amb els HCoV-HKU1, els SARS-CoV, el betacoronavirus 1 (antiga soca HCoV-OC43) i el MERS-CoV.

Antecedents històrics

Els primers coronavirus humans, HCoV-OC43 i HCoV-229E, es van identificar a mitjans de la dècada de 1960 a Gran Bretanya i Estats Units, respectivament, com causa de infecció del tracte respiratori superior autolimitada i lleu ⁴⁵.

Al 2003 es va identificar una infecció zoonòtica a Hong Kong i la Xina, la qual es va propagar posteriorment entre humans, creant una pandèmia que es va estendre a diversos països, es va anomenar síndrome respiratòria aguda greu (SARS, per les seves sigles en anglès *Severe Acute Respiratory Syndrome*), i estava causada per un coronavirus que es va anomenar SARS-CoV ²³.

El HCoV-NL63, va ser descobert l'any 2004 als Països Baixos a partir d'unes mostres provinents d'un nen de 7 mesos d'edat, que presentava símptomes de bronquiolitis i conjuntivitis. La seqüenciació del genoma del virus va indicar que no era una recombinació i que era genèticament diferent als altres HCoV coneguts ⁸⁶. El HCoV-HKU1, també es va descobrir l'any 2004 a Hong Kong, a partir de mostres respiratòries obtingudes d'un pacient de 71 anys d'edat amb pneumònia. Es va determinar com un nou HCoV, el qual presentava tres genotips diferents, A, B, i C. D'aquests, els genotips A i B són més freqüents que el C ⁸⁷.

Finalment, al 2012 va aparèixer una nova malaltia respiratòria greu a l'Àrab Saudita, la qual també es va estendre a altres països, causant diverses morts i interès internacional per part de la OMS. Es va

anomenar síndrome respiratòria d'orient mig (MERS) i estava causada per un nou HCoV del gènere *Betacoronavirus*, el MERS-CoV ⁸⁸.

Estructura vírica

Tots els HCoV comparteixen estructura. Es tracta de virus embolcallats amb un genoma format per una cadena simple de RNA, de polaritat positiva i simetria helicoidal. Tenen un diàmetre aproximat de 80-100nm, i són els virus de RNA més grans que es coneixen. L'embolcall deriva de les membranes intracel·lulars en comptes de la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste. El genoma té una mida aproximada de 27-32 kilobases, i és precisament la gran mida d'aquest genoma la que afavoreix una elevada taxa de mutacions.

El genoma de tots els HCoV codifica 4 proteïnes estructurals grans, la proteïna espicular (S) responsable de la unió a les cèl·lules diana, la proteïna de membrana (M) que contribueix a la unió de la nucleocàpsida a les membranes interiors de la cèl·lula hoste, la proteïna d'embolcall (E) que forma part de la membrana vírica, i la proteïna de la nucleocàpsida (N) on s'uneix el genoma víric. En alguns HCoV també s'ha trobat un domini addicional que codifica una proteïna anomenada hemaglutinina-esterasa (HE), implicada en l'alliberació dels virions de dins la cèl·lula hoste on s'han replicat (veure figura 11) ⁸⁹.

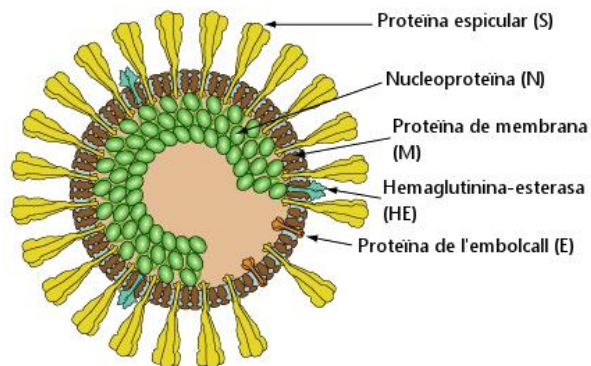


Figura 11

Estructura dels virions de la subfamília *Coronavirinae*, a la qual pertanyen els coronavirus. Adaptat de Viralzone. (<http://viralzone.expasy.org/>)

La proteïna S és l'encarregada de la unió del virus als receptors cel·lulars. Els HCoV s'uneixen a diferents receptors cel·lulars i es classifiquen en diferents grups segons quin utilitzen. Els del grup 1, com el HCoV-OC43, utilitzen l'aminopeptidasa (APN o CD13); els del grup 2, com el SARS-CoV, utilitzen el receptor ACE-2 (per les seves sigles en anglès: *Angiotensin Converting Enzyme*); i els del grup 3 encara se'n desconeix el receptor (veure figura 11).

Epidemiologia

Les infeccions per HCoV-OC43 i 229E són més comuns durant els mesos d'hivern i tenen distribució universal. No es tracta d'infeccions constants, ja que poden ocórrer en intervals de 3 a 4 anys. En el cas dels HCoV-NL63, s'ha trobat arreu del món i les infeccions que causa ocorren predominantment durant els mesos d'hivern en climes temperats, amb un pic al novembre, mentre que en els climes tropicals i subtropicals, les infeccions es produïrien durant la primavera o l'estiu. Per últim, el HCoV-HKU1 també té distribució universal, i els estudis revelen que causa infeccions durant tots els mesos de l'any excepte al juliol, amb un pic al desembre. No obstant, no causa infeccions cada any, pel que es creu que té variació temporal i geogràfica ⁴⁵.

Mecanismes i rutes de transmissió

Els HCoV es propaguen presumiblement per via respiratòria, a través d'aerosols. Els HCoV normalment només infecten a membres d'una mateixa espècie, no obstant, alguns HCoV animals són capaços d'infectar humans donant lloc a epidèmies arreu del món.

Clínica i simptomatologia

Els HCoV-229E i OC43, causen infecció del tracte respiratori superior autolimitada i lleu, amb una gran varietat de signes i símptomes que inclouen tos, secreció nasal, mal de coll i febre. El període d'incubació és d'uns 3 dies i els símptomes poden durar fins a una setmana. Tot i que les infeccions són generalment locals, es pot arribar a disseminar causant infeccions d'oida, bronquiolitis i pneumònies en pacients immunodeprimits i nadons, i causar també infeccions nosocomials entre el personal hospitalari. Són els causants d'aproximadament un terç dels refredats comuns i en general, el 50% de les persones que s'infecten presenten símptomes ⁴⁵.

Els HCoV-NL63 causen també malaltia respiratòria lleu, encara que alguns estudis el relacionen com a causa de crup. El període d'incubació és semblant als altres HCoV així com el període d'excreció del virus. Aquests HCoV es solen trobar en coinfecció amb altres virus respiratoris. Aquestes coinfeccions són especialment importants en els pacients hospitalitzats ja que poden causar una malaltia més greu i amb un curs més llarg. En el cas dels HCoV-HUK1 els símptomes més freqüents que causen són rinorrea,

tos i febre. Poden arribar a causar bronquiolitis, pneumònia i exacerbacions asmàtiques en nens i adults immunodeprimits ⁴⁵.

Altres coronavirus

SARS-CoV. A finals del 2002, es va observar una nova síndrome al sud de la Xina, i es va denominar *síndrome respiratòria aguda greu* (SARS), la qual es caracteritzava per febre de més de 38°C, mal de cap, malestar general, i dolors. Els símptomes respiratoris inicials són lleus durant uns dies on el pacient desenvolupa una tos no productiva i respiració dificultosa. La dificultat respiratòria pot causar la mort en un 3-30% dels casos. La infecció és una zoonosi que afecta a rats penats i humans, la qual va evolucionar de manera molt eficient en la transmissió humà-humà, causant una pandèmia que es va estendre a 26 països en quatre setmanes. El primer brot de SARS-CoV va ser a l'abril 2003 i va durar fins l'agost del mateix any, i durant aquest temps, va causar gairebé 8.000 casos a nivell mundial i 775 morts. Des de llavors, només s'han registrat un petit nombre de casos produïts per accidents de laboratori o, possiblement, per transmissió de l'animal a l'home a la Xina ^{23, 90}.

MERS-CoV. Els primers casos de *síndrome respiratòria d'orient mig* (MERS) es van detectar l'any 2012 a la península aràbiga. Es tracta d'una malaltia respiratòria nova en humans. Els símptomes principals són febre, tos i dificultat per respirar. A més dels símptomes propis de la infecció del tracte respiratori inferior greu, també es poden donar signes i símptomes gastrointestinals com diarrea, vòmits i dolor abdominal. La infecció és per zoonosi a través dels rats penats, la qual hauria arribat fins als humans a través de la infecció directa o per la infecció de camells. Des de que es va reportar per primera vegada, el MERS-CoV ha causat malaltia greu, inclosa la mort, en diferents països del món, sobretot després de la propagació a Estats Units i diferents països d'Europa. No obstant, es creu que les morts causades es deuen a que aproximadament el 75% dels pacients infectats tenien almenys una malaltia subjacent ^{88, 91}.

Diagnòstic

Els únics HCoV humans que s'han pogut aïllar fins al moment en cultiu cel·lular han estat els HCoV-229E i el OC43, ja que la majoria de HCoV no es multipliquen en els cultius cel·lulars disponibles. Així mateix, la detecció d'antigen s'ha descrit per a la identificació dels HCoV-229E i el OC43, el SARS-CoV i

el HCoV-HKU1, però no està disponible per la resta de HCoV. Actualment, els mètodes moleculars són els més adequats per detectar els diferents HCoV existents ²³.

Profilaxis i tractament

Actualment no hi ha cap vacuna disponible, ni s'han descrit antivirals actius front les infeccions per causades pels HCoV. No obstant això, degut a l'aparició del SARS-CoV i posteriorment del MERS-CoV, van augmentar el nombre d'estudis dedicats a la investigació d'antivirals específics per aquest grup de virus. Aquestes investigacions es van centrar sobretot en tractar la malaltia, utilitzant antivirals com la ribavirina, el lopinavir (un inhibidor de la proteasa principal que utilitza el virus per processar les seves proteïnes virals) i també l'oseltamivir, entre d'altres ^{7,92}.

D'altra banda s'han realitzat estudis prometedors amb inhibidors de la unió i la fusió del virus i també d'altres que combinen els diferents interferons amb ribavirina, però els resultats obtinguts varien segons si els estudis són *in vitro* o *in vivo* ⁷.

ALTRES VIRUS CAUSANTS DE MALALTIA RESPIRATÒRIA

A banda dels virus respiratoris principals, existeixen també altres virus que no es consideren estrictament virus respiratoris però que poden causar patologia al tracte respiratori. És el cas de l'herpesvirus humà 1 (virus herpes tipus 1); l'herpesvirus humà 3 (virus varicel·la-zòster); l'herpesvirus humà 5 (citomegalovirus), l'herpesvirus humà 4 (virus Epstein Barr), el virus del xarampió, el virus de les galteres, els hantavirus i els parechovirus humans. D'altra banda, altres virus com els mimivirus, els poliomavirus KI i WU s'han relacionat recentment, mitjançant les tècniques moleculars, amb mostres respiratòries de pacients amb quadre clínic d'infecció respiratòria, tot i que fins ara no s'ha establert el seu paper com a agents causals de malaltia respiratòria de manera definitiva ^{2,4}.

Herpesvirus humà tipus 1. El virus herpes tipus 1 (HHV-1) es transmet per gotes respiratòries i per contacte directe. La primoinfecció sol cursar de manera asimptomàtica, no obstant pot causar faringoamigdalitis i/o gingivoestomatitis herpètica, les quals poden arribar a causar febres altes. Aquests virus romanen latents a les neurones sensorials (ganglis) i poden produir reactivacions al llarg de tota la vida ^{93,94}.

Herpesvirus humà tipus 3. El virus varicel·la-zòster o virus de l'herpes humà tipus 3 (HHV-3), es coneix com a varicel·la en la infecció primària, una malaltia infantil molt comú que cursa amb exantema vesicular i és generalment lleu i autolimitada. La infecció es torna més greu en els adults, nadons i pacients immunodeprimits. El zòster, "herpes zòster", és la manifestació clínica de la reactivació del HHV-3 latent. Aquest virus es transmet per contacte directe o a través de gotetes, i també per transmissió aèria quan el títol víric és molt elevat, sobretot en col·legis ^{95, 96}. Aquests virus romanen latents i poden produir reactivacions al llarg de tota la vida.

Herpesvirus humà tipus 4. El virus de l'Epstein Barr pertany a la família *Herpesviridae*, i es coneix com a virus herpes tipus 4 (HHV-4). Aquest virus es troba present a la saliva, i el contagi es produeix a per intercanvi de saliva (petons, gots, coberts). Es tracta del principal causant de la malaltia coneguda com a mononucleosi infecciosa, que es caracteritza per febre, fatiga prolongada, limfocitosis, esplenomegàlia i amigdalitis i faringitis, entre d'altres símptomes. Després de la primoinfecció, el virus estableix una latència de per vida ^{97, 98}.

Herpesvirus humà tipus 5. Els citomegalovirus pertanyen a la família *Herpesviridae*, i es tracta del virus herpes tipus 5 (HHV-5). La infecció pot ser asimptomàtica, o causar, malaltia generalitzada greu. La infecció per HHV-5 pot produir un quadre de mononucleosi, més lleu que el produït pel herpesvirus 4, i en pacients immunodeprimits pot causar pneumònia i malaltia disseminada. Es transmet per secrecions respiratòries, i la infecció es produeix per contacte directe, estret i prolongat ^{99, 100}. Aquests virus romanen latents i poden produir reactivacions al llarg de tota la vida.

Hantavirus. Els Hantavirus pertanyen a la família *Bunyaviridae*, gènere *Hantavirus*. Es tracta d'un gènere que agrupa diversos virus RNA. La infecció per aquests virus es transmet a l'ésser humà a través de rosegadors infectats. En humans generalment produeixen dos tipus d'afeccions: la febre hemorràgica amb síndrome renal, o la síndrome pulmonar per hantavirus, una afecció pulmonar molt greu que es caracteritza per febre alta, miàlgies, mal de cap, tos, dificultat respiratòria aguda i també nàusees i vòmits ^{101, 102}.

Virus del xarampió. El virus del xarampió pertany a la família *Paramyxoviridae*, gènere *Morbillivirus*. El virus del xarampió es transmet a partir de les secrecions respiratòries per via aèria o per contacte directe. El xarampió és una malaltia altament contagiosa i de gravetat relativa. El símptoma principal és un exantema, però també sol produir febre, malestar general, rinitis aguda, tos i conjuntivitis. Les

complicacions més comunes solen afectar al tracte respiratori i poden ser causants d'otitis mitjana, crup i pneumònia ^{103, 104}.

Virus de les galteres. El virus de les galteres pertany a la família *Paramyxoviridae*, gènere *Rubulavirus*. La malaltia causada per aquests virus es coneix com galteres (parotiditis), una malaltia altament contagiosa i autolimitada, on els símptomes principals són febre, dolor muscular, mal de cap, cansament i sobretot una inflamació dolorosa de les glàndules salivals. La infecció es produeix a través de la inhalació d'aerosols que continguin el virus ^{105, 106}.

Parechovirus. Són virus que s'inclouen dintre la família *Picornaviridae*, gènere *Parechovirus*, on s'agrupen els parechovirus humans (HPEV) del 1 al 16. Els parechovirus estaven classificats anteriorment com a membres del gènere *Enterovirus* (els echovirus 22 i 23), ja que causaven un efecte citopàtic molt similar en cultiu cel·lular. Posteriorment amb estudis filogenètics es van classificar en un gènere propi. Aquests virus tenen una distribució universal i estan associats a malalties semblants a les causades per EV tals com malalties respiratòries, meningitis asèptica, encefalitis i síndromes similar a la sèpsia neonatal ¹⁰⁷.

Mimivirus. Els mimivirus pertanyen a la família *Mimiviridae*, gènere *Mimivirus*. Es tracta d'uns virus de grans dimensions amb DNA de doble cadena. Es va descobrir al 1992 mentre s'estudiava la legionel·losis i es va identificar posteriorment al 2003. Inicialment es va confondre amb una bactèria, ja que "imitava" (en anglès *mimic*) les tincions de gram positius, d'on en deriva el nom. Actualment s'està investigant sobre el seu paper en quadres greus de malaltia pulmonar, tot i que les publicacions són contradictòries ¹⁰⁸.

Poliomavirus. Pertanyen a la família *Polyomaviridae*, gènere *Polyomavirus*. Actualment s'ha descobert els poliomavirus WU i KI en les vies respiratòries, sèrum i femta de nens, tant immunocompetents com immunodeprimits, i en adults. Aquests virus s'han detectat per diversos estudis moleculars en mostres de nens amb infecció de les vies respiratòries i en nens asimptomàtics. Es requereixen estudis addicionals per determinar el seu veritable paper patogènic ²³.

DIAGNÒSTIC ETIOLÒGIC

El principal objectiu dels mètodes de diagnòstic microbiològic per la detecció dels virus respiratoris és determinar l'agent etiològic causal de la infecció. El diagnòstic etiològic és imprescindible per establir un tractament específic amb antivirals, així com reduir l'administració de tractaments antibacterians innecessaris, establir el pronòstic i limitar l'extensió de la infecció ^{4,44}.

Actualment, existeixen una gran varietat de tècniques microbiològiques de diagnòstic que permeten la detecció de la majoria de virus respiratoris. Cada laboratori s'ha d'adaptar a les necessitats pròpies i determinar quins són els mètodes més apropiats per al diagnòstic basant-se en el tipus d'hospital, les característiques de la població que atén, la dotació de personal i la seva pròpia infraestructura ⁶.

Els mètodes de diagnòstic per a la infecció respiratòria vírica són l'aïllament en cultiu cel·lular, la detecció d'antígens, la detecció d'àcids nucleics i la serologia. No obstant, el diagnòstic serològic és poc útil ja que les infeccions respiratòries virals són molt prevalents, ocasionen freqüents reinfeccions i només fan afectació local, fonamentalment a la mucosa respiratòria ⁶ amb poca resposta serològica i per tant, no s'inclouen en aquest capítol.

MOSTRES: TIPUS, RECOLLIDA I TRANSPORT

Un dels aspectes més importants del diagnòstic virològic és l'obtenció de la mostra, el seu transport al laboratori i el seu processament. Un diagnòstic pot ser erroni si no es treballa en les condicions òptimes i no es compleixen els protocols establerts per l'obtenció i transport adequat de les mostres al laboratori. La qualitat de la mostra, és a dir que s'hagi obtingut adequadament, és cabdal a l'hora de la interpretació del resultat.

La majoria de virus s'eliminen durant un període curt de temps, corresponent amb la fase aguda de la infecció. És durant aquest espai de temps quan és òptima la recollida de mostres, ja que l'excreció de partícules virals disminueix progressivament amb el pas dels dies ⁴.

El principal requisit necessari a l'hora de valorar les mostres obtingudes a partir del tracte respiratori és que aquestes continguin el major número possible de cèl·lules per assegurar una elevada càrrega viral. Existeixen diferents tipus de mostres útils per al diagnòstic virològic. Les mostres d'aspirat nasofaríngi

són adequades per tots els virus i són òptimes per la detecció dels virus gripals, el RSV, els PIV i el RV. Els exsudats nasals i faringis són òptims per a la detecció dels AdV i els EV. En el cas de les rentades broncoalveolars, serveixen per les infeccions del tracte respiratori inferior. També són útils les biòpsies pulmonars obtingudes en una necròpsia per determinar la causa d'una mort ^{4, 6}.

El transport de les mostres al laboratori s'ha de fer en un termini d'entre 24 i 48 hores a una temperatura d'entre 2 i 8°C, però mai congelar, per tal de garantir la màxima viabilitat de les partícules víriques. La raó ve donada pel fet que alguns virus són làbils a temperatura ambient i que la congelació i descongelació provoca una disminució considerable del nombre de partícules infeccioses. Així mateix, sempre que sigui possible, és recomanable l'ús d'un medi de transport adequat que estabilitzi la mostra. Una conservació inadequada de la mostra o un retard en el seu processament, repercuteix negativament en el diagnòstic i en l'obtenció de resultats ⁶.

TÈCNiques DE DETECCIÓ D'ANTIGEN

La detecció d'antígens virals es va introduir en la dècada de 1970 i va proporcionar als laboratoris de virologia una alternativa a l'aïllament dels virus en cultiu cel·lular.

Les tècniques de detecció d'antigen són tècniques immunològiques que es fonamenten en l'afinitat antigen-anticòs. Definim antigen com aquella molècula estructural o metabòlica que és reconeguda com estranya per l'organisme humà i que és capaç de desencadenar una resposta immunitària. D'altra banda, un anticòs és una gammaglobulina sintetitzada per les cèl·lules plasmàtiques en resposta a l'estimulació exercida per un antigen, amb el qual reacciona de manera específica, gràcies a la correspondència entre les seves estructures. Existeixen diferents mètodes de diagnòstics basats en aquesta reacció antigen-anticòs: la immunofluorescència (IF), la immunocromatografia (IC) o l'enzimoinmunoanàlisi (EIA).

Es tracta principalment de tècniques ràpides que permeten la detecció de virus respiratoris en pocs minuts. Aquestes tècniques tenen un elevat rendiment en mostres pediàtriques, ja que aquestes pacients solen tenir una càrrega vírica més elevada i durant un període de temps més llarg que els adults ^{4, 44}.

Aquestes tècniques permeten detectar l'antigen víric independentment que formi part de virus viables o no viables, i per tant no necessiten de partícules víriques amb capacitat infecciosa. Aquestes tècniques no han arribat a sensibilitats i especificitats equiparables al cultiu ⁶. Així mateix, generalment mostren una menor sensibilitat respecte als mètodes moleculars, però permeten un diagnòstic més ràpid, senzill i econòmic ⁴.

Immunofluorescència

Les tècniques d'immunofluorescència proporcionen un mitjà de diagnòstic basat en una reacció antigen-anticòs observable per un microscopi de fluorescència. Atributs com l'especificitat i el poc temps que requereix per preparar i observar la mostra, fan de la immunofluorescència una eina de diagnòstic ideal per infeccions virals de gran importància per a la salut pública, com és el cas de les causades per FLUAV o per RSV, entre d'altres ¹⁰⁹. Aquestes tècniques tenen l'avantatge que permeten avaluar la qualitat de la mostra, ja que aquesta es veu reflectida en el número de cèl·lules de l'epiteli respiratori que es poden observar.

Aquesta tècnica pot ser directa (IFD) o indirecta (IFI). La immunofluorescència directa utilitza l'anticòs marcat amb fluoresceïna (fluorocrom) i requereix d'un temps màxim de 45 minuts; mentre que la immunofluorescència indirecta l'anticòs no està marcat directament i en un segon pas s'utilitza un segon anticòs contra el primari marcat amb fluoresceïna i requereix d'un temps aproximat de 90 minuts per emetre un resultat vàlid ¹¹⁰.

Es tracta d'una tècnica amb una elevada especificitat i sensibilitat, tot i que el rendiment depèn del virus detectat, del tipus de mostra, l'edat del pacient i el temps en el que es va recollir la mostra un cop van començar els primers símptomes ⁴⁴. En el cas del RSV, la sensibilitat va del 84 al 99%, pel FLUAV s'estima entre un 62 i un 99%; per al FLUBV entre 66 i 87%; per als virus PIV (tipus 1 a 3) entre 63 i 72%; per l'AdV entre 51 i 58% ⁴⁴ i per últim per el hMPV entre 69 i 80% ⁷⁰. Per tal que la tècnica sigui sensible i específica, s'ha de realitzar juntament amb controls de qualitat dels reactius.

Els diferents reactius per la immunofluorescència actualment disponibles tenen un baix cost. No obstant, la realització d'aquesta tècnica necessita d'un microscopi de fluorescència i d'un personal amb la formació adequada per poder interpretar els resultats. Un desavantatge important seria que no està

disponible per a altres virus que també són causa important de malaltia respiratòria, com els RV i EV, HBoV, HCoV (229E, OC43, NL63iHku-1) i PIV-4 ⁴.

Immunocromatografia

Les tècniques d'immunocromatografia s'apliquen sobretot per a la detecció del RSV i els virus gripals, són fàcils de realitzar i no requereixen personal especialment entrenat.

La tècnica es realitza en un suport de nitrocel·lulosa o niló on es troben absorbits a la línia de reacció anticossos en front a l'antigen que es busca i sobre la línia control els anticossos anti-conjugat, de manera que quan la mostra conté l'antigen, aquest flueix per la membrana quedant retintut a la línia de reacció. El conjugat, que també és un anticòs específic enfront l'antigen que es busca, està marcat amb una molècula, normalment or col·loidal, que també flueix per la membrana, és retintut per l'antigen a la línia de reacció i per l'anticòs a la línia de control. En cas de mostres negatives que no continguin antigen, el conjugat és retintut únicament a la línia de control ¹¹¹.

Aquestes tècniques tenen l'avantatge addicional de poder realitzar una lectura visual dels resultats sense necessitat d'instrumental i ofereixen resultats ràpids (aproximadament 15-20 min). No obstant això, tenen una sensibilitat més baixa que les tècniques d'immunofluorescència. En el cas del RSV, la sensibilitat és d'aproximadament el 90% ¹¹²; i en el cas dels virus gripals, la sensibilitat varia des del 50 fins al 90% ^{113, 114}. En general, es tracta de mètodes especialment útils en èpoques de brots epidèmics i en població pediàtrica, on només els resultats negatius requeririen d'un segon anàlisi mitjançant alguna altra prova ^{112, 115}.

Enzimoimmunoanàlisi

Les tècniques d'enzimoimmunoanàlisi es basen en l'existència de substàncies químiques (substrats) que per acció d'un enzim són transformades en un producte amb color que emet llum o fluorescència mesurable. Algunes proves d'EIA per a la detecció d'antigen es troben disponibles comercialment en formats molt pràctics. Els anticossos es troben fixats a una petita membrana nitrocel·lulosa o en micropouets amb diversos nivells d'automatització.

En les infeccions respiratòries s'aplica principalment per al diagnòstic del RSV i els virus gripals. En general, la sensibilitat de la tècnica EIA s'ha estimat en un 95% pel RSV ¹¹⁶ i entre un 39 i un 76% per

als virus de la grip ¹¹⁷. No obstant això, els resultats d'especificitat solen ser bastant alts durant l'època de màxima circulació del RSV o dels virus gripals, per aquesta raó els resultats positius poden donar-se com veritables positius, mentre que els negatius requeririen d'un segon anàlisi mitjançant alguna altra prova ⁴⁴.

Aquesta prova es pot realitzar en 10-20 minuts, amb una manipulació senzilla ja que es tracta d'una tècnica amb una metodologia homogènia que evita la complexitat de l'examen directe i del cultiu cel·lular. No obstant això, són tècniques que requereixen fer diferents manipulacions durant la seva execució i no permeten avaluar la qualitat de la mostra, a diferència del que succeeix amb la IF ⁶.

TÈCNiques D'ÀILLAMENT VÍRIC

L'àïllament es realitza habitualment en cultius cel·lulars. Aquesta tècnica ha estat durant molts anys la tècnica de referència per al diagnòstic de les infeccions respiratòries víriques. Es tracta d'un sistema que, en principi, hauria de permetre detectar la gran majoria dels virus respiratoris, mentre que altres tècniques van dirigides front un virus concret i prèviament identificat. Mitjançant el cultiu cel·lular es pot confirmar la viabilitat i la infectivitat d'un virus, informació que no es pot obtenir amb cap altre sistema de diagnòstic. A més, es tracta d'un mètode amb el que es pot disposar d'una soca viable de virus que permeti realitzar estudis de caracterització antigènica, sensibilitat a antivirals, serotipificació i estudis epidemiològics, entre d'altres ^{4,44}.

Les diferents tècniques d'àïllament víric es detallen a continuació.

Cultiu en ous de gallina embrionats.

Vora els anys 1930, s'utilitzaven els ous de gallina embrionats per l'àïllament de diferents virus. Al 1935 concretament, es va aïllar per primera vegada un virus gripal utilitzant aquest mètode. Posteriorment, al 1940, els ous de gallina embrionats es van consolidar com una de les tècniques d'àïllament de virus.

Aquesta tècnica presentava avantatges considerables front als sistemes d'animals que s'havien utilitzat fins llavors (conills, conillets d'índies, ratolins): es tractava d'un mitjà viu molt sensible a una gran varietat de virus, era un sistema tancat i teòricament estèril, i era un sistema més barat que es podia obtenir fàcilment en grans quantitats.

La inoculació es podia realitzar per diverses rutes que variaven en quant a grau de sensibilitat i d'adaptació pels diferents virus respiratoris. En el cas dels virus gripals, la inoculació intra-amniòtica en embrions de 8-9 dies d'incubació era el mètode més indicat, ja que era el més sensible. Mitjançant aquest mètode, es podia recuperar al voltant de 1,5 ml de líquid amniòtic per ou per a la identificació posterior. Com a alternativa, es podia inocular mitjançant la ruta de l'al-lantoide en embrions de 11 dies d'incubació, donat que era més fàcil i es podia recuperar més fluid (6 a 10 ml per ou) ¹¹⁸.

Un cop finalitzada la incubació, es podia confirmar l'aïllament víric utilitzant les mateixes tècniques que es fan servir per a la detecció d'antígens virals. La detecció virus també es podia realitzar examinant l'activitat hemaglutinant del líquid amniòtic o al-lantoide infectat ^{118, 119}.

L'aïllament en ous d'embrions de gallines, va estar durant molt temps el mètode de referència per als virus gripals, en especial pel FLUAV ¹¹⁹, i la seva aplicació també permetia l'aïllament d'altres virus respiratoris com els virus parainfluença, en particular el PIV-3 ¹¹⁸.

Cultiu cel·lular convencional

El descobriment l'any 1949 de que les cèl·lules humanes podien ser propagades *in vitro* va proporcionar als viròlegs una alternativa als ous de gallina embrionats i als animals de laboratori per a l'aïllament dels virus. Els tipus de cèl·lules que poden ser cultivades en flascons i tubs d'assaig són moltes, proporcionant així hostes vius els quals molts virus són capaços d'infectar. Són per tant, una eina més assequible econòmicament i de millor manteniment que els ous i els animals, i mitjançant un examen microscòpic es pot controlar la multiplicació viral. L'aïllament del virus en cultius cel·lulars es considera el *gold standard* de la detecció vírica i és el mètode principal amb el qual tots els altres s'han comparat ⁴⁴.

El cultiu cel·lular es prepara normalment en tubs de 16 per 125 mm de vidre o de plàstic, amb tap de rosca i de fons rodó, on la monocapa de cèl·lules està adherida en un costat del tub. Els diferents cultius cel·lulars existents poden provenir de cèl·lules primàries, cèl·lules diploides o cèl·lules poliploides. Els cultius més típics utilitzats són cèl·lules primàries de ronyó de mico rhesus (LLC-MK2), cèl·lules primàries de ronyó de conill (PRK), fibroblasts de pulmó embrionari humà (MRC-5), cèl·lules de carcinoma de laringe humà (Hep-2), cèl·lules de carcinoma de pulmó humà (A-549), cèl·lules de rabdomiosarcoma

embrionari humà (RD), cèl·lules epitelials de ronyó de gos Madin-Darby (MDCK), cèl·lules de ronyó de mico (PMK), entre d'altres.

La multiplicació vírica es mostra com uns canvis degeneratius en les cèl·lules de la monocapa dies després de la seva inoculació. Aquests canvis es denominen efecte citopàtic (ECP). La majoria dels virus respiratoris causen un ECP després de 5 a 10 dies d'incubació. Per tal d'observar l'ECP és essencial un equip de professionals experimentats. Posteriorment, la identificació definitiva del virus aïllat es pot realitzar mitjançant diferents mètodes, com són la inhibició de l'hemaglutinació, la immunofluorescència o la detecció de l'activitat neuraminidasa ⁴.

Un de les principals avantatges del cultiu cel·lular convencional és la capacitat de poder disposar de la soca per altres estudis addicionals, com proves de sensibilitat a antivirals, serotipificació o estudis epidemiològics. També proporciona informació sobre la viabilitat del propi virus ⁴⁴.

No obstant això, la necessitat d'experiència tècnica en l'avaluació dels cultius, el període d'incubació i la incapacitat d'alguns virus de proliferar en els cultius cel·lulars tradicionals, suposen les desavantatges principals d'aquest sistema ^{4, 44}.

Shell-Vial

Per tal de resoldre en part els inconvenients en quant a temps d'observació de l'ECP en el cultiu convencional, es va desenvolupar la tècnica de shell-vial (SV) que, sense perdre l'especificitat i les avantatges del cultiu, permet un diagnòstic en un temps molt menor i es poden detectar la presència dels antígens virals per IF abans de l'aparició de l'ECP.

En aquesta tècnica la mostra s'inocula en una monocapa formada sobre un portaobjectes rodó, el qual es diposita en un tub de fons pla ⁴⁴. Seguidament es fa una centrifugació per facilitar la infecció de les cèl·lules. Després d'un període d'incubació de 18-48h, s'extreu el portaobjectes i normalment es realitza una IF sobre la monocapa amb anticossos monoclonals front als antígens del virus que es vulgui detectar.

En aquesta tècnica, els vials inoculats ocupen menys espai en les incubadores i no necessiten incubar-se amb rotació a diferència del cultiu convencional. El cost d'ambdós cultius és el mateix, no obstant la possibilitat de contaminació creuada és menor en el SV que en els tubs convencionals.

Co-cultius cel·lulars

Donat la necessitat d'utilitzar diverses línies cel·lulars per poder aïllar tots els virus respiratoris possibles, es van desenvolupar els co-cultius, on es combinen diferents línies cel·lulars sobre un mateix portaobjectes com una sola monocapa i sobre la que s'apliquen diversos anticossos monoclonals, cadascun marcat amb un fluorocrom diferent, per identificar diferents virus en un sol tub ^{6,44}.

Actualment, existeixen diverses línies de co-cultius cel·lulars produïdes comercialment, com són el cultiu cel·lular ràpid *R-Mix (Diagnostic Hybrids, Inc.)*, format per una monocapa mixta de cèl·lules d'adenocarcinoma humà (A-549) i cèl·lules de pulmó de visó (Mv1Lu); i cultiu cel·lular ràpid *R-Mix Too (Diagnostic Hybrids, Inc)*, format per una monocapa mixta de cèl·lules A-549 i cèl·lules MDCK. Aquests co-cultius permeten la detecció de diferents virus respiratoris com són els virus gripals A i B, els PIV 1, 2 i 3, els AdV i el RSV.

Per a realitzar la tècnica, s'inoculen tres flascons de co-cultius per a cada mostra clínica. Seguidament es centrifuguen els vials i es posen a incubar a 37°C amb un 5% de CO₂. Després de 18 a 24 hores d'incubació, en un dels vials es fa una IF per detectar la presència o no d'antígens virals dels diferents virus respiratoris. Si s'observen cèl·lules fluorescents, es fa servir el segon per identificar el virus amb l'ús d'anticossos individuals; mentre que el tercer vial es pot utilitzar per congelar i conservar la soca vírica. En el cas que el primer vial de co-cultiu hagi estat negatiu les primeres 24 hores, es realitza una segona IF en el segon vial passades 48 hores. Si aquest resulta positiu, s'identifica el virus a partir del tercer vial. En el cas que el segon vial resulti negatiu també passades les 48 hores, es pot optar per rebutjar el cultiu, incloent el tercer vial, ja que la majoria (aproximadament el 98%) dels virus es recuperen dins d'aquest període de temps. No obstant, com alguns virus tenen una multiplicació més lenta, el tercer vial es pot incubar un període addicional de 5 dies.

Diversos investigadors, han comparat la taxa de detecció de virus respiratoris mitjançant els sistemes de co-cultius amb la resta de tècniques existents, en general, els co-cultius oferien uns nivells de sensibilitat d'entre el 96-100% pels FLUAV, de 94% pel RSV, del 88% pels AdV ⁴⁴ i del 73% pels PIV (1 al 3) ¹²⁰.

La principal avantatge dels co-cultius és que eliminen la necessitat de mantenir una gran varietat de diferents línies cel·lulars i proporcionen un mètode ràpid i sensible per a la identificació de virus respiratoris sense requerir l'experiència associada amb el cultiu cel·lular convencional ⁴⁴.

Cultius cel·lulars transgènics

En els últims 10 anys els avenços en la detecció de virus en cultiu cel·lular han estat enfocats a millorar tant la velocitat com la precisió de la detecció, amb aquesta finalitat s'ha utilitzat la tecnologia transgènica. Aquesta tecnologia transgènica ofereix la possibilitat d'utilitzar línies cel·lulars modificades genèticament per tal de millorar i facilitar la multiplicació del virus en cultiu i facilitar-ne la detecció ⁴⁴. La utilització de cèl·lules transgèniques permet una detecció altament específica d'un virus en particular.

La tecnologia transgènica es basa en la introducció d'elements genètics estables dintre d'una cèl·lula de tal manera que quan un virus en particular la infecta, la pròpia multiplicació vírica activa la producció d'un enzim fàcilment detectable per un canvi de color. El virus es detecta si és capaç d'unir-se a la cèl·lula, entrar al seu interior i començar el cicle de replicació, de tal manera que no es necessiti finalitzar el cicle viral per poder detectar el virus ⁴⁴. Els elements genètics utilitzats es denominen *gens reporters*. La característica principal d'aquests elements genètics és que es mantenen inactivats (silenciosos) en les cèl·lules no infectades, i que s'activen ràpidament en les cèl·lules infectades. Les línies transgèniques produeixen un producte detectable únic, només quan són infectades per un virus particular.

Els cultius cel·lulars transgènics s'han aplicat per al diagnòstic de virus com el virus de la immunodeficiència humana tipus 1 (HIV-1), el virus de la polio o els herpesvirus humans 1 i 2. En el cas dels virus respiratoris, s'ha utilitzat per la detecció d'EV (no poliovirus), en especial pels echovirus i cocksackie. Per aquests virus s'ha dissenyat la línia cel·lular transgènica BGMK-hDAF, la qual permet detectar diferents tipus d'EV (Echovirus 3, 6, 7, 11, 12, 13, 19, 21, 24, 25, 29, 30, i 33; virus coxsackie A21, B1, B3 i B5; i EV 70) ja que aquests interactuen amb un receptor específic (el receptor factor accelerador de la degradació humana, hDAF) introduït transgènica a les cèl·lules. La combinació en mètode de co-cultiu d'aquesta línia cel·lular amb una altre línia cel·lular, la Caco-2 (línia cel·lular d'adenocarcinoma de còlon humà), donava una sensibilitat del 76% per a la detecció d'EV ⁴⁴. Aquesta línia es va anomenar *Super E-Mix (Diagnostic Hybrids, Inc.)*. Actualment aquesta línia s'ha modificat amb la introducció de cèl·lules A-549 (en substitució de les cèl·lules CaCo2) i els estudis han reportat una sensibilitat elevada

en diferents tipus de mostres: del 81,3% en mostres de líquid cefaloraquidi, del 85,3% en mostres rectals, i del 100% en mostres respiratòries, en la detecció de diferents EV.

També s'ha dissenyat una línia cel·lular transgènica específica per FLUAV, les cèl·lules 293T de ronyó embrionari humà. Es va dissenyar una cèl·lula que expressava una proteïna de fluorescència verda (provinent de la cuca de llum) que s'activava amb la replicació del virus. L'activitat del *gen reporter* s'expressa en aproximadament 6 hores després de que les cèl·lules hagin estat infectades pel FLUAV, i la luciferasa produïda per l'expressió del gen reporter es detecta mitjançant un sistema de detecció de químio-luminescència. Aquesta línia cel·lular s'ha utilitzat per la detecció ràpida (cultivades amb la tècnica de SV) de diferents soques de FLUAV, sense necessitat d'utilitzar un panell amb altres virus respiratoris ⁴⁴.

Els equip i els reactius necessaris es subministren pel fabricant, i no es necessita experiència tècnica especial. No obstant, aquest sistema està limitat en quan a la detecció d'altres possibles virus, ja que no es podrà detectar cap altre virus per al qual la cèl·lula no hagi estat dissenyada.

TÈCNiques DE DETECCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

El desenvolupament de la prova de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) es va produir a mitjans de la dècada de 1980, i a principis dels anys 1990 la PCR s'havia convertit en un dels mètodes de diagnòstic més fiables en molts laboratoris. Aquesta tècnica es fonamenta en la propietat natural de les DNA polimerases per replicar seqüències de DNA. La capacitat de la PCR per amplificar una única seqüència específica fins a nivells detectables, ha revolucionat la virologia diagnòstica.

La PCR requereix d'un procés d'extracció previ dels àcids nucleics que es vulguin amplificar. L'amplificació s'aconsegueix mitjançant l'ús de cicles repetits de desnaturalització del DNA diana, la hibridació dels encebadors necessaris amb les zones diana i la còpia de la seqüència delimitada per ells (extensió). Aquest procés es duu a terme mitjançant canvis ràpids i precisos de temperatura, els quals succeeixen en un termociclador, i mitjançant l'ús d'una DNA-polimerasa termoestable (Taq-polimerasa) ¹¹¹. Finalment, els productes amplificats es poden detectar emprant diferents mètodes.

En comparació amb les tècniques convencionals de detecció d'antigen i aïllament víric en cultius cel·lulars, les tècniques d'amplificació d'àcids nucleics (NAAT, per les seves sigles en anglès: *Nucleic Acid*

Amplification Test) han demostrat ser més sensibles i per tant, representen un avenç principalment per a la detecció de virus que no es multipliquen en els cultius cel·lulars o per a aquells virus dels quals no s'han desenvolupat els reactius necessaris per a les tècniques de detecció d'antigen i que no existeix cap altra possibilitat diagnòstica ^{44, 45}.

Com en molts mètodes analítics, el rendiment de les NAAT és dependent de la qualitat de la mostra i del procediment d'extracció i purificació dels àcids nucleics.

Tècniques d'extracció d'àcids nucleics

L'extracció i posterior purificació dels àcids nucleics és la primera etapa necessària per a tots els estudis moleculars. Els mètodes d'extracció permeten obtenir els àcids nucleics purificats a partir de diversos tipus de mostres.

Per a l'extracció és necessari causar una lisis cel·lular, inactivar les nucleases cel·lulars i separar els àcids nucleics de les restes cel·lulars. La lisi de les proteïnes de l'embolcall és el primer pas necessari per aïllar eficientment els àcids nucleics ¹²¹. Aquest procés allibera grans quantitats de proteïnes a la solució, a més dels àcids nucleics. En el segon procés de desnaturalització i degradació d'altres biomolècules, s'introdueixen proteases per a digerir les proteïnes alliberades amb la lisis i facilitar la recuperació de DNA o RNA. Finalment, la separació dels àcids nucleics es pot realitzar per diferents mètodes: mètodes de precipitació, principalment utilitzats per l'aïllament de DNA en mostres grans, però també descrits per l'aïllament de RNA; extracció en fase líquida, els quals són molt efectius però s'utilitzen cada vegada menys a causa de la naturalesa tòxica dels compostos utilitzats; i extracció en fase sòlida, que implica la unió selectiva dels àcids nucleics a una matriu immobilitzada (fase sòlida). L'extracció en fase sòlida és actualment la més utilitzada degut a la seva disponibilitat en instruments automatitzats. Tots aquests processos d'extracció dels àcids nucleics, es poden realitzar individualment o varis en el mateix pas ¹²¹.

Un gran avenç ha estat la capacitat d'automatització d'aquests processos. Actualment, els sistemes més utilitzats es basen en l'extracció amb matrius de sílice o boles magnètiques. L'automatització del procés de l'extracció d'àcids nucleics ha proporcionat un augment del rendiment i han reduït el risc de contaminació creuada de les mostres, facilitant la feina del laboratori.

Tècniques d'amplificació per PCR

Les tècniques de PCR utilitzen diferents regions de gens conservats com a diana per a la detecció vírica.

El procés de PCR es divideix en tres etapes que es repeteixen un nombre n de vegades. La primera etapa o iniciació, consisteix en una desnaturalització tèrmica del DNA bicatenari per tal d'obtenir cadenes monocatenàries a les quals puguin aparellar-se els encebadors (cadenes sintètiques curtes de nucleòtids, complementaries als extrems 5' o 3' de cada cadena monocatenària del fragment a amplificar). La segona etapa comprèn la hibridació entre els encebadors i el DNA monocatenari diana. Aquesta hibridació és necessària perquè la polimerasa requereix d'una regió de DNA de doble cadena per a la iniciació de la síntesi de la cadena complementaria. L'última etapa o extensió consisteix en la síntesi de les dues cadenes monocatenàries per part de la DNA polimerasa. El producte de l'amplificat ha de ser detectat posteriorment, això es pot fer per electroforesis en gels d'agarosa o mitjançant tècniques d'hibridació.

Una vegada que l'ús de la PCR es va massificar, a partir de la dècada de 1990, han sorgit variants i noves aplicacions de la tècnica. Algunes variants són:

PCR niada o *nested*. Es tracta d'una tècnica seqüencial molt sensible de PCR on el producte d'una amplificació s'utilitza com a motlle per a realitzar una segona amplificació amb encebadors que es troben dins la primera seqüència amplificada ¹²².

PCR in situ. Es tracta d'una PCR que es realitza sobre un portaobjectes, on hi ha el producte per l'amplificació. El resultat es veu en el mateix portaobjectes i es poden detectar quantitats molt petites de material genètic ¹²².

RT-PCR. Donat que la PCR és una tècnica que només amplifica dianes de DNA, en els casos que es busca RNA es requereix d'un pas previ de conversió mitjançant l'ús de retrotranscriptases (RT). El producte amplificat resulta en un DNA complementari el qual es pot amplificar de manera normal ¹²².

PCR múltiplex. Es tracta d'un tipus de PCR que permet l'amplificació i detecció de més d'una diana diferent en una mateixa reacció mitjançant diferents encebadors específics. Permetent detectar DNA de diferents virus a la vegada ¹²². Malgrat que les tècniques de PCR inicials estaven limitades a un baix nombre de virus diferents que es podien detectar en una sola prova, el desenvolupament de noves

tècniques de PCR han permès resoldre aquesta limitació permetent detectar DNA de varis virus alhora. Altres beneficis addicionals d'aquesta tècnica serien un estalvi de costos, sistemes automatitzats, una ràpida obtenció de resultats, i un augment del nombre d'agents patògens que poden ser detectats amb una sola reacció.

Existeixen més variants de PCR, no obstant totes elles coincideixen en la necessitat de realitzar proves posteriors per tal de detectar els amplificats, mitjançant gels d'agarosa, sistemes d'hibridació en *arrays* o microelectroforesis, entre d'altres.

PCR a temps real. És un sistema de PCR en el qual els processos d'amplificació i detecció es produeixen de manera simultània en el propi tub de reacció. Aquest sistema pot utilitzar sondes marcades amb fluorocroms, o molècules que s'uneixen al DNA de doble cadena emetent fluorescència (les *SYBR Green*), les quals permeten monitoritzar el procés d'amplificació pels canvis de fluorescència emesos i, per tant, elimina el procés de detecció posterior que s'ha de fer en la PCR convencional. Amb aquesta PCR es pot quantificar la quantitat d'àcid nucleic present a la mostra clínica. la gran avantatge d'aquesta PCR és que permet estalviar la detecció dels amplificats i per tant agilitza i facilita molt la detecció. A més, elimina les possibles contaminacions per amplicons al no ser necessari obrir ni manipular els tubs després de l'amplificació ¹²².

Actualment, per al diagnòstic de les infeccions respiratòries virals les NAAT més utilitzades són les PCR múltiplex i les PCR a temps real. També és possible l'ús d'ambdues NAAT combinades, així existeixen sistemes de PCR a temps real amb múltiples dianes. Aquestes tècniques també s'han utilitzat per detectar agents potencialment perillosos com SARS-CoV o el virus de la grip aviar, mitjançant la inactivació d'aquests espècimens químicament abans de l'extracció d'àcids nucleics i, per tant, reduir així el risc d'una possible infecció.

Actualment existeixen una gran varietat de NAAT disponibles comercialment per al diagnòstic de les infeccions respiratòries, i algunes són sistemes totalment automatitzats. La tria d'una NAAT concreta dependrà de les necessitats de cada laboratori. Les principals diferències entre els mètodes es basen en els virus detectats, els passos d'amplificació i temperatures d'hibridació, i el sistema de detecció del producte amplificat. En aquest sentit, existeixen sistemes d'amplificació amb tecnologies patentades, com són els sistemes dependents d'una sonda lligada (MLPA, per les seves sigles en anglès: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) ¹²³⁻¹²⁵ o els sistemes d'oligonucleòtids amb doble encebament

(DPO™, per les seves sigles en anglès: *Dual Priming Oligonucleotide*)¹²⁴⁻¹²⁹. Si ens basem en els sistemes de detecció del producte amplificat, l'amplicó es pot detectar mitjançant una hibridació utilitzant *microarrays* de DNA¹³⁰⁻¹³⁵, microesferes semiconductoras de DNA¹³⁶ o sistemes de microelectroforesis capil·lar¹²⁴⁻¹²⁹.

A la taula 5 es mostren alguns dels principals tipus de PCR utilitzats per al diagnòstic dels virus respiratoris existents actualment.

Els resultats del diagnòstic es poden obtenir en només un dia de treball, ja que en algunes de les tècniques tot el procés (des de l'addició de la mostra fins a l'obtenció de resultat) pot durar només unes hores, i addicionalment, algunes múltiples estan altament automatitzades, reduint al mínim la manipulació de les mostres².

Altres tècniques de detecció d'àcids nucleics

A part de les NAAT, s'han desenvolupat altres tècniques per a la detecció d'àcids nucleics en mostra, com són la tècnica d'amplificació basada en seqüències d'àcids nucleics (NASBA, per les seves sigles en anglès: *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*), amplificació per desplaçament de cadena (SDA, per les seves sigles en anglès: *Strand Displacement Amplification*), l'amplificació isotèrmica en bucle d'àcids nucleics (LAMP, per les seves sigles en anglès: *Loop-Mediated Isothermal Amplification*), l'amplificació per cercle rodant (RCA, per les seves sigles en anglès: *Rolling Circle Amplification*), l'amplificació dependent d'helicasa (HDA, per les seves sigles en anglès: *Helicase Dependent Amplification*), entre d'altres. Aquestes tècniques s'han emprat per a la detecció individual de virus respiratoris, en especial el FLUAV. Aquestes tècniques altament sensibles s'estan aplicant en alguns laboratoris clínics com a rutina de diagnòstic²³.

Taula 5 (1)

Comparació de les principals NAAT disponibles comercialment per a la detecció de virus respiratoris.

PROVA	FABRICANT	VIRUS DETECTATS	TEMPS	PCR ^a	DETECCIÓ
Pro-Flu +	Prodesse GenProbe	FLUAV, FLUBV, RSV	≈ 4 h	PCR-m PCR-tr	-
Pro-Flu ST	GenProbe	FLUAV (A/H3, A/H1 i A/H1N1)	≈ 3 h	PCR-tr	-
Gene Xpert® EV	Cepheid	EV (A, B, C, D)	≈ 2 h 30	PCR-m PCR-tr	-
Gene Xpert® Flu		FLUAV, FLUBV, FLUAV H1N1	≈ 1 h 15	PCR-m PCR-tr	-
Infiniti RVP Plus	AutoGenomics	FLUAV (A/H5N1, A/H1N1), FLUBV, PIV (1-4), RV A/B, EV (A, B, C, D), HCoV (HKU1, OC43, NL63, 229E), hMPV A/B, RSV A/B, AdV (A, B, C, E)	≈ 3 h	PCR-m	<i>Microarrays</i>
Verigene RVNATsp	Nanosphere	FLUAV, FLUBV, RSV A, RSV B	≈ 4 h	PCR-m PCR-tr	-
Film Array	Idaho Technology Inc.	AdV, HCoV (HKU1, NL63, 229E, OC43), hMPV, RV/EV, FLUAV (A/H1, A/H3, A/H1N1), FLUBV, PIV (1-4), RSV ^b	≈ 1 h	PCR-m	<i>Microarrays</i>
Allplex™ Respiratory Full Panel Assay	Seegene	FLUAV (A/H1, A/H3, A/H1N1), FLUBV RSV A, RSV B, AdV, EV, PIV (1-4), hMPV, HBoV, RV, HCoV (OC43, NL63, 229E) ^c	≈ 4 h 30	PCR-m PCR-tr	-
Anyplex™II RV16 Detection		FLUAV, FLUBV, PIV (1-4), RSV A, RSV B, EV, HCoV (OC43, NL63, 229E), hMPV, RV (A, B,C), AdV, HBoV (1-4)	≈ 7 h	PCR-m PCR-tr	-
Anyplex™ FluA/B Typing Real-time Detection		FLUAV, FLUAV H1N1, FLUBV	≈ 2 h	PCR-m PCR-tr	-
Seeplex® RV Influenza A/B One-Step Typing		FLUAV (A/H1, A/H3, A/H1N1), FLUBV	≈ 5 h 30	PCR-m	Microelectroforesis

Taula 5 (2)

Comparació de les principals NAAT disponibles comercialment per a la detecció de virus respiratoris.

PROVA	FABRICANT	VIRUS DETECTATS	TEMPS	PCR	DETECCIÓ
Seeplex® RV7 Detection	Seegene	FLUAV, FLUBV, RSV A/B, PIV 1-3, AdV, RV A, hMPV	≈ 6 h	PCR-m	Microelectroforesis
Seeplex® RV-12		FLUAV, FLUBV, PIV (1-3), RV A/B, HCoV (OC43, NL63, 229E), hMPV, RSV A/B, AdV (A, B, C, D, E)	≈ 6 h	PCR-m	Microelectroforesis
Seeplex® RV-15		FLUAV, FLUBV, PIV (1-4), RV A/B/C, EV, HCoV (OC43, NL63, 229E), hMPV, RSV A, RSV B, AdV, HBoV (1, 2, 3, 4)	≈ 7 h	PCR-m	Microelectroforesis
CLART® Pneumovir	Genomica	FLUAV (A/H1, A/H3, A/H1N1), FLUBV, FLUCV, PIV (1-4), RV (A, B, C), EV, HCoV-229E, hMPV A/B, RSV A, RSV B, AdV, HBoV	≈ 9 h	PCR-m	Microarrays
xTAG™ RVPv1	Luminex Molecular Diagnostics	RSV A, RSV B, FLUAV (A/H1, A/H3, A/H5), FLUBV, hMPV, RV/EV, AdV, PIV (1-4), HCoV (HKU1, NL63, 229E, OC43, SARS)	≈ 8 h	PCR-m	Microesferes
xTAG™ RVP Fast V2		RSV, FLUAV (A/H1, A/H3), FLUBV, hMPV, RV/EV, AdV, PIV (1-4), HCoV (HKU1, NL63, 229E, OC43), HBoV	≈ 5 h	PCR-m	Microesferes
Multicode PLx	EraGen	FLUAV, FLUBV, AdV (B, C, E), PIV (1-4 a/b), RSV A, RSV B, hMPV, RV, HCoV (229229E, OC43, NL63)	≈ 4 h 30	PCR-m	Plaques de microtitulació
ResPlex II	Qiagen	FLUAV, FLUBV, AdV (B, E), PIV (1-4 a/b), RSV A, RSV B, hMPV, RV, HCoV (229E, OC43, NL63, HKU1), coxsackie/echovirus, HBoV	≈ 5 h 30	PCR-m	Plaques de microtitulació
RespiFinder® SMART 22 FAST	Patho Finder	FLUAV (A/H1N1), FLUBV, PIV (1-4), RSV A, RSV B, RV/EV, HCoV (229E, OC43, NL63, HUK1), hMPV, AdV, HBoV ^d	≈ 4 h	PCR-m PCR-tr	-
Simplexa™ Flu A/B & RSV Direct Kit	Focus Diagnostics	FLUAV, FLUBV, RSV	≈ 30 min ^e	PCR-m PCR-tr	-

^a PCR-m: PCR múltiplex; PCR-tr: PCR a temps real.

^b També detecta 3 espècies bacterianes: *Bordetella pertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae* i *Mycoplasma pneumoniae*.

^c També detecta 7 espècies bacterianes: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bordetella pertussis* i *Bordetella parapertussis*.

^d També detecta 4 espècies bacterianes: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* i *Bordetella pertussis*.

^e Utilitzant el termociclador 3M integrat ofereix 96 resultats en 33 minuts.

INTERPRETACIÓ DELS RESULTATS

L'aïllament en cultius cel·lulars d'un virus respiratori en una mostra respiratòria ens confirma que aquest virus s'està multiplicant en aquell moment. Tenint en compte que els virus només es troben en l'aparell respiratori entre cinc i set dies, aquesta troballa ens confirma que estem davant una infecció aguda. Això també es pot aplicar a les tècniques de detecció d'antigen. Per altra banda a l'hora d'interpretar els resultats obtinguts per les tècniques moleculars en el diagnòstic de les infeccions respiratòries víriques, en la majoria de casos en que es detecta un virus estem davant la infecció aguda però s'ha de tenir en compte que pot reflectir una infecció passada. A més amb aquestes tècniques és més freqüent detectar més d'un virus en una mateixa mostra cosa que afegeix dificultat a la interpretació.

Co-deteccions

S'ha estimat que el grau de deteccions múltiples en pacients immunocompetents, mitjançant les tècniques convencionals, és d'aproximadament entre un 5 i un 10%, i tot i que la importància clínica no està del tot establerta, es creu que aquestes deteccions múltiples podrien estar relacionades amb una malaltia respiratòria més greu, especialment en nens petits ⁴⁴.

Degut a l'elevada sensibilitat de les NAAT, especialment amb els sistemes múltiple que permeten detectar amplies bateries de virus simultàniament, el nivell de co-deteccions ha augmentat dràsticament. Es desconeix com s'han d'interpretar aquests resultats, i si aquesta informació podria orientar els tractaments, millorar el pronòstic de la malaltia o limitar l'estada a l'hospital dels pacients ².

Infeccions persistents

La gran majoria de les infeccions respiratòries per virus causen símptomes respiratoris aguts. No obstant, s'han registrat casos d'infeccions més persistents, com és el cas dels virus parainfluença, els quals poden causar infeccions greus en pacients amb trasplantament de cèl·lules mare hematopoètiques (HSCT). La infecció persistent per aquests virus en aquests tipus de pacients són causa de morbiditat greu o fins i tot de mort. El hMPV també s'ha trobat en aquests tipus de pacients en infeccions persistents ².

D'altra banda, els RV també poden detectar-se en pacients asimptomàtics. En un estudi realitzat amb PCR, es va detectar RV fins a 100 dies després dels primers símptomes clínics. Això implicaria que en moltes ocasions, la detecció del RNA viral de RV en mostra clínica, podria no estar lligat a la infecció en curs ².

EPIDEMIOLOGIA

Els virus patògens humans es mantenen a la naturalesa degut a les transmissions contínues entre éssers humans o animals infectats. Les infeccions causades per virus respiratoris tenen una distribució universal, però no tots els virus infecten igual ni durant la mateixa època de l'any. Algunes infeccions respiratòries víriques poden donar-se en forma de brots epidèmics, mentre que altres virus causen infeccions respiratòries endèmiques durant tot l'any de manera esporàdica o en petits pics. Cal tenir en compte també que aquesta distribució es veu afectada per la zona del món on es doni, ja que en zones de clima temperat, el nombre màxim d'infeccions ocorre durant els mesos freds, mentre que en zones de clima tropical, el nombre màxim d'infeccions ocorre durant l'època de pluges ¹³⁷. Generalment, s'estableix un equilibri entre el virus i les poblacions humanes, no obstant, determinats canvis antigènics en els virus, poden proporcionar capacitats de propagació e infecció superiors, causant epidèmies o fins i tot pandèmies, com és el cas del virus de la grip.

L'anàlisi epidemiològic esdevé una peça clau per entendre el seu paper en les diferents infeccions que causen. Degut a que una mateixa malaltia pot estar causada per els diferent virus respiratoris, resulta essencial un bon diagnòstic.

Per tant, a nivell de conèixer la circulació real dels virus en el nostre medi, el diagnòstic virològic és essencial per determinar quin virus està causant la malaltia.

PROGRAMA DE VIGILÀNCIA DE LA GRIP

L'estudi epidemiològic de les infeccions respiratòries pren un sentit especialment important en el cas del virus de la grip, ja que els canvis antigènics majors que es poden produir en el FLUAV, donen lloc a l'aparició de pandèmies que afecten de manera considerable la població en tots els països del món.

L'any 2009, va aparèixer una nova variant del virus de la grip, el FLUAV H1N1 pmd09, que no s'havia detectat mai abans entre els humans i es va estendre per tot el món, fent que l'Organització Mundial de la Salut (OMS) declarés una fase de pandèmia a l'abril d'aquell any. Aquesta pandèmia va durar fins març de l'any 2010, i a partir de llavors es va declarar la fase post-pandèmica ¹³⁸.

Les característiques biològiques dels virus de la grip així com també la seva gran transmissibilitat fan que sigui de gran importància el realitzar una vigilància epidemiològica que permeti identificar precoçment l'aparició d'epidèmies i conèixer les característiques dels virus que les produeixen. D'altra banda, durant els mesos d'hivern també solen produir-se altres epidèmies de virus respiratoris que, malgrat que no tenen la repercussió de la grip, poden alterar de manera important als serveis de salut pública. Per aquest motiu, es va dissenyar el Pla d'informació de les infeccions respiratòries agudes a Catalunya (PIDIRAC), El PIDIRAC es va posar en marxa per primera vegada durant la temporada 1999-2000, i des de llavors el seu objectiu principal és estudiar la circulació dels virus gripals i altres virus respiratoris durant la temporada de la seva major activitat, així com detectar-ne un inici precoç i caracteritzar els virus circulants.

A partir de la temporada gripal 2005-2006, el PIDIRAC es va integrar al *Sistema de Vigilancia de la Gripe en España (SVGE)* de la *Red de Nacional de Vigilancia Epidemiológica*. Aquesta integració ha suposat també la seva incorporació al *European Influenza Surveillance Scheme (EISS)*, i ha contribuït, per tant, a la vigilància integral de la malaltia a Europa.

Cada any, l'Agència de Salut Pública de Catalunya, mitjançant el PIDIRAC, realitza un seguiment epidemiològic de la grip, seguint les recomanacions de l'OMS. La vigilància de la grip es basa en l'anàlisi del conjunt de les dades virològiques, les dades clíniques i les dades epidemiològiques recollides, i la seva funció es la valoració d'aquestes dades per poder establir una detecció precoç de l'epidèmia gripal i informar periòdicament a les institucions adients. La Xarxa Global de Vigilància de la grip de l'OMS està formada per 142 centres a diferents països que s'encarreguen de recollir mostres de pacients amb sospita de quadre gripal al seu país, i realitzar un anàlisi preliminar per tal de que les soques detectades puguin ser analitzades i tipificades. Els resultats obtinguts són la base a partir de la qual la OMS determina la formulació de la vacuna front la grip cada any.

ÀMBIT ACTUAL I OBJECTIUS

El laboratori de microbiologia de l'hospital de la Santa Creu i Sant Pau, és un dels pocs de l'Estat espanyol que aborda el diagnòstic de las virosis per la tècnica de referència de cultiu cel·lular, i que a més complementa aquest diagnòstic amb les tècniques de detecció d'antígens, abraçant un ampli ventall dels virus respiratoris que més circulen en l'ambient. Així mateix, en els últims anys, s'han incorporat tecnologies de detecció d'àcids nucleics, augmentant així la capacitat de detecció dels virus respiratoris.

Per això, en la realització d'aquesta tesi s'han volgut enfocar dos aspectes que hem considerat fonamentals pel millor coneixement de la infecció per virus respiratoris i el seu diagnòstic. Aquests són l'estudi epidemiològic amb caràcter retrospectiu dels virus respiratoris circulants en el nostre ambient i l'aportació de les NAAT al diagnòstic de rutina d'aquestes infeccions.

Objectius

Així mateix, arran de la pandèmia de grip A declarada per l'Organització Mundial de la Salut, hem volgut analitzar aquest període de manera particular per poder conèixer quina és la circulació de la resta de virus respiratoris en època de pandèmia.

Aquest enfoc ens ha portat a plantejar-nos 5 objectius:

Objectiu 1.

Conèixer la freqüència dels diferents virus respiratoris detectats al laboratori de microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau entre l'any 1997 i l'any 2013.

Objectiu 2.

Conèixer la distribució estacional dels diferents virus respiratoris detectats.

Objectiu 3.

Conèixer la relació entre els virus detectats i l'edat i el sexe dels pacients.

Objectiu 4.

Determinar la freqüència d'altres virus respiratoris durant la pandèmia del FLUAV H1N1 pdm09.

Objectiu 5.

Avaluar l'aportació de les tècniques moleculars al diagnòstic de rutina de les infeccions respiratòries víriques en la població pediàtrica.

MATERIAL I MÈTODES

PERÍODE D'ESTUDI

L'estudi epidemiològic de les infeccions respiratòries víriques es va realitzar de forma retrospectiva amb els resultats del diagnòstic virològic de les mostres respiratòries, recollides entre l'1 de gener de 1997 i el 31 de desembre de 2013.

La valoració de les tècniques de biologia molecular aplicades al diagnòstic de les infeccions respiratòries víriques es va realitzar de forma prospectiva en mostres respiratòries, entre octubre de 2008 i març del 2009.

ÀMBIT, PACIENTS I MOSTRES

L'estudi virològic es va realitzar a l'àrea de virologia del laboratori de Microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

L'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau és un hospital de tercer nivell que, amb sis segles d'existència, representa la institució hospitalària degana de l'Estat Espanyol. És un hospital universitari que ofereix una cartera de serveis d'alta complexitat, amb equipament d'última generació en les àrees de diagnòstic i tractament.

L'Hospital dóna cobertura principalment a l'àrea de Barcelona i s'estén per tota Catalunya, donant servei a una població formada per gairebé 300.000 persones. Anualment s'atenen més de 35.000 malalts ingressats i més de 145.000 urgències. A les consultes externes es fan cada any unes 350.000 visites i a l'hospital de dia s'atenen més de 75.000 usuaris. L'Hospital disposa de 136 punts d'hospital de dia, 644 llits i 21 quiròfans. Constitueix referència tant en salut assistencial com en docència, ja que l'activitat en recerca el situa com un dels centres hospitalaris més importants d'Espanya.

Per a la part epidemiològica es van incloure les mostres respiratòries de pacients tant de l'hospital de la Santa Creu i Sant Pau, com les d'altres centres (principalment altres hospitals de l'àrea metropolitana de Barcelona), rebudes a l'àrea de virologia amb sospita d'infecció respiratòria. Per a la part molecular es van escollir 80 mostres pediàtriques d'entre les rebudes al laboratori de microbiologia.

MOSTRES D'ESTUDI

Les mostres processades de manera rutinària incloses a l'estudi epidemiològic van ser mocs nasofaringis, exsudats nasals i faringis (ambdós alhora), rentades broncoalveolars i biòpsies pulmonars. No es varen processar de manera rutinària les mostres de frotis faringis, aspirats traqueals o esputs, tot i que podien ser incloses en l'estudi. Les mostres seleccionades provenien de pacients de totes les edats atesos per sospita d'infecció respiratòria vírica.

Per a l'estudi molecular, les mostres utilitzades van ser 80 mocs nasofaringis seleccionats de manera consecutiva. Les mostres provenien de pacients menors de 6 anys atesos al servei d'urgències pediàtriques de l'hospital i amb sospita d'infecció respiratòria vírica. Els criteris d'inclusió de les mostres varen ser: mostres amb més de 25 cèl·lules/camp microscòpic (400X) i amb volum residual mínim de 300 µl. Les primeres 40 mostres consecutives es van aconseguir des d'octubre fins a novembre del 2008. Les següents 40 mostres consecutives es van seleccionar des de febrer a març del 2009. Aquestes mostres es van recollir en dos períodes de temps diferents, per tal de no incloure els mesos amb els virus més predominants (RSV i FLUAV) i així detectar el màxim nombre de virus diferents possibles.

RECOLLIDA I TRANSPORT AL LABORATORI.

Les mostres s'havien d'obtenir el més aviat possible, a poder ser durant la fase aguda de la malaltia (entre els dies 3 i 7), ja que passats aquest temps, les mostres obtingudes podien no tenir un rendiment satisfactori per l'aïllament.

- El moc de nasofaringe es recollia mitjançant aspiració del moc amb una sonda. El producte es dipositava en un tub estèril amb 2-3 ml d'una solució salina tamponada o sèrum fisiològic.
- Els exsudats nasals i faringis s'obtenien utilitzant dos escovillons amb medi de transport. Amb un dels escovillons es fregava la paret posterior de la faringe i l'altre s'introduïa a les fosses nasals.
- Les rentades broncoalveolars eren obtingudes per broncoscòpia, i es transportaven en un recipient estèril i sense additius.
- Les biòpsies pulmonars eren obtingudes pel cirurgià o l'anatomopatòleg, i es transportaven en un recipient estèril i sense additius.

Les mostres eren transportades al laboratori ràpidament després de la seva obtenció, per tal de procedir al seu processament. En cas de retard en el transport, les mostres es conservaven a 2-4°C (nevera), però mai al congelador, degut a la labilitat d'alguns virus.

RECEPCIÓ, EMMAGATZEMATGE I PROCESSAMENT DE LES MOSTRES

Un cop al laboratori, les mostres rebudes rebien un processament inicial, abans de realitzar l'estudi virològic.

- Mocs nasofaringis i rentades broncoalveolars: Les mostres molt transparents, es van centrifugar inicialment a 2.500 rpm durant 10 minuts i es va resuspendre el sediment amb un mil·lilitre de sobrenedant. Per a les mostres molt mucoses, es va afegir 0,1 ml de N-acetilcisteïna per cada mil·lilitre de mostra i es va barrejar agitant durant 20 segons manualment.

- Exsudats nasals i faringis: Es van posar els dos escovillons dins d'un tub estèril amb 2 ml de sèrum fisiològic i es va agitar per tal que el material quedés suspès en el sèrum fisiològic. Un cop barrejat, es van retirar els escovillons i es va conservar la mostra a 2-4°C fins al seu processament.
- Biòpsies i necròpsies: El teixit es va esmicolar amb una fulla de bisturí es va homogeneïtzar afegint medi de manteniment (veure annex I) per fer una suspensió al 10% (10 parts material/90 parts de medi).

Per a l'estudi epidemiològic, es van utilitzar totes les mostres anteriorment descrites, seguint la metodologia de rutina del diagnòstic virològic convencional.

Per a l'estudi molecular es van utilitzar únicament mocs nasofaringis, i es van processar per a l'extracció d'àcids nucleics durant les primeres 24 hores després de la seva recepció. Aquestes mostres es van conservar a 2-4°C. Un cop realitzada l'extracció dels àcids nucleics, la mostra sobrant es van congelar a -80°C. Els extractes es van conservar a 2-4°C un màxim de 24 hores abans de l'amplificació i posteriorment es van emmagatzemar a -20°C.

DIAGNÒSTIC VIROLÒGIC CONVENCIONAL

Un cop realitzat el processament inicial de les mostres, aquestes s'analitzaven segons les diferents tècniques de detecció virològiques disponibles al laboratori: tècniques de detecció d'antígens i aïllament víric en cultiu cel·lular. Addicionalment, algunes mostres es van processar amb tècniques de PCR per a l'estudi del virus de la grip.

TÈCNIQUES DE DETECCIÓ D'ANTIGEN

Les mostres es processaven per dos sistemes de detecció d'antigen depenent de l'època de l'any. Durant tot l'any i com a tècnica de rutina es va fer servir la tècnica d'immunofluorescència i durant l'època d'hivern s'afegia la tècnica d'immunocromatografia (IC). La IC s'utilitzava en horari d'urgències (a partir de les 15h i fins les 8h els dies laborables; durant els caps de setmana i els festius), en aquelles mostres que venien del Servei d'Urgències Pediàtriques i en mostres de pacients immunodeprimits.

Immunofluorescència

Es van utilitzar tant tècniques d'immunofluorescència directa (IFD), com tècniques d'immunofluorescència indirecta (IFI). Amb aquesta tècnica es poden detectar els virus RSV, FLUAV, FLUBV, AdV, PIV-1, PIV-2, PIV-3 i hMPV. Els equips de reactius utilitzats van ser: *RSV Direct IF (ID)* (BioMérieux® S.A., Lió, França) i el *Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification IFA kit* (Millipore, Light Diagnostics, Temecula, Estats Units) i a partir de desembre del 2008 es va introduir el *D3 DFA Metapneumovirus Identification Kit* (Diagnostics Hybrids Inc. Ohio, Estats Units).

La prova d'IFD es completava en aproximadament 30-40 minuts. El protocol de realització era el següent:

1. Es dipositen 30 µl de mostra en un dels dos pous del portaobjectes i es deixa assecar. Preparar tants portaobjectes com antígens respiratoris es vulguin estudiar.
2. Posteriorment es fixa en acetona durant 10 minuts a temperatura ambient.
3. A continuació s'afegeixen 30 µl d'anticòs monoclonal marcat amb fluoresceïna. El conjunt s'incuba en cambra humida durant 15-30 minuts a 37°C.
4. S'elimina el reactiu sobrant i es renta amb PBS durant 5 segons i amb aigua destil·lada durant 3 segons.
5. Finalment s'afegeix una gota de glicerina i es cobreix amb un cobreobjectes. La mostra ja està llesta per a l'observació microscòpica (microscopi 400X).

La prova d'IFI es completava en aproximadament 50-60 minuts. El protocol de realització era el següent:

1. Es dipositen 30 µl de mostra en un dels dos pous del portaobjectes i es deixa assecar. Preparar tants portaobjectes com antígens respiratoris es vulguin estudiar.
2. Posteriorment es fixa en acetona durant 10 minuts a temperatura ambient.
3. A continuació s'afegeixen 30 µl d'anticòs monoclonal marcat amb fluoresceïna. El conjunt s'incuba en cambra humida durant 15-30 minuts a 37°C.
4. S'elimina el reactiu sobrant i es renta amb PBS durant 5 segons i amb aigua destil·lada durant 3 segons.
5. S'afegeixen 30 µl de conjugat (anti-IgG) marcat amb fluoresceïna. Es torna a incubar en cambra humida durant 30 minuts a 37°C.

6. S'elimina el reactiu sobrant i es renta amb PBS durant 5 segons i amb aigua destil·lada durant 3 segons.
7. Finalment s'afegeix una gota de glicerina i es cobreix amb un cobreobjectes. La mostra ja està llesta per a l'observació microscòpica (microscopi 400X).

Un cop realitzada la tècnica (tant IFI com IFD), es va fer l'avaluació microscòpica per tal de determinar la qualitat de la mostra. Per poder donar el resultat com a vàlid es necessitava observar un mínim número de cèl·lules de l'epiteli respiratori en la preparació. Totes les mostres en les que es van observar menys de 25 cèl·lules en tota la preparació es van considerar no conclouents, degut a que el petit número de cèl·lules no era representatiu de la nasofaringe o de la zona mostrejada. Els resultats es van obtenir llegint la preparació al microscopi de fluorescència (400X). La presència del virus s'observava per una fluorescència color verd poma brillant en el citoplasma i/o nucli cel·lular, que contrastava amb el color vermell de les cèl·lules no infectades degut al colorant de contrast blau d'*Evans* (veure figura 12). En una mostra clínica l'observació de com a mínim una única cèl·lula fluorescent amb el patró característic es considerava positiu.

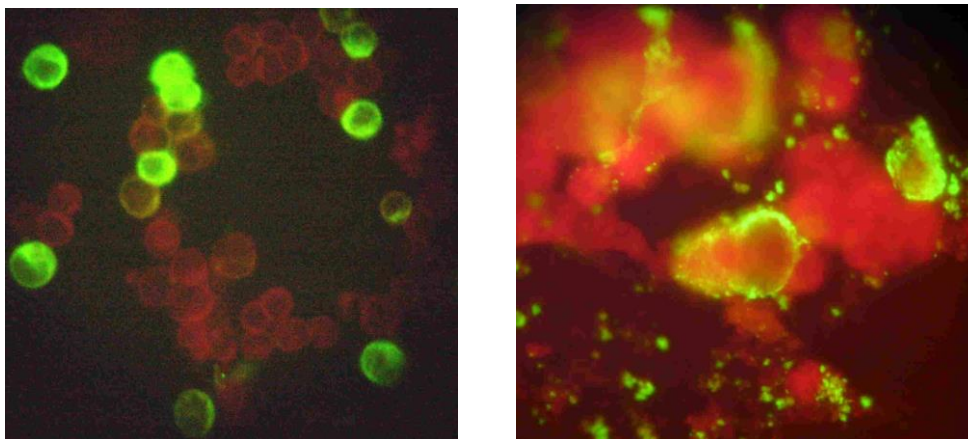


Figura 12

Patrons típics d'immunofluorescències: A la imatge de l'esquerra s'observa una infecció per RSV en MRC-5. A la imatge de la dreta s'observa una infecció per PIV-2 en LLC-MK2.

Immunocromatografia

La immunocromatografia (IC) es feia servir durant els mesos d'hivern coincidint amb els brots epidèmics causats per FLUAV, FLUBV i RSV. Aquest mètode es començava a aplicar cada any quan començaven a detectar-se els primers casos d'aquests virus mitjançant la IF i/o el cultiu cel·lular, i durava fins a la desaparició natural de cada virus, es per això que no tenia data concreta d'inici o finalització. Durant les èpoques en les que es va utilitzar aquesta tècnica, només a les mostres amb resultat negatiu, se'ls hi realitzava la IF i l'aïllament en cultiu cel·lular. Els equips de reactius utilitzats eren *BinaxNOW® RSV Card*, i *BinaxNOW® Influenza A & B Card* (Alere Scarborough, Inc. Maine. Estats Units). Amb aquesta tècnica es podien detectar els virus RSV, FLUAV i FLUBV.

El protocol de realització de la IC és el següent:

1. S'extreu el dispositiu de la bossa i es col·loca horitzontalment sobre la taula de treball.
2. S'omple la pipeta (subministrada en l'equip comercial) pressionant la part superior i col·locant l'extrem dins de la mostra. Cal assegurar que no es formen bombolles d'aire a la part més baixa de la pipeta.
3. S'afegeix lentament, gota a gota, el contingut de la pipeta (0,1 ml) sobre el coixí blanc que indica la fletxa.
4. Es retira la tira adhesiva marró del dispositiu i es tanca la prova.
5. Els resultats es llegeixen al cap de 15 minuts (els resultats llegits abans o després dels 15 minuts poden no ser precisos).

Els resultats es llegeixen mirant les línies que apareixen (veure figura 13):

- En una mostra negativa, la línia de control blau a la part inferior es torna rosa/porpra i no apareix cap altra línia.
- En una mostra positiva per FLUAV, la línia de control blau apareix de color rosa/porpra i apareix una segona línia de mostra rosa/porpra cap a la meitat de la finestra. Si hi ha una línia feble es considera no conclouent.
- En una mostra positiva per FLUBV, la línia de control blau apareix de color rosa/porpra i apareix una segona línia de mostra rosa/porpra cap a la part superior de la finestra. Si hi ha una línia feble es considera no conclouent.

- En una mostra positiva pel RSV la línia de control blau apareix de color rosa/porpra i apareix una segona línia de mostra rosa/porpra a sobre de la línia de control. Si hi ha una línia feble es considera no concloent.
- Una prova resulta no vàlida si la línia de control resta blava o no apareix.

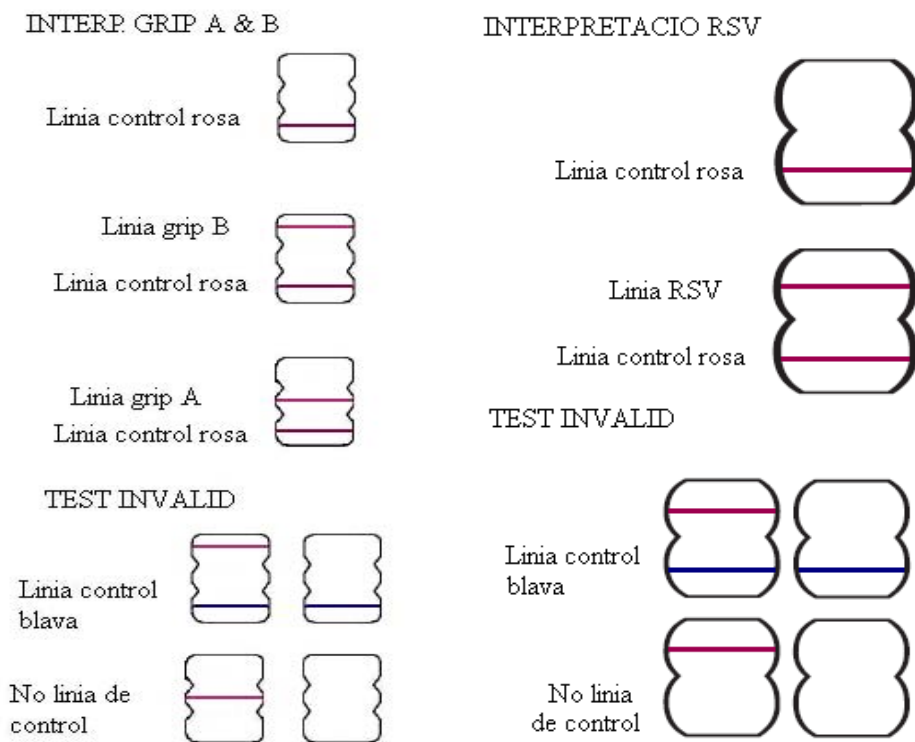


Figura 13

Patrons de resultats possibles en la prova d'immunocromatografia. En la imatge de l'esquerra s'observa una interpretació per una prova de FLUAV i FLUBV. En la imatge de la dreta s'observa una interpretació per una prova de RSV.

Amb aquesta tècnica, les mostres positives no es van seguir analitzant per IF ni s'inoculaven en cultiu cel·lular. Tan sols les mostres negatives amb volum suficient es van seguir processant amb la resta de tècniques. Les mostres positives per virus gripals es podien inocular si hi havia volum suficient, però únicament per tal de recuperar la soca.

TÈCNIQUES D'AÏLLAMENT EN CULTIU CEL·LULAR

En totes les mostres que van arribar al laboratori per a l'estudi dels virus respiratoris es va realitzar l'aïllament en cultius cel·lular, excepte per aquelles que havien resultat positives per RSV en les tècniques de detecció d'antigen. Aquesta tècnica es va aplicar de manera rutinària durant tot l'any.

Totes les mostres abans de ser inoculades en cultiu cel·lular, es van tractar prèviament amb una barreja d'antibiòtics i antimicòtics per evitar que una proliferació bacteriana o fúngica contaminés el cultiu (veure annex I). Es va afegir la barreja antibiòtic/antifúngic a totes les mostres amb una proporció aproximada del 10% del volum i es va deixar mínim 30 minuts a 2-4°C.

L'aïllament es va realitzar mitjançant la inoculació de les mostres respiratòries en sis línies cel·lulars diferents per tal d'aïllar el màxim nombre de virus respiratoris possibles, ja que no totes les línies cel·lulars tenen la capacitat de detectar tots els virus respiratoris.

Línies cel·lulars

A la taula 6 es mostren els tipus de línies cel·lulars, el seu origen i quins són els virus que les infecten.

Taula 6

Línies cel·lulars emprades per l'aïllament víric

CÈL·LULES	ORIGEN	VIRUS DETECTABLE	MARCA	PROVEÏDOR
MRC-5	Línia semicontínua diploide de pulmó embrionari humà	RSV, AdV, EV, RV, PIV-1, PIV-2, PIV-3	<i>Vircell</i>	<i>Innogenetics</i>
			<i>BioMérieux, S.A.</i>	<i>BioMérieux, S.A.</i>
A-549	Línia contínua de carcinoma pulmonar humà	RSV, AdV, EV, PIV-1, PIV-2, PIV-3	<i>Vircell</i>	<i>Innogenetics</i>
HEP-2	Línia contínua de carcinoma de laringe humà	RSV, hMPV, AdV, EV, PIV-1, PIV-2, PIV-3	<i>Vircell</i>	<i>Innogenetics</i>
MCDK	Línia contínua de ronyó de gos	FLUAV, FLUBV	<i>Vircell</i>	<i>Innogenetics</i>
LLC-MK2	Línia contínua de ronyó de mico <i>rhesus</i>	RSV, FLUAV, FLUBV, hMPV, EV, PIV-1, PIV-2, PIV-3	<i>Vircell</i>	<i>Innogenetics</i>
RD	Línia contínua de rabdomiosarcoma embrionari humà	AdV, EV	-	Majadahonda

El laboratori de microbiologia prepara les seves pròpies línies cel·lulars en una àrea aïllada amb instal·lacions exclusives per a la propagació i manteniment d'aquestes. El procés implica l'obtenció, el manteniment i la propagació d'aquestes cèl·lules. El laboratori també prepara els seus propis medis (veure annex I) en aquestes mateixes instal·lacions. Els medis pels cultius cel·lulars són rics en proteïnes que actuen com agents protectors dels virus, a més de presentar un pH de 7,3 imprescindible per mantenir la viabilitat dels virus làbils a pH àcid o bàsic.

Les línies cel·lulars es demanaven noves un cop l'any (excepte les MRC-5 que era cada 15 dies) i es mantenien en multiplicació formant una monocapa en tubs o flascons de plàstic. La propagació de les línies cel·lulars es realitzava dos cops per setmana per tal de poder disposar sempre de cèl·lules a punt per la inoculació de les mostres.

Tot i el manteniment i propagació de les línies cel·lulars, de totes elles, es mantenia un estoc de cèl·lules congelades en nitrogen líquid, en criocongelació.

Inoculació en cultiu cel·lular

El procediment d'inoculació de les mostres en cultiu cel·lular va seguir els següents passos:

1. Un cop seleccionades les línies cel·lulars a inocular, es canvia el medi de cultiu dels tubs i s'afegeix 3 ml del medi de manteniment corresponent a cada línia cel·lular (veure annex I).
2. A continuació es reparteix 0,3 ml de mostra processada en cada tub escollit i s'incuben a 37°C en posició estàtica horitzontal per afavorir el màxim contacte entre la mostra i la monocapa cel·lular.
3. La mostra sobrant es guarda a la nevera 4°C fins el diagnòstic final.
4. Passades 3 hores es canvia el medi a tots el tubs inoculats (2 ml de medi de manteniment nou a cada tub).
5. Seguidament, s'incuben a 37°C en un tambor giratori que permet la disseminació de les partícules víriques per tota la monocapa cel·lular i l'expansió de la infecció, fins al moment de la lectura de tubs.

Lectura dels cultius cel·lulars

La lectura és el seguiment de l'evolució de l'estat de la monocapa. Es va realitzar al microscopi invertit a 40x. Els cultius negatius es van tornar a incubar. Tots els tubs inoculats es van llegir diàriament durant 14 dies.

La multiplicació vírica es caracteritzava per l'aparició d'un efecte citopàtic (ECP) que consistia en una lesió cel·lular causada per la pròpia infecció vírica, aquestes alteracions en les cèl·lules de la monocapa eren perceptibles al microscopi. La identificació definitiva del virus aïllat es confirmava amb tècniques d'IF. És important no confondre un ECP amb un efecte tòxic, ja que poden ser difícils de diferenciar i aquest pot destruir tot el cultiu i inhibir la multiplicació vírica.

Un efecte tòxic pot estar produït per les característiques tòxiques de la mostra en el moment de la seva inoculació o pel mal estat de la monocapa del cultiu cel·lular. En aquest casos s'ha d'intentar eliminar l'efecte tòxic canviant el medi del cultiu cel·lular repetides vegades (esbandides del tub amb el medi adient pel tipus de monocapa) o si és molt intens i/o persisteix després de 24 hores d'haver canviat el medi, s'ha d'efectuar un canvi a un altre tub amb una monocapa de la mateixa línia cel·lular.

En la lectura dels tubs, els diferents ECP perceptibles al microscopi es descriuen a continuació:

- FLUAV i FLUBV: L'ECP s'observa al cap de 5-10 dies de la inoculació i és més precoç per el FLUBV que per el FLUAV. Aquest ECP és poc característic i es pot confondre amb un efecte tòxic.
- RSV: L'ECP és visible després de 2-14 dies d'incubació. Apareixen grans sincicis en tota la monocapa.
- AdV: En general, les cèl·lules augmenten de mida, s'arrodoneixen, es tornen refringents i s'agreguen en grups o gotims característics, fonamentalment a la perifèria de la monocapa cel·lular.
- EV i RV: L'ECP es dona d'una forma disseminada per tota la monocapa en 24-48 hores. Consisteix en cèl·lules refringents amb forma dendrítica o arrodonida, que es desprenen amb facilitat de la monocapa.
- PIV: L'ECP és visible després de 5-10 dies d'incubació. El PIV-1 dona lloc a un ECP format per cèl·lules petites i arrodonides que no són molt aparents. El PIV-2 dona lloc a un ECP format

per sincicis irregulars que es retrauen de la resta de la monocapa. El PIV-3 dona lloc a un ECP poc específic i difícil de detectar i que consisteix en l'allargament de les cèl·lules que adquireixen un aspecte fusiforme i que es poden arribar a retraure i desenganxar-se de la monocapa. El PIV-4 pot donar un ECP semblant al de virus PIV-1 però en general és inaparent.

- hMPV: L'ECP que genera és inespecífic.

Identificació dels virus aïllats:

Per la identificació dels virus aïllats tradicionalment s'aplicava a la monocapa cel·lular que presentava l'ECP la coloració de Harris-Shorr modificada (veure annex II). Amb aquesta coloració es podia definir amb més precisió les característiques de l'alteració cel·lular. Durant el període d'estudi, habitualment, la identificació definitiva del virus aïllat es va confirmar amb tècniques d'IF. El procediment seguia les mateixes pautes que la IFD o IFI anteriorment explicades (apartat Immunofluorescència).

1. Es rasca la monocapa dels tubs de cultiu amb una pipeta estèril.
2. Es centrifuguen els tubs 10 min/2.500 rpm i es guarda el sobrenedant en un tub estèril.
3. Un cop centrifugats els tubs, s'afegeix 1 gota de sèrum fisiològic al tub amb el pèl·let i es resuspèn el contingut.
4. Es posa una gota de la resuspensió al portaobjectes de fluorescència, mentre que es torna a abocar el sobrenedant al tub inicial a l'espera dels resultats.
5. Es realitza la tècnica de IFD o IFI segons el virus sospitat.

La lectura dels resultats es feia segons les observacions microscòpiques en base al anticòs monoclonal utilitzat en la identificació. L'observació de com a mínim una única cèl·lula fluorescent amb el patró característic es considerava positiu.

Identificació de rinovirus

En el cas de la identificació dels RV es va seguir un procediment diferent degut a que els RV i els EV donen un efecte citopàtic idèntic. Tradicionalment, es realitzava un tractament a pH àcid (els EV són estables a pH 3-5 mentre que els RV s'inactiven amb aquest pH) per diferenciar entre aquests dos virus. Es confirmava que es tractava d'un RV si no es detectava multiplicació vírica en el tubs a pH 3 però si

en els tubs a pH 7. A partir del 14/10/2011 es va introduir la identificació de RV mitjançant IF utilitzant dos monoclonals diferents.

Diferenciació de rinovirus i enterovirus mitjançant tractament pH àcid. Els sobrenedants dels cultius cel·lulars amb efecte citopàtic compatible amb EV o RV, s'inoculen en 4 tubs Leighton, que tenen incorporat un cobreobjectes on hi ha la monocapa cel·lular. Dels 4 tubs, 2 s'incuben a 33°C i els altres 2 a 37°C, cada parella amb un pH diferent, una a pH 3 i l'altra a pH 7,4 durant aproximadament uns 60 minuts, i posteriorment es torna a ajustar el pH dels tubs a 7. Finalment es posen a incubar a 37°C fins a l'observació de l'efecte citopàtic. Un cop s'observa l'ECP es realitza la coloració de Harris-Shorr modificada. Per al procediment de la tècnica de tinció, veure annex II. Aquesta tècnica té com objectiu la coloració de les làmines de cultiu cel·lular dels tubs Leighton, per tal de poder visualitzar al microscopi òptic les característiques dels ECP causats pels virus i la seva afinitat pels diferents colorants per tal de fer la identificació definitiva de picornavirus.

L'ECP observat és l'aparició d'un gran cos d'inclusió, lleugerament eosinofílic en el citoplasma de la cèl·lula, que correspon a la localització de la multiplicació d'aquests virus. Això té com a conseqüència el desplaçament i compressió del nucli, acantonant-lo adquirint un aspecte picnòtic. Si el virus només es multiplica a pH 7,4, es tracta d'un RV, mentre que si es multiplica a pH 7,4 i a 7,3, es tracta d'un EV.

Diferenciació de rinovirus i enterovirus mitjançant anticossos monoclonals. S'utilitzaven dos monoclonals diferents per a la diferenciació d'EV i RV. Per una banda, el monoclonal *Enterovirus screening PAN ENTERO BLEND*, de *Light Diagnostics™ (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanya)*, el qual presenta una reacció creuada amb el RV, mentre que l'altre monoclonal, el *Enterovirus ID Kit*, de *Diagnostics Hybrids (Quidel Corporation, California, Estats Units)*, no presentava aquesta reacció amb el RV.

El procediment tenia els següents passos:

1. Es rascava la monocapa dels tubs de cultiu amb una pipeta estèril.
2. A continuació es centrifugaven els tubs 10 min/2.500 rpm i es guardava el sobrenedant en un tub estèril.

3. Un cop centrifugats els tubs, s'afegia 1 gota de sèrum fisiològic al tub amb el pèllet i es resuspensia el contingut.
4. Es dipositaven 30 µl del sobrenedant de la resuspensió al portaobjectes de fluorescència, mentre que la resta de sobrenedant es tornava a abocar al tub inicial a l'espera dels resultats.
5. En un dels pous del portaobjectes de fluorescència es posava l'anticòs monoclonal *Enterovirus screening PAN ENTERO BLEND*, i a l'altre l'anticòs monoclonal *Enterovirus ID Kit*.
6. A continuació es realitzava la immunofluorescència segons els procediments de l'apartat 2.3.1 de detecció d'antígens vírics per immunofluorescència.

La lectura dels resultats es feia segons les observacions microscòpiques, si es detectava fluorescència amb l'anticòs monoclonal *Enterovirus screening PAN ENTERO BLEND* i no amb l'anticòs monoclonal *Enterovirus ID Kit*, es donava un positiu per RV. Si en tots dos casos eren positius, es donava com a EV. En cas d'immunofluorescència dubtosa, es seguia el tractament àcid segons la secció anterior.

DETECCIÓ MOLECULAR DE VIRUS GRIPALS

A partir de l'aparició de la pandèmia de grip del 2009 causada per la introducció en el nostre medi d'un nou virus gripal, el FLUAV H1N1 pdm09, al laboratori es va introduir la detecció molecular d'aquest virus per a totes aquelles mostres en les que es demanava exclusivament la detecció d'un virus gripal.

A partir del 16 d'agost del 2009, la tècnica emprada va ser una PCR casolana seguint la tècnica descrita per Suwannakarn *et al.*¹³⁹, amb algunes modificacions. Aquesta tècnica permetia la detecció del virus gripal A, el FLUAV H1N1 pdm09 i del FLUBV. Posteriorment, a partir de febrer de 2010 es va introduir el sistema *GeneXpert® Dx* (*Cepheid®*, Califòrnia, Estats Units) per a detectar RNA del virus de la grip estacional i de la grip nova, el FLUAV H1N1 pdm09, en mostres respiratòries.

Les mostres positives s'inoculaven en cultiu cel·lular únicament amb la finalitat de recuperar la soca i no es van analitzar per IF.

Sistema de PCR casolana

Les mostres a les que es va aplicar aquesta tècnica eren mocs nasofaringis, exsudats nasals i faringis, i rentades broncoalveolars.

Extracció d'àcids nucleics en mostra clínica

Com a pas previ a l'amplificació, es va realitzar l'extracció dels àcids nucleics pel sistema automatitzat *NucliSENS easyMAG* (BioMérieux® S.A., Lió, França). Aquest sistema permet l'extracció i purificació d'àcids nucleics en un procediment totalment automatitzat, mitjançant la utilització de partícules magnètiques de sílica. El kit incorpora tots els reactius necessaris per al procés d'extracció. El material subministrat es mostra a la taula 7.

Amb aquest procediment, es realitza primer una lisis de la mostra, seguida d'una unió entre els àcids nucleics alliberats per la lisis i les partícules magnètiques de sílica. A la cubeta de reactius s'afegeix un imant que captura les partícules de sílica, a les quals estan enganxats als àcids nucleics. Durant aquest procés, es realitzen diversos rentats per eliminar la solució tampó de lisi i la resta de productes de rebuig. Finalment, s'afegeix una solució tampó d'extracció i s'escalfa la cubeta, això fa que s'alliberin els àcids nucleics purs en el volum final que haguem programat.

Taula 7

Material subministrat per a l'extracció dels àcids nucleics pel Sistema automatitzat *NucliSENS easyMAG* (BioMérieux®)

MATERIAL	PRESENTACIÓ	CONSERVACIÓ
DNA portador	2 x 0,060 ml	Mantenir a -20°C
DNA NTC	2 x 1,00 ml	Mantenir a -20°C
Sílica magnètica	48 x 0,6 ml (384 det)	Mantenir en nevera, 2-8°C
Puntes pipeta <i>Biohit</i>	960 unitats	Mantenir a temperatura ambient
Tampó d'extracció 1	4 x 1 l (384 det)	
Tampó d'extracció 2	4 x 1 l (384 det)	
Tampó d'extracció 3	4 x 1 l (384 det)	
Tampó de lisi 4	4 x 1 l (384 det)	

Les mostres d'exsudats nasals i faringis, necessitaven d'un tractament previ abans de realitzar-se l'extracció.

- Exsudats nasals i faringis. Resuspendre els escovillons en sèrum fisiològic estèril (autoclavat dues vegades). Barrejar els tubs. Aliquotar dos tubs eppendorf amb 300 µl.

Es van utilitzar 200 ml de mostra per a realitzar l'extracció dels àcids nucleics totals. El procés de lisi es realitzava fora del sistema *NucliSENS easyMAG* i en campana. El passos necessaris van ser els següents:

1. Dispensar en les cubetes d'extracció 200 µl de mostra i 2 ml de tampó de lisis (subministrat amb el kit).
2. Incubar 10 min a temperatura ambient.
3. Al volum total de la solució, s'afegien 100 µl de sílice magnètica (subministrada amb el kit).
4. Carregar les cubetes en el sistema *NucliSENS easyMAG* indicant-li que la lisi ja esta feta, i que treballarem amb un volum de 200 µl de mostra i un volum de 25 µl d'elució. El procediment operatiu del sistema *NucliSENS easyMAG* està detallat a l'annex II.

Un cop finalitzat el procés d'extracció, es recollien els àcids nucleics purs en tubs eppendorf. Si els extractes no s'utilitzaven immediatament, es guardaven a temperatura ambient durant 2 hores; a nevera (2-8°C) durant 8 hores; o al congelador (-20°C a -80°C) per un període més llarg.

Amplificació d'àcids nucleics

L'amplificació dels extractes obtinguts de les mostres es va realitzar mitjançant la tècnica de RT-PCR (per les seves sigles en anglès: *reverse transcription - polimerasa chain reaction*) a temps real amb el kit de *OneStep rt-PCR* (Qiagen®, Hilden, Alemanya).

Donat que l'extracte obtingut de les mostres contenia RNA víric, es requeria d'un pas previ de retrotranscripció per convertir el RNA en DNA. El kit inclou una barreja d'enzims específicament formulats per permetre primer la retrotranscripció i posteriorment la PCR en una sola reacció.

En la RT-PCR a temps real, el RNA inicial es converteix en un DNA complementari (DNAc) utilitzant una transcriptasa inversa. El DNAc obtingut s'utilitza posteriorment com a motlle per a l'amplificació en la PCR. Després de la transcripció inversa, les reaccions s'escalfen a 95°C durant 15 minuts per activar la DNA polimerasa i, simultàniament, inactivar les transcriptases inverses.

Per a la detecció dels virus gripals, primer es realitzava una RT-PCR a temps real per diferenciar entre FLUAV, FLUBV o resultat negatiu, juntament amb una RT-PCR a temps real com a control de l'extracció. Segons els resultats obtinguts, es realitzava una segona PCR per determinar la soca de FLUAV.

La PCR per diferenciar entre els virus gripals A i B es va fer seguint la tècnica descrita per Suwannakarn *et al.*¹³⁹, amb algunes modificacions. Es van utilitzar com a encebadors i sondes el gen de la matriu (M1) del FLUAV i el gen de la matriu (M1) del FLUBV. En el cas que el resultat fos positiu per FLUAV, es procedia a realitzar una segona PCR per tipar la soca de FLUAV i determinar si es tractava d'una soca pandèmica. En el cas que el resultat fos FLUBV, es donava com a positiu per aquest virus. En el cas d'un resultat negatiu, es comunicava el resultat i es descartava la mostra.

Com a control es va fer servir el gen de la *RNasaP* humana, el qual servia com control positiu intern per a l'àcid nucleic humà, seguint la tècnica descrita pel *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) i les indicacions de l'OMS de l'any 2009¹⁴⁰. Els resultats de la PCR control condicionaven els resultats anteriors, ja que un resultat negatiu del control intern podia ser indicatiu d'una extracció inadequada d'àcid nucleic (probablement deguda a la presència d'inhibidors en la mostra clínica); d'una absència de material cel·lular humà suficient en la mostra clínica que permetés una correcte detecció; o d'una configuració i execució de la prova inadequada. En aquests casos, es repetia el procés d'extracció i d'amplificació una vegada més abans de descartar la mostra com a no apta.

Les senyals fluorescents es van obtenir un cop per cicle per als fluoròfors FAM (518 nm), HEX (556 nm) i Cy5 (667 nm).

Primera RT-PCR a temps real – TIPATGE GRIP A/B

Es van utilitzar 5 µl d'eluit per a realitzar la primera RT-PCR a temps real per diferenciar entre FLUAV, FLUBV o mostra negativa. El passos necessaris van ser els següents:

1. Es descongelen els components del kit, les sondes, les solucions dels encebadors, el *dNTP Mix*, el tampó de reacció 5x, i la *RNasaP*, i es col·loquen en gel. És important barrejar bé les solucions abans del seu ús per evitar diferències en la concentració de sal.
2. Es prepara la *master-mix*. Per a un volum final de 25 µl, es barregen els components segons la taula 8, tantes vegades com mostres s'hagin d'analitzar. Es recomana preparar un volum de

master-mix 10% més gran que la requerida per al nombre total de reaccions a realitzar. Es recomana incloure un control negatiu (sense RNA diana) en cada experiment.

Taula 8

Master-mix per a la primera RT-PCR a temps real.

REACTIUS	VOLUM
Tampó de reacció 5x	5 µl
<i>dNTPs Mix</i> (10 mM)	1 µl
Encebador F FluA i FluB (<i>Forward</i>) (10 pmols/µl)	1 µl
Encebador R FluA i FluB (<i>Reverse</i>) (10 pmols/µl)	1 µl
Sonda FluA i FluB (5 pmols/µl)	0,5 µl
Enzim Mix	1 µl
H ₂ O	8 µl
RNA (eluit)	5 µl
VOLUM TOTAL	25 µl

F, forward (encebador sentit); R, reverse (encebador antisentit)

Paral·lelament, es realitza una segona *master-mix* amb les concentracions de la taula 9 per al control intern (*RnasaP*).

Taula 9

Master-mix per al control intern *RnasaP*.

REACTIUS	VOLUM
Tampó de reacció 5x	5 µl
<i>dNTPs Mix</i> (10mM)	1 µl
Encebador RNasaP F (<i>forward</i>) (10 pmols/µl)	1 µl
Encebador RNasaP R (<i>reverse</i>) (10 pmols/µl)	1 µl
Sonda (5 pmols/µl)	0,5 µl
Enzim Mix	1 µl
H ₂ O	10,5 µl
RNA (eluit)	5 µl
VOLUM TOTAL	25 µl

F, forward (encebador sentit); R, reverse (encebador antisentit)

3. Barrejar bé les *master-mix* i dispensar els volums adequats en tubs de PCR. Barrejar suaument, pipetejant la barreja amunt i avall diverses vegades.
4. Afegir 2 µg/reacció de les seqüències d'oligonucleòtids (encebadors i sondes) utilitzats com motlles del RNA diana als tubs de PCR individuals. Es van utilitzar tres conjunts d'encebadors

i sondes *Taq-Man*. El nom i la seqüència de cada sonda per a la detecció de virus gripals a la primera PCR estan descrits a la taula 10.

Taula 10

Encebadors per a l'amplificació i identificació dels diferents virus gripals. En majúscules i negreta es mostren les bases utilitzades com a seqüències bloquejades. Les sondes per FLUAV incorporaven el fluoròfor FAM i les sondes per FLUBV incorporaven el fluoròfor Cy5.

SONDA	SEQÜÈNCIA (5' → 3')	POLARITAT
Gen M FluA-M-F151	catggartggctaagacaagacc	Sentit
Gen M FluA-M-P218	FAM-acgc TcaccgTgcccAgt -BHQ1	Sentit
Gen M FluA-M-R276	agggcattttggacaakcgtcta	Antisentit
Gen M FluB-MF439	ctctgtgctttrtgcgaaaac	Sentit
Gen M FluB-MP135	Cy5-tcag CaAtGAaC acagcaa-BHQ3	Sentit
Gen M FluB-MR	ccttccattcttttgacttgc	Antisentit

F, *forward* (encebador sentit); R, *reverse* (encebador antisentit); P, *probe* (sonda)

La taula 11 mostra les seqüències d'oligonucleòtids per al control intern *RNasaP*.

Taula 11

Encebadors per a l'amplificació i identificació del control intern *RNasaP*. Les sondes incorporaven el fluoròfor FAM.

SONDA	SEQÜÈNCIA (5' → 3')	POLARITAT
RNasaP_F	aga-ttt-gga-cct-gcg-agc-g	Sentit
RNasaP_R	gag-cgg-ctg-tct-cca-caa-gt	Antisentit
RNasaP_P^a	ttc-tga-cct-gaa-ggc-tct-gcg-cg	Sentit

F, *forward* (encebador sentit); R, *reverse* (encebador antisentit); P, *probe* (sonda)

^a Les sondes *TaqMan*® estan marcades a l'extrem 5' amb el fluoròfor FAM i amb l'inhibidor de la fluorescència, *Blackhole Extintor 1 (BHQ1)* (Biosearch Technologies, Inc., Califòrnia, Estats Units) a l'extrem 3'.

- Programar el termociclador seguint els següents cicles de temperatures: 1 cicle de 50°C durant 30 min, 1 cicle de 95°C durant 15 min; 40 cicles de 95°C durant 0,5 min + 54°C durant 1 min, i finalment 1 cicle de 72°C durant 10 min. Aquest programa inclou els passos per a la transcripció inversa i la PCR.
- Iniciar el programa de la RT-PCR a temps real mentre que els tubs de PCR encara estan en gel. Cal esperar que el termociclador hagi assolit els 50°C per poder posar els tubs al termociclador.

Després de l'amplificació, les mostres es podien emmagatzemar durant la nit a 2-4°C, o a -20°C per a un temps d'emmagatzematge més llarg.

En el cas que el resultat fos FLUAV, es procedia a realitzar una segona PCR per tipar la soca de FLUAV.

Segona RT-PCR a temps real – TIPATGE FLUAV H1/H3/H5.

Es van utilitzar 5 µl d'eluit per a realitzar la segona RT-PCR a temps real per detectar i tipar les soques de FLUAV H1, H3 o H5. El passos necessaris van ser els següents:

1. Es descongelen els components del kit, les sondes, les solucions dels encebadors, el *dNTP Mix*, el tampó de reacció 5x, i la *RNasaP*, i es col·loquen en gel. És important barrejar bé les solucions abans del seu ús per evitar diferències en la concentració de sal.
2. Es prepara la *master-mix*. Per a un volum final de 25 µl, es barregen els components segons la taula 12, tantes vegades com mostres s'hagin d'analitzar. Es recomanable preparar un volum de *master-mix* 10% més gran que la requerida per al nombre total de reaccions a realitzar. Es recomana incloure un control negatiu (sense RNA diana) en cada experiment.

Taula 12

Master-mix per a la segona RT-PCR a temps real.

REACTIUS	VOLUM
Tampó de reacció 5x	5 µl
<i>dNTPs</i> Mix (10mM)	1 µl
Encebador F (<i>forward</i>) (10 pmols/µl)	1 µl
Encebador R (<i>reverse</i>) (10 pmols/µl)	1 µl
Sonda (5 pmols/µl)	0,5 µl
Enzim Mix	1 µl
H ₂ O	5,5 µl
RNA (eluit)	5 µl
VOLUM TOTAL	25 µl

F, *forward* (encebador sentit); R, *reverse* (encebador antisentit)

3. Barrejar bé la *master-mix* i dispensar els volums adequats en tubs de PCR. Barrejar suaument, pipetejant la barreja amunt i avall diverses vegades.
4. Afegir 2 µg/reacció de les seqüències d'oligonucleòtids (encebadors i sondes) utilitzats com motlles del RNA diana als tubs de PCR individuals. El nom i la seqüència de cada sonda per a la detecció de virus gripals a la primera PCR estan descrits a la taula 13.

Taula 13

Encebadors per a l'amplificació i tipificació dels diferents FLUAV. En majúscules i negreta es mostren les bases utilitzades com a seqüències bloquejades. Les sondes per H1 incorporaven el fluoròfor FAM, les sondes per H3 incorporaven el fluoròfor HEX i les sondes per H5 incorporaven el fluoròfor Cy5.

SONDA	SEQÜÈNCIA (5' → 3')	POLARITAT
FLUAV H1_F	actactggactctgctkgaa	Sentit
FLUAV H1_P	FAM-ttgaggcaaatggaaatctaatagc-TAMRA	Sentit
FLUAV H1_R	aagccttactcagtgcgaa	Antisentit
FLUAV H3_F	tgctactgagctgggtcagagt	Sentit
FLUAV H3_P	HEX-agat GctcTaTtGgG agacc-BHQ1	Sentit
FLUAV H3_R	agggtaacagttgctgrggc	Antisentit
FLUAV H5_F1512	tggaagtgtaraaacggaacgt	Sentit
FLUAV H5_P	Cy5-a CtcCaCttAtTtCctCtCt -BHQ3	Antisentit
FLUAV H5_R1660	tgctagggactcgcmaactg	Antisentit

F, *forward* (encebador sentit); R, *reverse* (encebador antisentit); P, *probe* (sonda)

- Programar el termociclador seguint els següents cicles de temperatures: 1 cicle de 50°C durant 30 min, 1 cicle de 95°C durant 15 min; 40 cicles de 95°C durant 0,5 min + 54°C durant 1 min, i finalment 1 cicle de 72°C durant 10 min. Aquest programa inclou els passos per a la transcripció inversa i la PCR.
- Iniciar el programa de la RT-PCR mentre que els tubs de PCR encara estan en gel. Cal esperar que el termociclador hagi assolit els 50°C per poder posar els tubs al termociclador.

Després de l'amplificació, les mostres es podien emmagatzemar durant la nit a 2-4°C, o a -20°C per a un temps d'emmagatzematge més llarg.

Sistema GeneXpert® Dx

Al febrer de 2010 es va introduir el *Xpert Flu A Panel Assay* (Cepheid®, California, Estats Units) realitzat amb el sistema GeneXpert® Dx. Aquest sistema agrupava l'extracció, l'amplificació i la detecció en una mateixa prova. Es tractava d'una tècnica qualitativa de diagnòstic *in vitro* dissenyada per a detectar RNA del virus de la grip estacional i de la grip nova, el FLUAV H1N1 pdm09, en mostres respiratòries.

El sistema *GeneXpert® Dx* automatitza i integra la purificació de mostres, l'amplificació de l'àcid nucleic i la detecció de la seqüència diana en mostres respiratòries mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa en temps real. El sistema consta d'un instrument, un ordinador personal i un software carregat prèviament per a la realització de proves amb les mostres recollides i la visualització dels resultats.

El tipus de mostra processades van ser exsudats nasals i faringis. Les mostres es van mantenir en nevera fins al seu processament per un màxim de 24h (a 2-4°C), per a un període més llarg es van congelar a -20°C.

Per a cada prova, el propi kit inclou els reactius, encebadors i sondes necessaris per a la detecció simultània d'àcid nucleic de la grip i del control intern. El propi aparell també fa un control que permet comprovar la rehidratació dels reactius, la integritat de la sonda i l'emplenat del tub de reacció (taula 14).

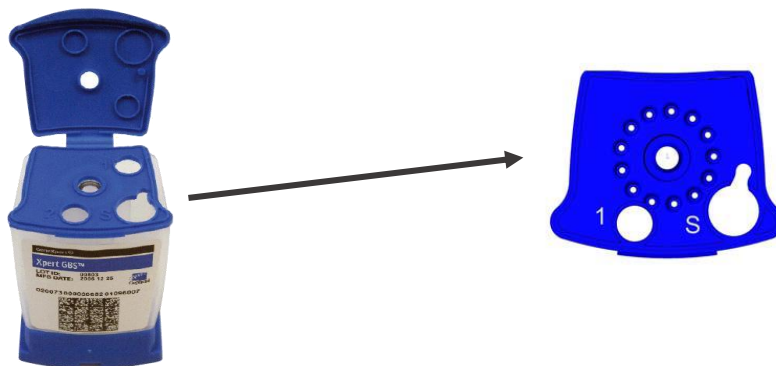
Taula 14

Materials i reactius del *Kit Xpert Flu A Panel*. Cada kit conté reactius suficients per a processar 10 mostres. Cada kit inclou:

MATERIAL	OBSERVACIONS	PRESENTACIÓ
Cartutx Xpert FLUA	Encebadors (directe i invers), sondes, dNTP, transcriptasa inversa, Polimerasa Taq, HEPES pH 8,0, Clorur de potassi, Clorur de Magnesi, BSA (albúmina sèrica bovina)	10 u
Reactiu d'unió	Etanol, aigua	10 x 1 ml
Pipetes		1 x 140 ml

Cartutx Xpert Flu A Panel.

(1) Reactiu d'unió; (S) Mostra



El protocol aplicat va ser el següent:

1. Es resuspèn l'exsudat nasal i faringí en 2 ml sèrum fisiològic. A continuació s'afegeix la mostra i els reactius al cartutx en un ordre determinat.
2. Obrir l'ampolla del reactiu d'unió (1) i introduir tot el contingut de l'envàs de l'ampolla de reactiu d'unió (1) en el compartiment 1 del cartutx.
3. Afegir el volum de 2 pipetes de mostra en el compartiment S del cartutx i tancar la tapa del cartutx.
4. Seguidament es carregen els cartutxos de reactius i els tubs de mostres en les posicions indicades a l'estació de treball. S'ha d'iniciar la prova en els 30 minuts posteriors a l'addició dels reactius.

A continuació es posen els cartutxos al termociclador i s'activa el protocol seguint les instruccions del software del fabricant. Els passos del software *GeneXpert® Dx* són els següents:

1. Encendre l'equip i l'instrument *GeneXpert® Dx*.
2. Fer doble clic en la icona d'accés directe al programa *GeneXpert® Dx*.
3. Escriure el nom d'usuari (genexpert)
4. Fer clic en *Create Test*. Apareix el quadre de diàleg *Scan Cartridge Barcode*
5. Llegir el codi de barres del cartutx Xpert Flu A Panel. Apareix la finestra . Usant la informació del codi de barres, el software emplenarà automàticament *Select Assay, Reagent Lot ID, Cartridge SN* i *Expiration Date*.
6. En el quadre *Sample ID* escriure la identificació de la mostra.
7. Afegir qui fa la prova i el tipus de mostra en el quadre *Notes*.
8. Fer clic a *Start Test*. En el quadre de diàleg que apareix, escriure la contrasenya (genexpert). S'encén una llum verda a sobre del mòdul que s'ha d'utilitzar.
9. Obrir la porta del mòdul de l'instrument, carregar el cartutx i tancar la porta. S'encén una llum verda i comença el procés.
10. Quan ha acabat l'estudi obrir la porta del mòdul de l'instrument i retirar el cartutx. Llençar el cartutx al contenidor de rebuig del laboratori.

Els resultats que es van obtenir de les diferents etapes del procés eren resultats qualitius en termes d'amplificació.

Es podien obtenir quatre resultats diferents: positius, negatius, invàlids o erronis. Els resultats positius es diferenciava entre grip estacional A o virus gripal pandèmic. En el cas d'un resultat negatiu, es comunicava el resultat i es descartava la mostra. Finalment, les mostres amb resultat invàlid o erroni, es repetia el procés sempre que quedés mostra suficient.

DIAGNÒSTIC MOLECULAR DE LA INFECCIÓ RESPIRATÒRIA EN MOSTRA PEDIÀTRICA

El diagnòstic virològic molecular es va aplicar sols a mostres pediàtriques. Es van utilitzar 80 mocs nasofaringis seleccionats de pacients menors de 6 anys atesos al servei d'urgències pediàtriques de l'hospital i amb sospita d'infecció respiratòria vírica. La recollida de les mostres es va dur a terme en dos períodes de temps diferents, per tal de no incloure els mesos amb els virus més predominants (RSV i FLUAV) i així detectar el màxim nombre de virus diferents possibles. Les mostres es van processar pels mètodes convencionals i paral·lelament es van processar també per a la detecció d'àcids nucleics amb tècniques comercials basades en sistemes de PCR múltiplex.

EXTRACCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

Les mostres seleccionades per a l'estudi molecular es van sotmetre inicialment a un procés d'extracció dels àcids nucleics mitjançant el sistema automàtic *EZ1 Virus Mini Kit v2.0* i el *Bio Robot EZ-1 (Qiagen® GmbH, Hilden, Alemanya)*. Aquest sistema proporciona un procediment totalment automatitzat per a la purificació simultània de DNA viral i RNA a partir d'una mostra directa, en el nostre cas moc nasofaringis.

El procés d'extracció d'àcids nucleics utilitzava una tecnologia de partícules magnètiques que permetia la purificació d'àcids nucleics, lliures de proteïnes, nucleases i altres impureses. El procediment de purificació comprèn 4 etapes: a) Lisis de proteïnes mitjançant una proteïnasa K i un tampó de lisi, els quals junts digereixen les proteïnes i inactiven les *RNases*. b) Unió dels àcids nucleics virals a partícules magnètiques. c) Eliminació dels contaminants mentre que els àcids nucleics virals romanen units a les partícules magnètiques. d) Elució dels àcids nucleics purs.

Es va realitzar l'extracció dels àcids nucleics virals amb 200 µl de mostra fresca prèviament conservada a 2-4°C. La mostra sobrant es van congelar a -80°C. Per a cada extracció es va preparar prèviament un RNA transportador a partir del liofilitzat proporcionat al kit. Per a cada mostra es dissolen 3,6 µg de RNA transportador liofilitzat en un volum total de 60 µl de tampó AVE. El volum total de solució de RNA-Buffer amb tampó AVE ha de ser de 60 µl, dels quals 50 µl es transfereixen a la barreja de lisi (això es correspon amb 3 µg de RNA transportador). El material necessari per a cada extracció es mostra a la taula 15.

Taula 15

Materials i reactius del *EZ1 Virus Mini Kit v2.0* (Qiagen®)

MATERIAL	PRESENTACIÓ	CONSERVACIÓ
Cartutxos de reactius, Virus Mini v2.0	48 u	Tots els tampons i reactius es poden emmagatzemar a temperatura ambient (15-25 ° C). No congelar.
Puntes de pipeta d'un sol ús	50 u	
Filtres d'un sol ús	50 u	
Tubs de mostres (2 ml)	100 u	
Tubs d'elució (1,5 ml)	100 u	
RNA transportador (liofilitzat)	310 µg	
Tampó AVE	3 x 2 ml	
Q-Card	1 u	
Manual d'instruccions	1 u	

El protocol d'extracció va ser el següent:

1. Per a cada mostra, preparar una solució de 60 µl (tampó AVE) que conté 3,6 µl de RNA transportador prèviament dissolt en un tub de 1,5 ml. Barrejar suaument amb la pipeta la solució 10 vegades
2. Carregar el tub de 1,5 ml als cartutxos de reactius subministrats amb el *EZ1 Virus Mini Kit v2.0*. A continuació es transfereixen 200 µl de cada mostra als tubs de mostra de 2 ml subministrats amb el kit.
3. Seguidament es carregen els cartutxos de reactius i els tubs de mostres en les posicions indicades a l'estació de treball del EZ1. S'activa el protocol d'extracció automàtic segons les recomanacions del fabricant.
4. Un cop finalitzat el procés es recuperen els tubs de mostra on han estat dipositats els extractes d'àcids nucleics.

Els extractes es van conservar a 2-4°C un màxim de 24 hores abans de l'amplificació i posteriorment es van emmagatzemar a -20°C.

DETECCIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS PEL SISTEMA SEEPLEX®

Els extractes s'utilitzaven per a la detecció molecular mitjançant dos tècniques diferents. La primera tècnica utilitzada va ser el sistema *Seeplex® RV12 ACE Detection Kit* (Seegene, Seul, Corea del Sur).

El mètode Seeplex® estava basat en la tecnologia DPO™ (*Dual Priming Oligonucleotide*), la qual utilitzava encebadors duals per a l'amplificació del material nucleic. A la figura 14 es mostra un esquema de la tecnologia DPO™.

Amb aquesta tecnologia s'evitava la formació de còpies de DNA no específiques i es generava una elevada especificitat constant a la PCR. L'anàlisi dels amplicons obtinguts es realitzava mitjançant un sistema automatitzat de microelectroforesis capil·lar. Aquest mètode donava resultats en aproximadament 5 hores i permetia detectar els virus respiratoris: RSV-a, RSV-b, FLUAV, FLUBV, AdV, RV A/B, hMPV, PIV-1, PIV-2, PIV-3, HCoV-229E, HCoV-NL63 i HCoV-OC43.

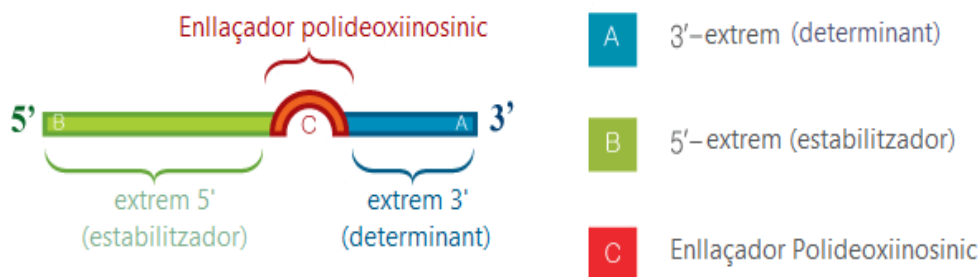


Figura 14

Esquema del sistema DPO™. Els encebadors duals consten de dues regions encebadores separades (una seqüència estabilitzadora a l'extrem 5' i una seqüència determinant a l'extrem 3') unides per un enllaçador polideoxiinosínic. La zona d'enllaç té una "estructura de bombolla", que en si mateix no està implicat en l'encebat, sinó que delimita la frontera entre l'estabilitzador de l'extrem 5' i el determinant de l'extrem 3'.

Retrotranscripció del RNA.

En el cas de Seeplex®, l'extracte obtingut es va sotmetre a un pas previ a l'amplificació de retrotranscripció (RT) amb els elements del kit *Fermentas (RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit)*, de *Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)* per tal de sintetitzar un DNA complementari (DNAC) al RNA viral obtingut en l'extracció a partir d'uns encebadors *random* proporcionats al kit.

El protocol de retrotranscripció va ser el següent:

1. En un tub de PCR en gel, s'afegeix 1 µl de encebadors *random* (0.2 µg/µl), 3 µl de solució aquosa dietilpirocarbonat i 8 µl total del RNA extracte. S'aconsegueix un volum total de 12 µl. Un cop utilitzats, els extractes sobrants es conservaven a -80°C.
2. S'incuba durant 3 min a 80°C i seguidament es refreda el tub en gel durant 2 min i es centrifuga breument
3. A continuació s'afegeix a cada tub tampó de retrotranscripció (RT), la barreja de nucleòtids, els inhibidors de les *RNases* i l'enzim Transcriptasa inversa. Els reactius de la *master-mix* per a la retrotranscripció es mostren a la taula 16.

Taula 16

Master-mix per a la retrotranscripció del mètode Seeplex® (Seegene)

REACTIUS	VOLUM
Tampó de RT (5X)	4 µl
Barreja <i>dNTP</i> 10 mM	2 µl
Inhibidor de <i>RNases</i>	1 µl
Transcriptasa inversa (200 u/µl)	1 µl
VOLUM TOTAL	20 µl

4. Obtenim un tub de PCR amb un volum total de 20 µl que incubarem a 37°C durant 90 min.
5. Posteriorment s'escalfen els tubs a 94°C durant 2 min i seguidament es refreden en gel durant 2 min i es centrifuguen breument.

Els tubs amb el DNAC es conserven a -20°C fins al moment de l'amplificació.

Amplificació dels àcids nucleics

Per a l'amplificació dels extractes s'utilitzen dos múltiples simultànies separades en dos tubs diferents. El tub A servirà per realitzar la múltiple per a l'amplificació dels virus hMPV, AdV, HCoV-229E/NL63, PIV-1, PIV-2 i PIV-3. El tub B servirà per realitzar la múltiple per a l'amplificació dels virus RSV-a, RSV-b, FLUAV, FLUBV, RV i HCoV-OC43/HKU1.

Per a cada tub de DNAC es preparen dos tubs de PCR amb la *Master-mix* corresponent (A i B). Els reactius de la *Master-mix* per a l'amplificació dels àcids nucleics es mostren a la taula 17.

Taula 17

Master-mix per a l'amplificació dels àcids nucleics del mètode Seeplex® (Seegene)

REACTIUS	VOLUM
Encebadors RV12 ACE A o B (5X)	4 µl
Solució 8-Mop	3 µl
Solució <i>Master mix</i> (2X).	10 µl
VOLUM TOTAL	17 µl

El protocol d'amplificació va ser el següent:

1. Descongela i centrifuga breument els extractes de DNAC.
2. Afegir 17 µl de solució *Master-mix* en tubs de PCR prèviament marcats i separats.
3. A continuació afegir 3 µl d'extracte de DNAC a cada tub múltiple (A i B) i resuspendre amb pipeta. Canviar de pipeta per cada tub. Obtenim un tub de PCR amb un volum total de 20 µl que utilitzarem en l'amplificació.

L'amplificació es va realitzar amb un termociclador seguint els següents cicles de temperatures: 1 cicle de 94°C durant 15 min, 40 cicles de 94°C durant 0,5 min + 60°C durant 1,5 min + 72°C durant 1,5 min, i finalment 1 cicle de 72°C durant 10 min. El programa durava aproximadament 3 hores. Un cop finalitzat el cicle d'amplificació irradiar llum UV sobre els productes amplificats durant 20 min per evitar la contaminació creuada.

Els productes amplificats es conservaven a 2-4°C durant un màxim de 24 hores abans de la lectura dels amplificats. El producte sobrant, es va emmagatzemar a -20°C.

Lectura dels resultats

L'anàlisi dels amplicons obtinguts es va realitzar mitjançant un sistema automatitzat de microelectroforesis capil·lar (*MultiNA*, *Shimadzu Biotech*, Kyoto, Japó).

Els amplificats es van analitzar utilitzant el kit *DNA 500 MultiNA MCE-202* (*Shimadzu Biotech*, Kyoto, Japó) Les mostres es van preparar prèviament amb els reactius proporcionats al kit DNA 500: el tampó de separació i el reactiu marcador de DNA.

Les mostres es van col·locar en l'instrument *MultiNA* juntament amb els reactius. La lectura es automàtica i es va realitzar seguint les instruccions del software del fabricant. El lector proporcionava un informe final on s'indicaven els resultats obtinguts. La figura 15 mostra un exemple de la lectura d'un gel.

Els resultats obtinguts podien ser positius, negatius o no concloents (mostra inhibida). En el cas de les mostres no concloents, l'anàlisi es va repetir una vegada més a partir dels amplificats conservats prèviament a -20°C .

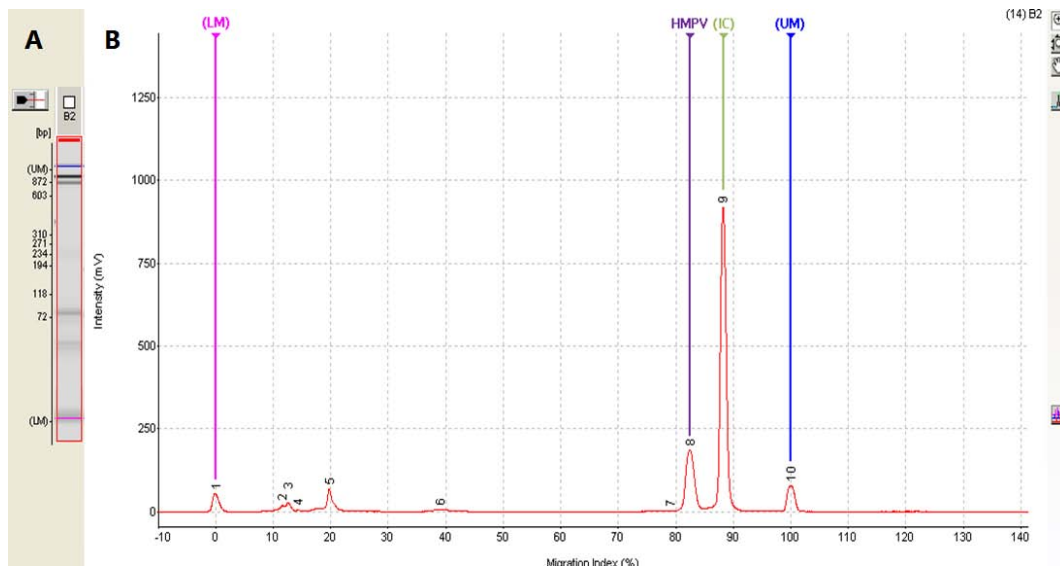


Figura 15

Esquema de visualització dels resultats obtinguts per a una mostra pel mètode Seplex®: A) Imatge virtual del gel, i B) electroferograma corresponent al gel, que mostra la intensitat de les bandes (en l'exemple, positiu per hMPV).

DETECCIÓ D'ÀCIDS NUCLEIS PEL SISTEMA CLART®

Els extractes s'utilitzaven per a la detecció molecular mitjançant dos tècniques diferents. La segona tècnica utilitzada va ser el sistema CLART® *Pneumovir Kit* (CLART®, GENOMICA S.A.U, Madrid, Espanya) i revelat per hibridació en *microarrays* (CLONDIAG Chip Technologies GMBH, Jena, Alemanya).

El mètode CLART® utilitzava la tecnologia dels *microarrays* de baixa densitat. Els *arrays* venien inclosos en uns tubs especials, els tubs AT (de les seves sigles en anglès: *Array Tube*) (veure figura 16). Aquest permetia detectar els virus respiratoris: RSV-a, RSV-b, FLUAV, FLUBV, FLUCV, AdV, EV (Echovirus), RV, hMPV-a i hMPV-b, HCoV-229E, PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4 A/B i HBoV.

Aquest mètode estava basat en la precipitació d'un producte insoluble en aquelles zones del *microarray* on es produïa la hibridació dels productes amplificats amb sondes específiques. En essència, durant la RT-PCR els productes amplificats eren marcats amb biotina. Després de l'amplificació, aquests productes s'hibridaven amb les seves respectives sondes que es trobaven en zones concretes del *microarray* incorporat en uns tubs anomenats AT. Posteriorment s'incubaven amb una solució d'estreptavidina-peroxidasa per fixar la unió i permetre la seva lectura posterior degut a la precipitació per hibridació. Aquest mètode donava resultats en aproximadament 8 hores. Un cop utilitzats, els extractes sobrants es conservaven a -80°C.

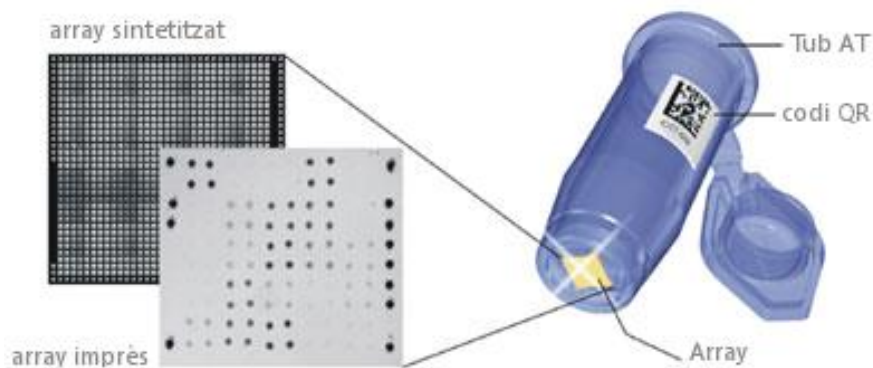


Figura 16

Esquema del tub AT utilitzat al mètode CLART®. El *microarray* té unes mides aproximades de 3x3 mm. La versió impresa (*spotted*) permet 120 sondes.

Amplificació dels àcids nucleics

Amb aquest sistema no era necessària una retrotranscripció prèvia. Durant el procés era necessari treballar amb els tubs en gel.

Per a l'amplificació dels extractes s'utilitzen dos múltiplex simultànies separades en dos tubs diferents. Els materials i reactius estan descrits a la taula 18.

Taula 18

Materials i reactius per a l'amplificació del kit CLART® *PneumoVir* (GENOMICA)

MATERIAL	DESCRIPCIÓ	CONSERVACIÓ
Tubs PCR transparents (PCR múltiplex 1)	43 µl de <i>Master-mix</i> per amplificar: RSV-a, hMPV-a, hMPV-b, HCoV-229E, PIV-1, PIV-2, PIV-3 i PIV-4 A/B	-20°C
Tubs PCR colorejats (PCR múltiplex 2)	43 µl de <i>Master-mix</i> per amplificar: RSV-b, FLUAV, FLUBV, FLUCV, AdV, EV (Echovirus), RV i HBoV	-20°C
Barreja d'enzims	Barreja d'enzims RT (retrotranscriptasa) i DNA polimerasa	-20°C

El protocol d'amplificació va ser el següent:

1. Descongela i mantén en gel els tubs múltiplex i els extractes a analitzar.
2. Per a cada tub múltiplex (dos per cada extracte) afegir en primer lloc 2 µl de la barreja d'enzims proporcionada pel fabricant (inclou un enzim RT i una DNA polimerasa) a cada tub múltiplex.
3. A continuació afegir 5 µl d'extracte a cada tub múltiplex i resuspendre amb pipeta. Canviar de pipeta per cada tub. Obtenim un tub de PCR amb un volum total de 7 µl que utilitzarem en l'amplificació.

L'amplificació es va realitzar amb un termociclador seguint els següents cicles de temperatures: 1 cicle de 45°C durant 45 min + 95°C durant 15 min, 45 cicles de 95°C durant 0,5 min + 50°C durant 1,5 min + 68°C durant 1 min, i finalment 1 cicle de 68°C durant 10 min. El programa durava aproximadament 5 hores.

Els productes amplificats es conservaven a 2-4°C durant un màxim de 24 hores abans de la lectura dels amplificats. El producte sobrant, es va emmagatzemar a -20°C.

Hibridació dels productes amplificats

Per a aquest pas es necessita una desnaturalització prèvia. Utilitzar el termociclador amb un cicle de 95°C durant 10 min. Immediatament després de la desnaturalització col·locar els tubs dels amplificats en gel. Els materials i reactius estan descrits a la taula 19.

Taula 19

Materials i reactius per a la visualització dels amplificats del kit *CLART® PneumoVir (GENOMICA)*

MATERIAL	DESCRIPCIÓ	CONSERVACIÓ
Tubs AT	Subministrats segellats tèrmicament. Conservar tancats i protegits de la llum.	4°C
Solució SHb	Solució d'Hibridació	4°C
Solució DC	Solució de Conjugació	4°C
Reactiu CJ	Conjugat	4°C
Solució RE	Solució de Revelatge	4°C
Solució TR	Tampó de Rentat	4°C

El protocol d'amplificació va ser el següent:

1. Preparar la solució del tampó de rentat (TR) diluït en aigua destil·lada (dilució al 10%). Per a 24 mostres, afegir 3 ml de solució TR a 27 ml d'aigua destil·lada.
2. Es realitza un pre-rentat dels *Array Tube* (AT) afegint 300 µl de la solució TR diluïda a cada tub i invertint els tubs 10-15 vegades. Es retira la solució TR diluïda amb una pipeta. Repetir el rentat una segona vegada.
3. Per la hibridació s'afegeixen 100 µl de solució d'hibridació (SHb) temperada sense que es formi escuma. A continuació s'afegeixen 3 µl de cada tub d'amplificació i es resuspèn amb la pipeta perquè es barregi amb la solució SHb. S'incuba en un termobloc durant 1 hora i mitja a 50°C i agitació orbital a 550 rpm.
4. Retirar els tubs i eliminar la solució SHb amb pipeta. Rentar els tubs AT afegint 300 µl de la solució TR diluïda a cada tub i invertint els tubs 10-15 vegades. Retirar la solució TR diluïda amb una pipeta.
5. Afegir al tub AT 100 µl de solució de conjugació (DC) diluïda (100 µl de diluent del conjugat (CJ) i 0,8 µl de solució DC a cada tub AT). Incubar durant 15 min a 30°C i agitació orbital a 550 rpm.

6. Extreure la solució DC amb pipeta. Rentar dos vegades el tub AT afegint 300 µl de la solució TR diluïda a cada tub i invertint els tubs 10-15 vegades. Retirar la solució TR diluïda amb una pipeta.
7. Finalment afegir 100 µl de solució revelatge (RE) a cada tub i incubar 10 min a 25°C sense agitació. Llegir els tubs de forma seqüencial.

Lectura dels resultats

L'anàlisi del patró d'hibridació es va realitzar mitjançant el lector òptic (*CLONDIAG Chip Technologies GMBH*, Jena, Alemanya). Cada tub AT incorpora unes zones de control de la reacció d'amplificació i unes zones de control d'alineament necessàries per a la lectura. La figura 17 mostra un exemple de la lectura d'un *microarray*.

Els tubs AT revelats es van llegir de forma seqüencial seguint les instruccions del software del fabricant. El lector òptic proporcionava un informe final on s'indicaven els resultats obtinguts. Cada virus tenia un patró de punts del *microarray* propi que venia determinat per el fabricant.

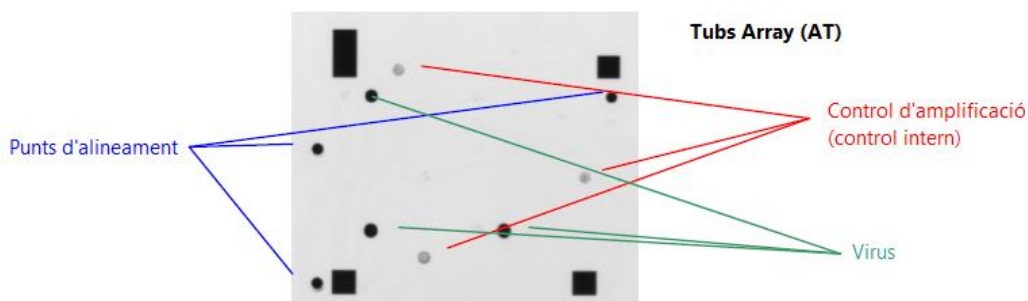


Figura 17

Esquema de visualització de uns resultats obtinguts per un *microarray* pel mètode CLART®. Cada *microarray* té uns punts de control d'alineament i de control intern.

Els resultats obtinguts podien ser positius, negatius o no concloents (mostra inhibida). En el cas de les mostres no concloents, l'anàlisi es va repetir una vegada més a partir dels amplificats conservats prèviament a -20°C.

ANÀLISI DE DADES

Es van recollir les dades epidemiològiques de les mostres analitzades corresponents a edat, sexe i diagnòstic clínic dels pacients a les que pertanyien. Es va desenvolupar una base de dades amb el programa *MS Access*, on es van incloure tots els casos de l'estudi epidemiològic amb les dades esmentades.

Per a l'anàlisi final dels resultats obtinguts, es van dividir els resultats en funció dels objectius establerts i es va analitzar cada secció de manera individual.

Degut als diferents mètodes d'anàlisi utilitzats pel laboratori, a part dels virus respiratoris ja esmentats es podien detectar altres virus que també poden causar símptomes d'infecció respiratòria però que no són considerats pròpiament com a virus respiratoris, com és el cas dels herpesvirus 1 (HHV-1), el citomegalovirus o herpesvirus 5 (HHV-5), el virus de la varicel·la-zòster o herpesvirus 3 (HHV-3) i el virus de les galteres. En aquestes casos, els positius es van informar als metges responsables dels pacients però no van ser analitzats.

ANÀLISI EPIDEMIO LòGIC

Per conèixer la freqüència dels diferents virus respiratoris detectats, es van recopilar les dades de tots els virus respiratoris detectats durant tot el període d'estudi.

Per comprovar l'existència o no d'una distribució estacional dels diferents virus respiratoris, es van analitzar individualment els resultats obtinguts en cada any de l'estudi i els resultats obtinguts en cada mes de l'estudi. Es van aplicar proves estadístiques.

Per l'anàlisi d'edats, els resultats es van distribuir en diferents grups segons l'edat del pacient. Els rangs establerts van ser el següents: pacients menors de 6 mesos d'edat (≤ 6 mesos); pacients entre 6 i 12 mesos d'edat (6-12 mesos); pacients entre 1 i 3 anys d'edat (1-3 anys); pacients entre 3 i 5 anys d'edat (3-5 anys); pacients entre 5 i 18 anys d'edat (5-18 anys); pacients entre 18 i 30 anys d'edat (18-30 anys); pacients entre 30 i 40 anys d'edat (30-40 anys); pacients entre 40 i 60 anys d'edat (40-60 anys) i els pacients majors de 60 anys d'edat (≥ 60 anys).

Les edats no es solapaven entre elles per tal d'evitar duplicats. Es van considerar mostres pediàtriques aquelles que eren de pacients menors de 18 anys d'edat tal i com es considera en el nostre hospital.

En el cas de les mostres on no es va poder recuperar l'edat, es van classificar en un subgrup el qual es va anomenar Edat Desconeguda (ED). Es van aplicar proves estadístiques.

ANÀLISI MOLECULAR COMPARATIU

En l'estudi molecular per a la comparació entre les diferents tècniques de diagnòstic, es van comparar els resultats obtinguts per les diferents metodologies i també es van recollir les dades clíniques de les mostres seleccionades.

Per a la lectura dels resultats, es va establir un criteri de positivitat per facilitar l'anàlisi comparatiu: es va determinar que una mostra es considerava clínicament rellevant o veritable positiva quan es detectava un virus respiratori pels mètodes convencionals independentment del resultat molecular, o per ambdós mètodes moleculars alhora.

ESTUDI ESTADÍSTIC

Per l'anàlisi de les dades contínues, es va utilitzar la prova t-test de dades independents, mentre que per les dades categòriques es va utilitzar la prova de Khi-quadrat. Totes les dades van ser analitzades amb el programa d'IBM SPSS versió v20.0 (*IBM Corp, Armonk, Nova York, Estats Units*).

Donat que les variables estudiades van ser de tipus qualitatiu, es va realitzar un anàlisi bivariant per estudiar les possibles relacions entre les variables. Quan les variables a relacionar donaven taules de més de 2x2 es van calcular els residus tipificats corregits per estudiar entre quines variables es donaven diferències estadísticament significatives (quan mitjançant la prova de Khi-quadrat s'acceptava que globalment existien diferències estadísticament significatives). Els residuals tipificats corregits indiquen que entre dos grups existeixen diferències significatives quan el valor que obtenim està per fora de l'interval [-3, 3]. Les associacions obtingudes amb un valor de $p < 0,01$ van ser considerades significatives.

RESULTATS

Durant un període de disset anys des de l'1 de gener de 1997 i fins al 31 de desembre de 2013, al laboratori de Microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, s'han rebut un total de 36.744 mostres respiratòries per estudi virològic.

De les 36.744 mostres arribades 28.394 (77,3%) corresponien a mocs nasofaringis, 3.962 (10,8%) a exsudats nasals i faringis, 2.738 (7,4%) a rentades broncoalveolars, 882 (2,4%) a frotis faringis, 737 (2%) a biòpsies pulmonars, 30 (<1%) a aspirats traqueals i 1 esput. D'aquestes mostres, es van obtenir resultats positius en el 41,2% dels mocs nasofaringis, en el 24,8% dels exsudats nasals i faringis, en el 10% de les rentades broncoalveolars, en el 24,8% dels frotis faringis, en el 3,3% de les biòpsies pulmonars, en el 16,7% dels aspirats traqueals i cap en l'esput.

El total de mostres rebudes per any i la seva distribució mensual es mostra a la taula 20.

Les mostres es corresponien amb 20.441 (55,6%) casos d'homes, amb 16.009 (43,6%) casos de dones i en 294 casos no constava el sexe.

Taula 20

Distribució mensual de les mostres rebudes cada any durant el període d'estudi.

ANYS	G	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Total
1997	145	169	78	68	59	28	35	18	27	51	78	196	952
1998	247	303	182	115	96	71	73	48	68	122	223	395	1.943
1999	278	229	172	148	116	84	62	36	57	168	194	281	1.825
2000	472	291	192	131	121	93	77	33	57	88	185	305	2.045
2001	297	252	185	158	130	106	91	57	84	152	161	257	1.930
2002	369	221	187	103	89	74	71	52	105	139	224	302	1.936
2003	202	224	241	150	133	138	87	73	84	191	322	420	2.265
2004	198	156	158	116	121	128	97	59	68	130	204	310	1.745
2005	464	254	248	166	138	109	81	71	100	190	253	241	2.315
2006	177	195	360	145	118	92	105	67	69	155	279	315	2.077
2007	421	407	269	157	137	96	53	39	61	165	257	376	2.438
2008	336	283	205	167	121	88	65	41	63	164	284	314	2.131
2009	583	350	409	164	179	90	204	219	222	318	789	625	4.152
2010	287	199	216	148	175	124	114	86	84	136	185	492	2.246
2011	679	502	290	139	139	130	80	69	80	103	172	226	2.609
2012	146	549	415	146	103	73	64	58	68	103	155	167	2.047
2013	299	481	264	161	119	89	85	51	58	124	139	218	2.088
Total	5.600	5.065	4.071	2.382	2.094	1.613	1.444	1.077	1.355	2.499	4.104	5.440	36.744

De les 36.744 mostres, 11.298 (30,7%) provenien de pacients \leq de 6 mesos d'edat, 4.161 (11,3%) de pacients de 6 a 12 mesos d'edat, 6.156 (16,7%) a pacients de 1 a 3 anys d'edat, 2.052 (5,6%) a pacients de 3 a 5 anys d'edat, 2.600 (7,1%) a pacients de 5 a 18 anys d'edat, 1.065 (2,9%) a pacients de 18 a 30 anys d'edat, 1.457 (4%) a pacients de 30 a 40 anys d'edat, 3.183 (8,7%) a pacients de 40 a 60 anys d'edat, 4.304 (11,7%) a pacients \geq 60 anys d'edat i en 477 (1,3%) no constava l'edat del pacient.

Un total de 33.696 es van processar amb els mètodes convencionals, la resta, 3.048, es van processar només per detecció molecular de virus gripals.

De les 36.744 mostres estudiades, 13.201 (35,9%) van resultar positives per un o més virus. En 428 (3,2%) mostres es va detectar més d'un virus respiratori. En total es van detectar 13.630 (37,1%) virus respiratoris.

La distribució anual de les mostres totals rebudes i les mostres positives es mostra a la figura 18 i la distribució mensual de les mostres rebudes i els positius detectats es mostra a la figura 19.

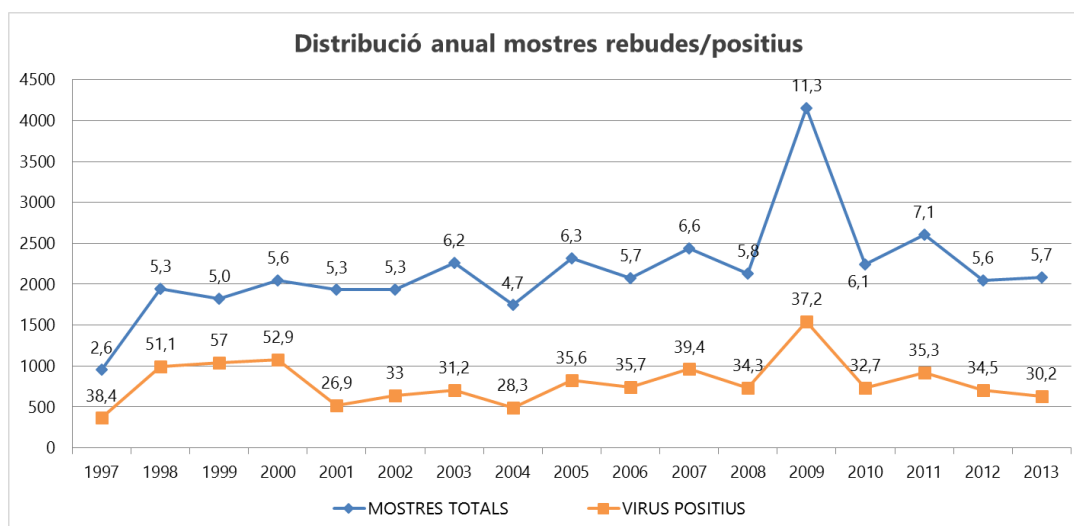


Figura 18

Distribució anual de les mostres totals i els positius detectats durant 1997-2013. Es mostra el percentatge de les mostres totals respecte a la $n=36.744$ i el percentatge dels positius detectats respecte al número de mostres rebudes cada any.

Com s'observa a la figura 18, l'any amb més mostres rebudes va ser el 2009, i l'any amb menys mostres al 1997. Les dades obtingudes demostren que el número de mostres positives és significativament diferent segons l'any d'estudi ($p < 0,001$). Els anys amb més mostres positives detectades van ser respectivament els anys 1999, 2000 i 1998. Per contra, els anys 2001 i 2004 es van registrar menys mostres positives que en cap altre any.

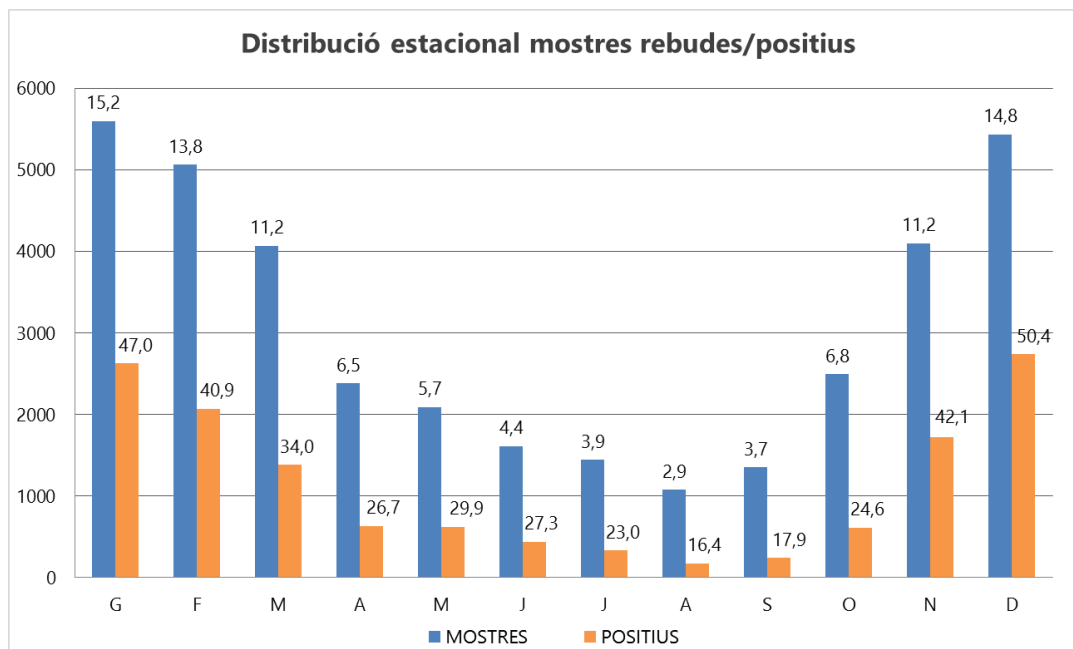


Figura 19

Distribució estacional de les mostres totals i els positius detectats durant 1997-2013. Es mostra el percentatge de les mostres totals respecte a la $n=36.744$ i el percentatge dels positius detectats respecte al número de mostres rebudes cada mes.

Com s'observa a la figura 19, el major número de mostres rebudes ocorre durant els mesos d'hivern, mentre que a l'estiu les mostres rebudes es redueixen a més de la meitat. La distribució de les mostres rebudes és significativament diferent entre el període d'hivern i d'estiu ($p < 0,001$). El major nombre de mostres positives també es dona durant els mesos d'hivern, on els mesos amb més deteccions són desembre i gener, seguits pels mesos de novembre i febrer. La resta de mesos de l'any, el nombre de mostres positives detectades és significativament menor que durant el període d'hivern ($p < 0,001$).

OBJECTIU 1. CONÈIXER LA FREQUÈNCIA DELS DIFERENTS VIRUS RESPIRATORIS DETECTATS.

Els diferents virus respiratoris detectats i la freqüència de cada un es representa a la taula 21.

Taula 21

Total de virus detectats i percentatge de cadascun d'ells.

Virus	# deteccions positives	% positius
RSV	4.008	29,4
FLUAV	3.912	28,7
FLUBV	911	6,7
AdV	1.997	14,7
EV	1.273	9,3
RV	602	4,4
hMPV ^a	238	5,1 ^a
PIV-1	155	1,1
PIV-2	100	< 1
PIV-3	413	3
PIV-4	2	< 1
PIV	19	< 1
Total	13.630	-

^a Inici de la detecció al desembre de 2008. El percentatge s'ha calculat en base al total de virus positius detectats des d'aquesta data (n=4.692).

El RSV va ser el virus detectat amb més freqüència en tot el període d'estudi, essent el 29,4% del total de virus detectats. El FLUAV, va ser el segon virus més detectat, representava el 28,7% del total de virus. L'AdV va ser el tercer virus més detectat representant el 14,7% dels virus. La resta de virus respiratoris es van detectar amb una freqüència inferior al 10%: els EV es van detectar amb una freqüència del 9,3%, el FLUBV amb 6,7% del total, i els RV amb el 4,4% del total de virus detectats. Els virus parainfluença més detectat va ser el PIV-3, amb una freqüència de detecció del 3% dels virus totals. Els PIV-1 es van detectar en l'1,1% dels casos, mentre que els PIV-2 van tenir una detecció inferior a l'1% del total. En 19 casos es van detectar virus parainfluença (PIV) que no van poder ser tipificats, i que representaven menys de l'1% dels positius. En dos únics casos es va detectar el virus parainfluença 4, un cas com a únic virus i un cas de detecció múltiple amb RV. A partir del desembre de 2008 es van detectar 238 hMPV que van representar el 5,1% dels virus detectats (n=4.692) des que es va introduir la tècnica.

Es van trobar co-deteccions en 428 (3,2%) mostres positives. Totes les co-deteccions van ser dobles, tret d'un únic cas on es va donar una detecció triple formada per FLUAV/AdV/EV. Aquestes co-deteccions es van detectar en mostres processades per mètodes convencionals, tret d'un únic cas de FLUAV/FLUBV en una mostra processada per PCR de virus gripals. Els virus que es van trobar amb més freqüència en les co-deteccions van ser el RSV i el FLUAV. La combinació més freqüent va ser RSV/FLUAV representant el 25,7% (110/428). Les diferents co-deteccions es mostren a la taula 22.

Taula 22

Combinació dels virus respiratoris (n=854) detectats en co-deteccions dobles (n=427). Els resultats en negreta indiquen el número de casos positius totals de cada virus.

Virus	RSV											
FLUAV	110	FLUAV										
FLUBV	12	8	FLUBV									
AdV	45	44	5	AdV								
EV	41	22	5	26	EV							
RV	7	2	0	6	2	RV						
hMPV	2	0	1	12	2	3	hMPV					
PIV-1	1	4	0	7	4	1	0	PIV-1				
PIV-2	0	6	1	2	0	2	0	0	PIV-2			
PIV-3	0	5	1	6	10	6	1	5	0	PIV-3		
PIV-4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	PIV-4	
PIV	0	2	2	3	2	0	0	0	0	0	0	PIV
Total ^a	218	203	35	156	114	30	21	22	11	34	1	9

^a El cas de detecció múltiple amb tres virus respiratoris (FLUAV/AdV/EV) no està inclòs a la taula.

En 3.048 mostres que només es van processar mitjançant PCR de virus gripals, 898 (29,5%) van resultar positives. Es van detectar un total de 899 virus gripals, dels quals 734 (81,6%) eren FLUAV i 165 (18,4%) van ser FLUBV. Es va detectar una co-detecció de FLUAV/FLUBV. Aquestes mostres no es van processar per detectar la resta de virus respiratoris.

De les 33.696 mostres processades per mètodes convencionals (excloses les processades per PCR de virus gripals), 12.303 (36,5%) van resultar positives. El RSV va representar el 32,6% del total de virus detectats; el FLUAV (n=3.178) el 25,8%; l'AdV el 16,2%; els EV el 10,3%; el FLUBV (n=746); els RV el 4,9%; el PIV-3 el 3,4%; els PIV-1 l'1,3% del total de virus detectats; i el hMPV el 6,3% dels virus detectats (n=3.793) en el període en que es va estudiar. La resta de virus respiratoris, el PIV-2, PIV i PIV-4 van mantenir una freqüència de detecció inferior a l'1%.

OBJECTIU 2. CONÈIXER LA DISTRIBUCIÓ ESTACIONAL DELS DIFERENTS VIRUS RESPIRATORIS DETECTATS.

Distribució anual dels virus respiratoris

El percentatge anual dels diferents virus detectats es reflecteix a la taula 23 i la seva representació gràfica a la figura 20.

Taula 23

Percentatge de cada virus sobre el total de virus de cada any d'estudi.

ANYS	RSV	FLUAV	FLUBV	AdV	EV	RV	PIV-1	PIV-2	PIV-3	hMPV ^a
1997	45,1	6	6,8	15,8	15	0	0,3	4,4	2,2	-
1998	36,5	38,4	1,1	12,4	7,9	0,1	0,6	0,7	2,2	-
1999	17,1	51,7	2,2	14,6	9,8	0,4	1,2	1,6	1,3	-
2000	29	56,4	0,1	6,3	6,1	0	0,6	0,1	1,4	-
2001	38,7	8,1	1,7	19,5	20	0,8	6,6	1	3,7	-
2002	41,5	13,9	11,1	12,4	12,7	5,8	0,9	0,2	1,3	-
2003	32,5	30,6	0,4	17,3	10	4,7	1,8	0,6	2	-
2004	46,8	4	0	13,6	10,3	12,6	5,7	0	7,1	-
2005	38,2	22,1	5,0	12,0	10,7	6,8	1,6	1,1	2,5	-
2006	35,9	15,1	5,9	17,9	11,3	6,3	0,3	0	7,2	-
2007	30,6	23,5	6,0	20,7	6,9	7,4	0,6	1,6	2,7	-
2008	38,9	11,1	11,8	17,3	11,1	4,1	0,1	0,4	4,4	0,7
2009	15,5	47,2	6,5	14,1	5,2	4,2	0,5	1	1,8	3,9
2010	28,3	17,7	0,3	18,0	16,3	7,5	0,1	0,1	4,5	7,2
2011	25,3	15	19,1	15,8	7,8	5	0,3	0,2	3,6	7,9
2012	16,3	43,6	7,4	11,8	6,5	7,6	0	0,3	3	3,5
2013	17,3	14,1	33,1	14,4	4,3	5,9	2,1	0,3	4,9	3,5

^a Inici de la detecció al desembre de 2008.

No es mostren els PIV ni els de PIV-4.

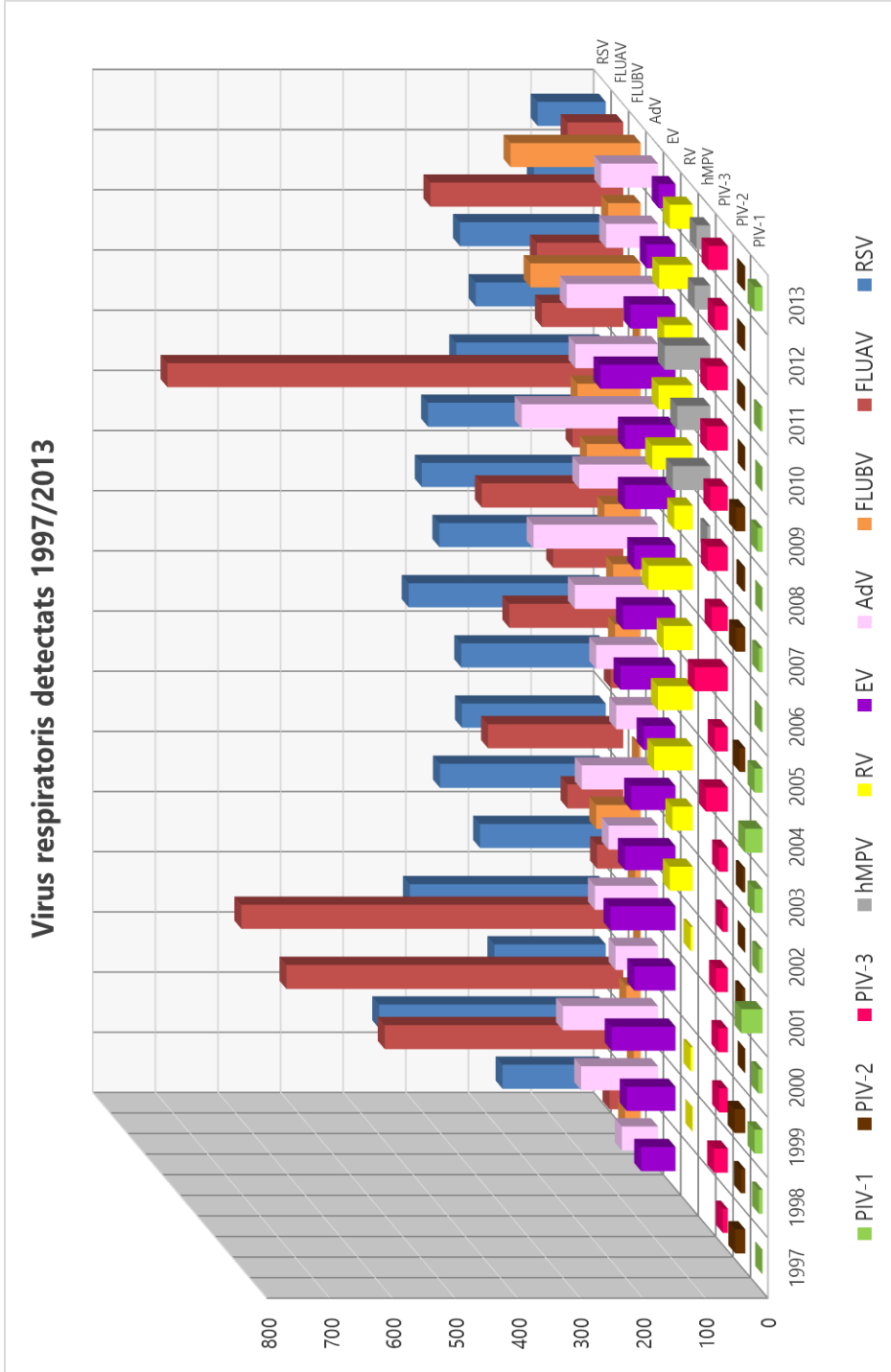


Figura 20

Distribució anual del número total de virus respiratoris detectats. No es mostren els PIV ni els PIV-4.

Per tal de conèixer la distribució anual dels diferents virus detectats es va analitzar cada any per separat.

Any 1997

Es van analitzar 952 mostres, de les quals 344 (36,1%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 366 (38,4%) virus respiratoris, dels quals: 165 eren RSV (45,1%); 58 eren AdV (15,8%); 55 eren EV (15%); 25 eren FLUBV (6,8%); 22 eren FLUAV (6%); 16 eren PIV-2 (4,4%); 16 eren PIV (4,4%); 8 eren PIV-3 (2,2%); 1 era PIV-1 (<1%) i no es va detectar cap RV. Es van detectar 22 co-deteccions (6,4%) en les mostres positives. La figura 21 representa gràficament els resultats.

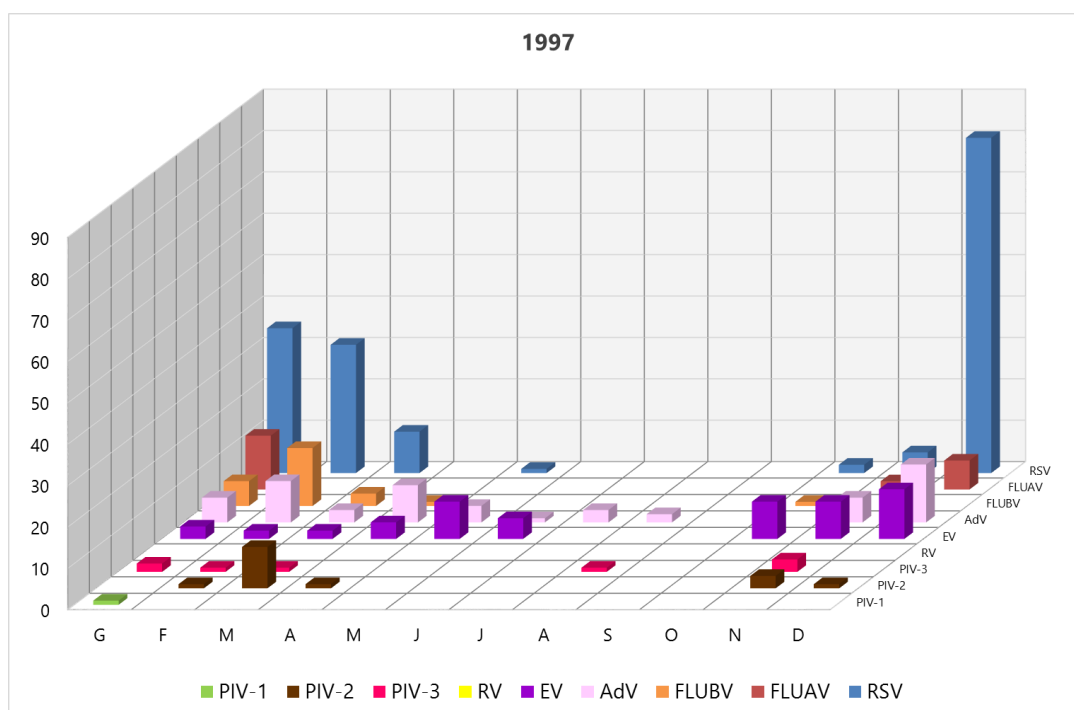


Figura 21

Viruses detectats cada mes de l'any 1997. No es mostren els casos de PIV.

Any 1998

Es van analitzar 1.943 mostres, de les quals 932 (48%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 992 (51,1%) virus respiratoris, dels quals: 381 eren FLUAV (38,4%); 362 eren RSV (36,5%); 123 eren AdV (12,4%); 78 eren EV (7,9%); 22 eren PIV-3 (2,2%); 11 eren FLUBV (1,1%); 7 eren PIV-2 (<1%); 6 eren PIV-1 (<1%), 1 era RV (<1%) i 1 era PIV (<1%). Es van detectar 59 co-deteccions (6,3%) en les mostres positives. La figura 22 representa gràficament els resultats.

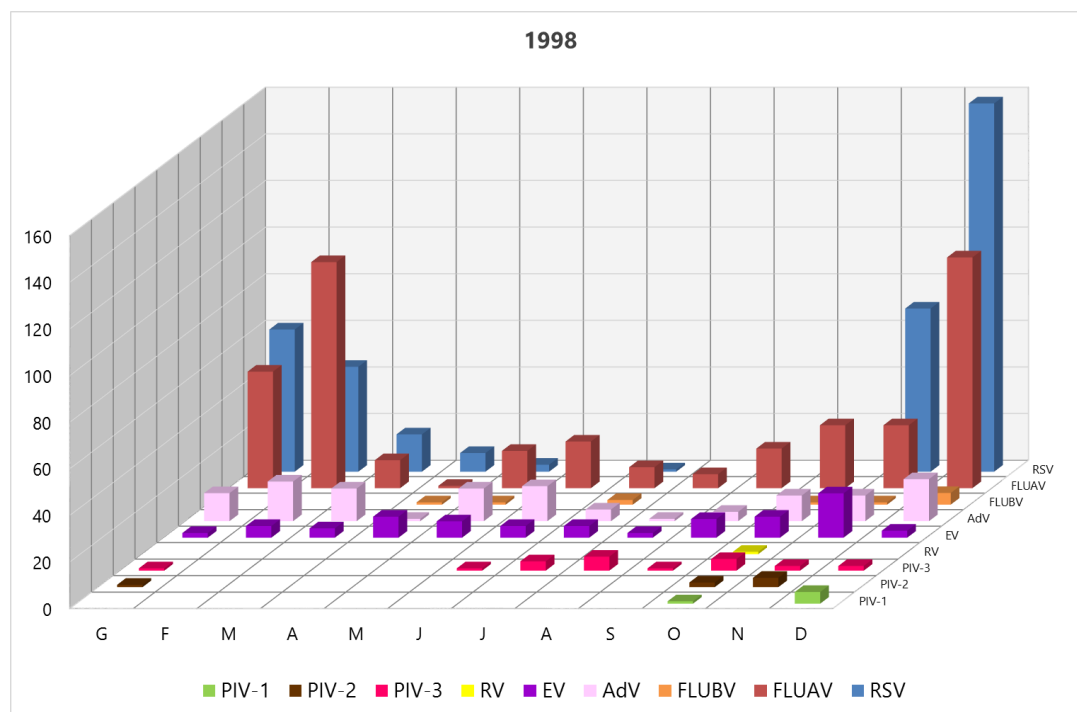


Figura 22

Viruses detectats cada mes de l'any 1998. No es mostra el cas de PIV.

Any 1999

Es van analitzar 1.825 mostres, de les quals 987 (54,1%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 1.041 (57%) virus respiratoris, dels quals: 538 eren FLUAV (51,7%); 178 eren RSV (17,1%); 152 eren AdV (14,6%); 102 eren EV (9,8%); 23 van ser FLUBV (2,2%); 17 eren PIV-2 (1,6%); 14 van ser PIV-3 (1,3%); 13 eren PIV-1 (1,3%) i 4 varen ser RV (<1%). Es van detectar 54 co-deteccions (5,5%) en les mostres positives. La figura 23 representa gràficament els resultats.

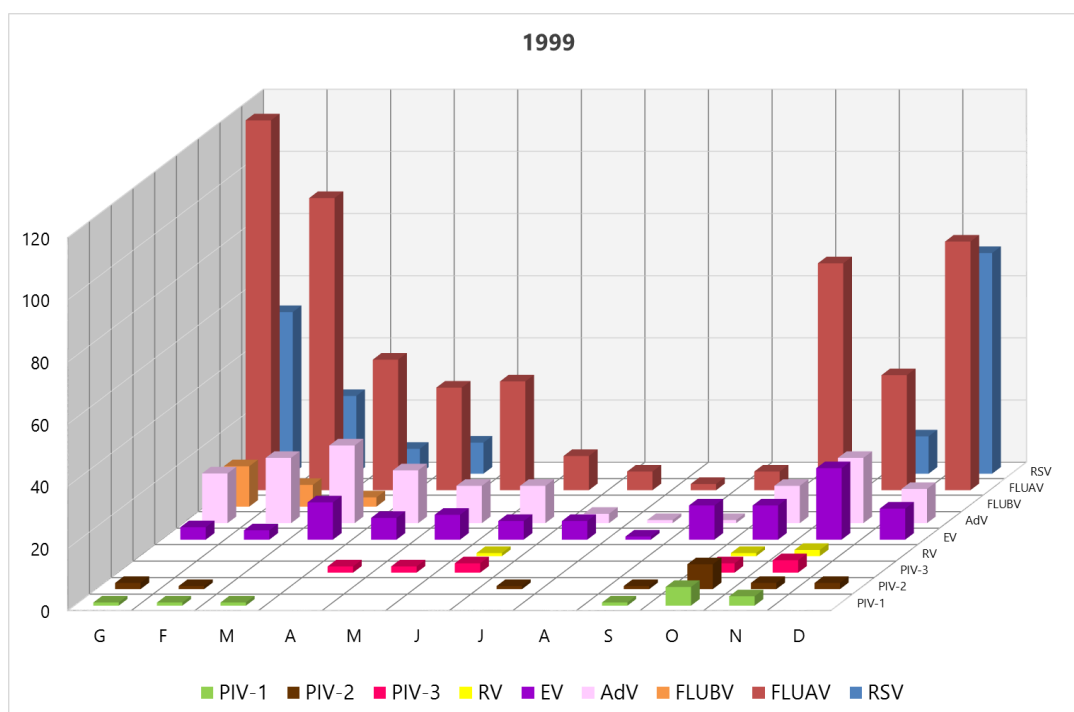


Figura 23

Virus detectats cada mes de l'any 1999.

Any 2000

Es van analitzar 2.045 mostres, de les quals 1.011 (49,4%) van resultar positives per un o més virus respiratori. En total es van detectar 1.081 (52,9%) virus respiratoris, dels quals: 610 eren FLUAV (56,4%); 313 eren RSV (29%); 68 eren AdV (6,3%); 66 eren EV (6,1%); 15 eren PIV-3 (1,4%); 7 eren PIV-1 (<1%); 1 eren PIV-2 (<1%); 1 eren FLUBV (<1%); i no es va detectar cap RV. Es van detectar 70 co-deteccions (6,9%) en les mostres positives. La figura 24 representa gràficament els resultats.

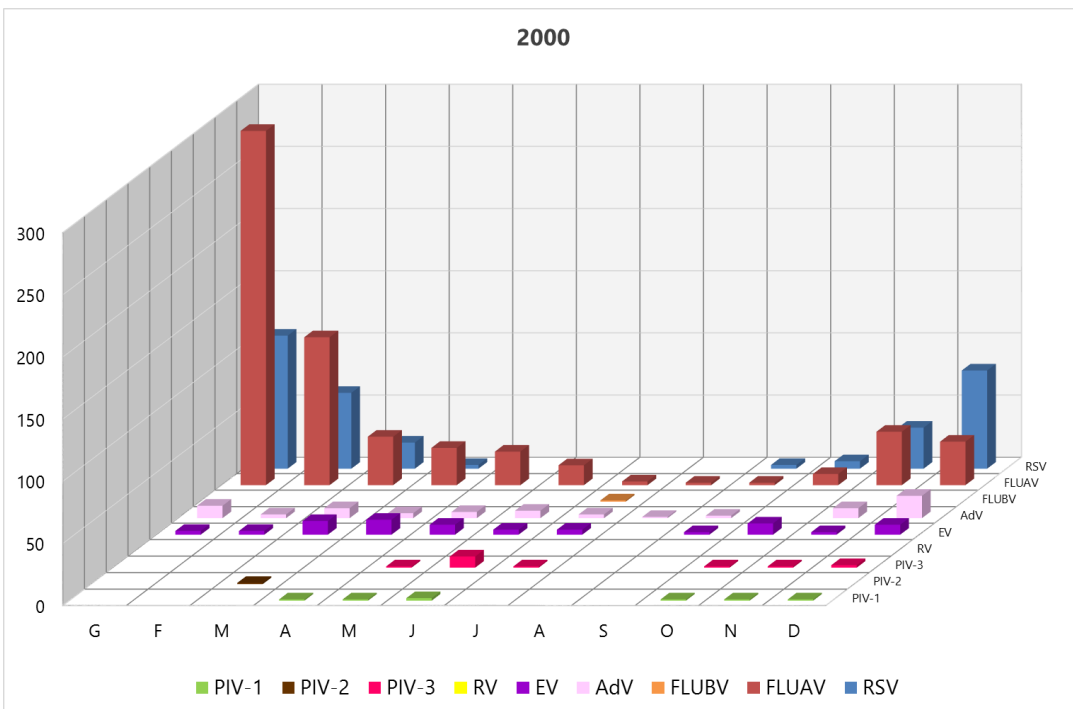


Figura 24

Virus detectats cada mes de l'any 2000.

Any 2001

Es van analitzar 1.930 mostres, de les quals 498 (25,8%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 519 (26,9%) virus respiratoris, dels quals: 201 eren RSV (38,7%); 104 eren EV (20%); 101 eren AdV (19,5%); 42 eren FLUAV (8,1%); 34 eren PIV-1 (6,6%); 19 eren PIV-3 (3,7%); 9 eren FLUBV (1,7%); 5 eren PIV-2 (1%) i 4 (<1%) eren RV. Es van detectar 21 co-deteccions (4,2%) en les mostres positives. La figura 25 representa gràficament els resultats.

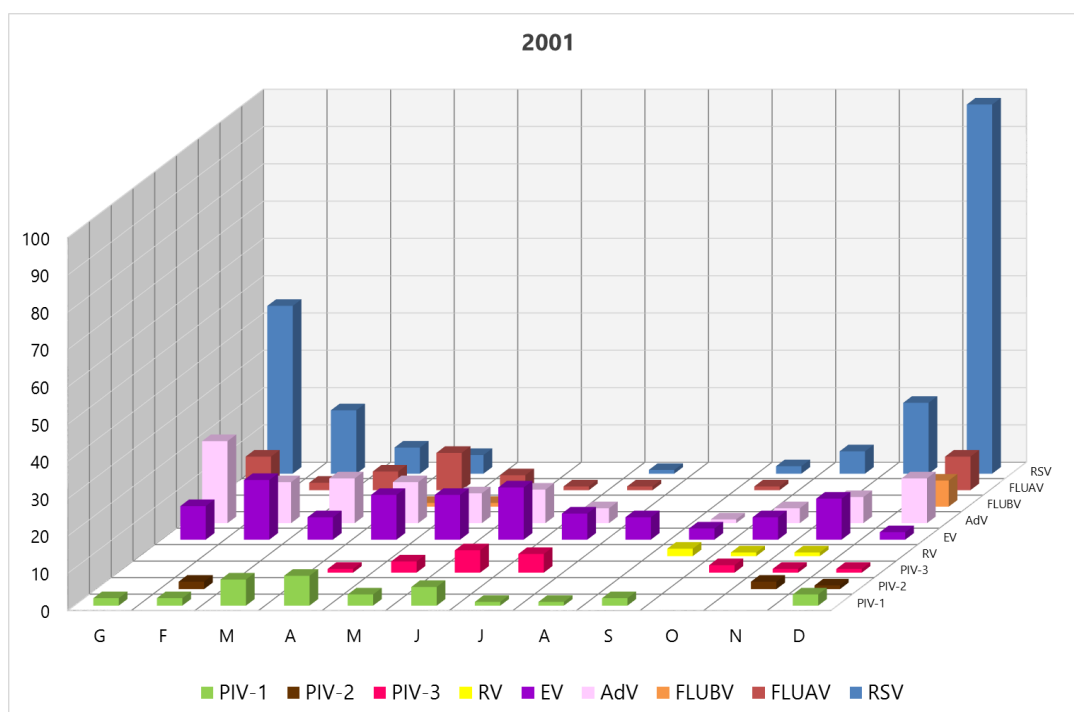


Figura 25

Virus detectats cada mes de l'any 2001.

Any 2002

Es van analitzar 1.936 mostres, de les quals 619 (32%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 638 (33%) virus respiratoris, dels quals: 265 eren RSV (41,5%); 89 eren FLUAV (13,9%); 81 eren EV (12,7%); 79 eren AdV (12,4%); 71 eren FLUBV (11,1%); 37 eren RV (5,8%); 8 eren PIV-3 (1,3%); 6 eren PIV-1 (<1%), 1 (<1%) va ser PIV-2 i 1 va ser PIV (<1%). Es van detectar 19 co-deteccions (3,1%) en les mostres positives. La figura 26 representa gràficament els resultats.

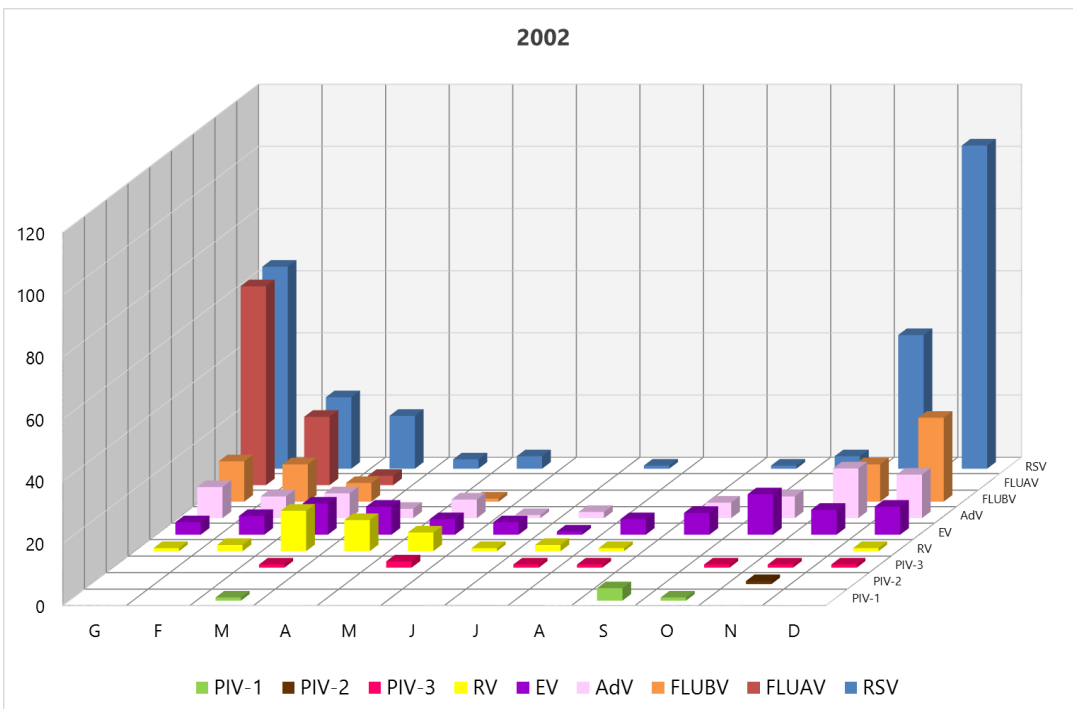


Figura 26

Viruses detectats cada mes de l'any 2002. No es mostra el cas de PIV.

Any 2003

Es van analitzar 2.265 mostres, de les quals 671 (29,6%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 707 (31,2%) virus respiratoris, dels quals: 230 eren RSV (32,5%); 216 eren FLUAV (30,6%); 122 eren AdV (17,3%); 71 eren EV (10%); 33 eren RV (4,7%); 14 eren PIV-3 (2%); 13 eren PIV-1 (1,8%); 4 eren PIV-2 (<1%), 3 eren FLUBV (<1%) i 1 va ser PIV (<1%). Es van detectar 36 co-deteccions (5,4%) en les mostres positives. La figura 27 representa gràficament els resultats.

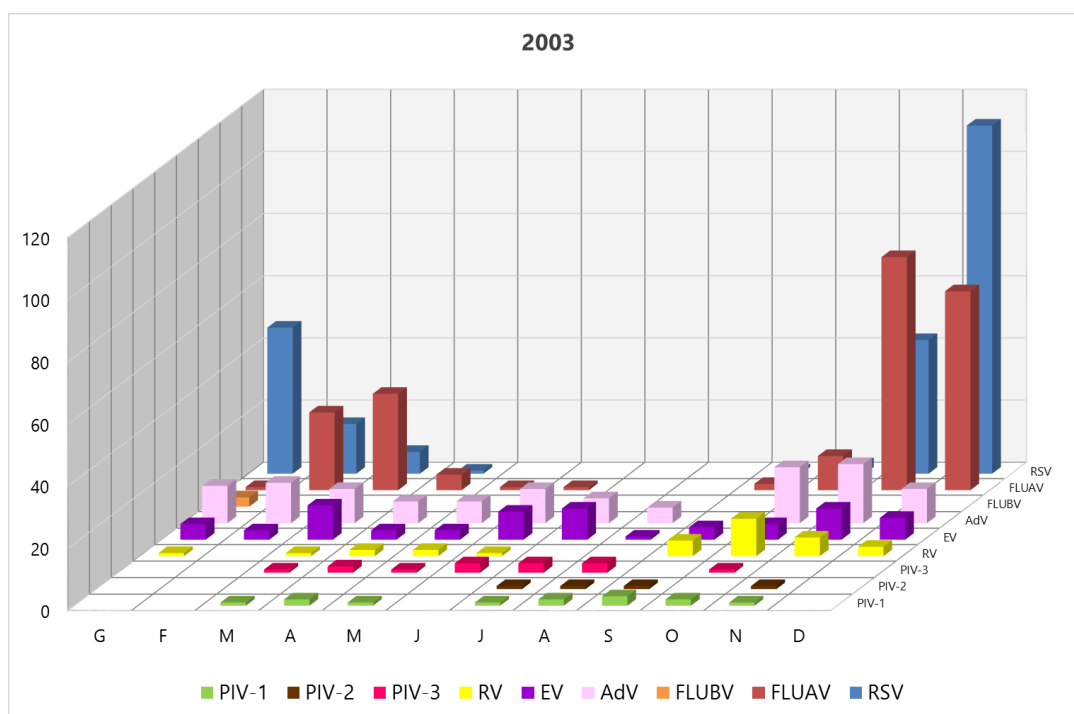


Figura 27

Virus detectats cada mes de l'any 2003. No es mostra el cas de PIV.

Any 2004

Es van analitzar 1.745 mostres, de les quals 479 (27,4%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 494 (28,3%) virus respiratoris, dels quals: 231 eren RSV (46,8%); 67 eren AdV (13,6%); 62 eren RV (12,6%); 51 eren EV (10,3%); 35 eren PIV-3 (7,1%); 28 eren PIV-1 (5,7%); 20 eren FLUAV (4%); i no es van detectar cap FLUBV ni PIV-2. Es van detectar 15 co-deteccions (3,1%) en les mostres positives. La figura 28 representa gràficament els resultats.

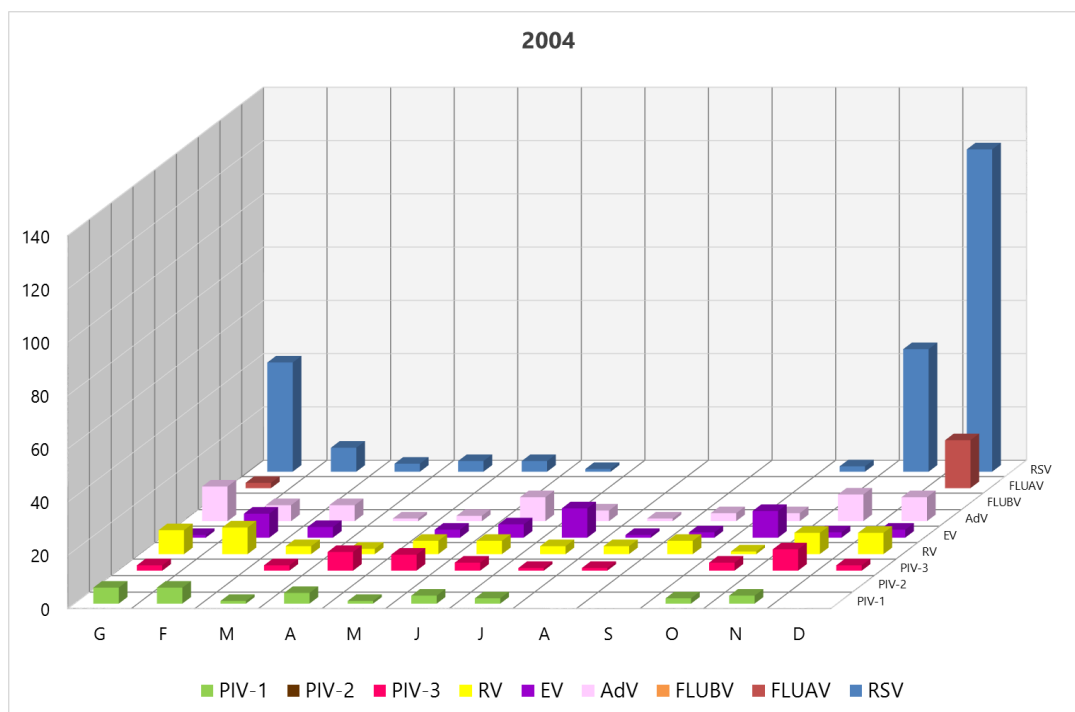


Figura 28

Viruses detectats cada mes de l'any 2004.

Any 2005

Es van analitzar 2.315 mostres, de les quals 803 (34,7%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 824 (35,6%) virus respiratoris, dels quals: 315 eren RSV (38,2%); 182 eren FLUAV (22,1%); 99 eren AdV (12%); 88 eren EV (10,7%); 56 van ser RV (6,8%); 41 eren FLUBV (5%); 21 van ser PIV-3 (2,5%); 13 eren PIV-1 (1,6%) i 9 varen ser PIV-2 (1,1%). Es van detectar 21 co-deteccions (2,6%) en les mostres positives. La figura 29 representa gràficament els resultats.

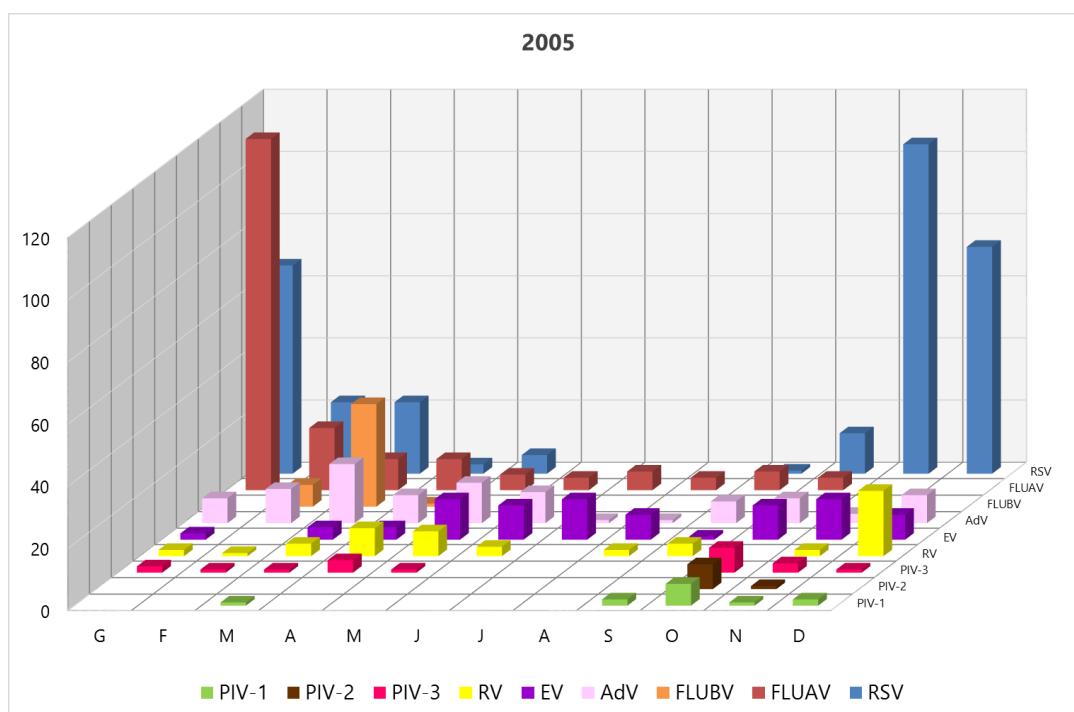


Figura 29

Virus detectats cada mes de l'any 2005.

Any 2006

Es van analitzar 2.077 mostres, de les quals 724 (34,9%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 741 (35,7%) virus respiratoris, dels quals: 266 eren RSV (35,9%); 133 eren AdV (17,9%); 112 eren FLUAV (15,1%); 84 eren EV (11,3%); 53 van ser PIV-3 (7,2%); 47 eren RV (6,3%); 44 van ser FLUBV (5,9%); 2 eren PIV-1 (<1%) i no es va detectar cap PIV-2. Es van detectar 17 co-deteccions (2,3%) en les mostres positives. La figura 30 representa gràficament els resultats.

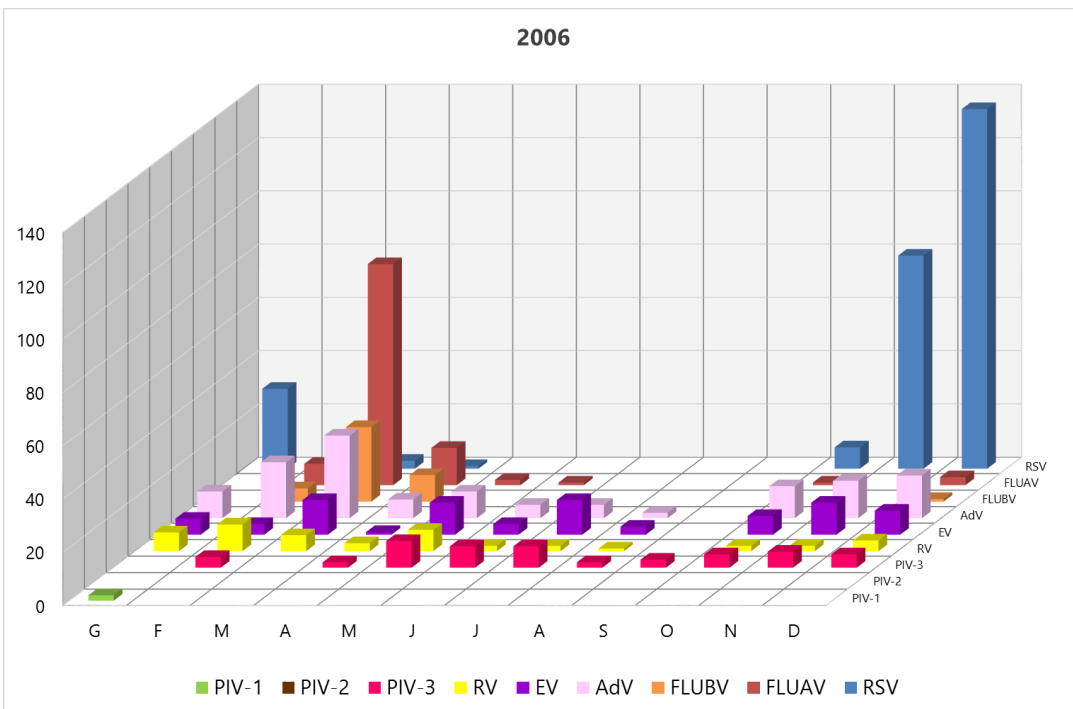


Figura 30

Viruses detectats cada mes de l'any 2006.

Any 2007

Es van analitzar 2.438 mostres, de les quals 944 (38,7%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 961 (39,4%) virus respiratoris, dels quals: 294 eren RSV (30,6%); 226 eren FLUAV (23,5%); 199 eren AdV (20,7%); 71 eren RV (7,4%); 66 van ser EV (6,9%); 58 eren FLUBV (6%); 26 van ser PIV-3 (2,7%); 15 eren PIV-2 (1,6%) i 6 varen ser PIV-1 (<1%). Es van detectar 17 co-deteccions (1,8%) en les mostres positives. La figura 31 representa gràficament els resultats.

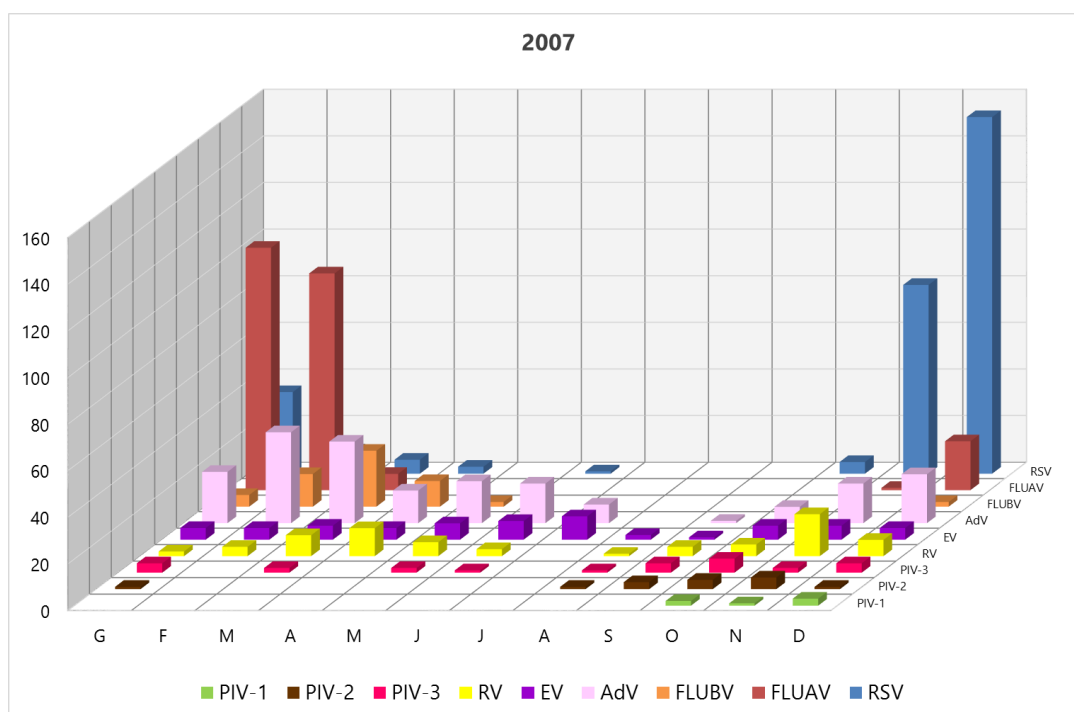


Figura 31

Virus detectats cada mes de l'any 2007.

Any 2008

Es van analitzar 2.131 mostres, de les quals 717 (33,6%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 730 (34,3%) virus respiratoris, dels quals: 284 eren RSV (38,9%); 126 eren AdV (17,3%); 86 eren FLUBV (11,8%); 81 eren FLUAV (11,1%); 81 van ser EV (11,1%); 32 eren PIV-3 (4,4%); 30 van ser RV (4,1%); 3 eren PIV-2 (<1%), 1 va ser PIV-1 (<1%) i 1 va ser PIV-4 (<1%). Al mes de desembre, es va iniciar la detecció de hMPV, i 5 deteccions van ser positives (<1%). Es van detectar 13 co-deteccions (1,8%) en les mostres positives. La figura 32 representa gràficament els resultats.

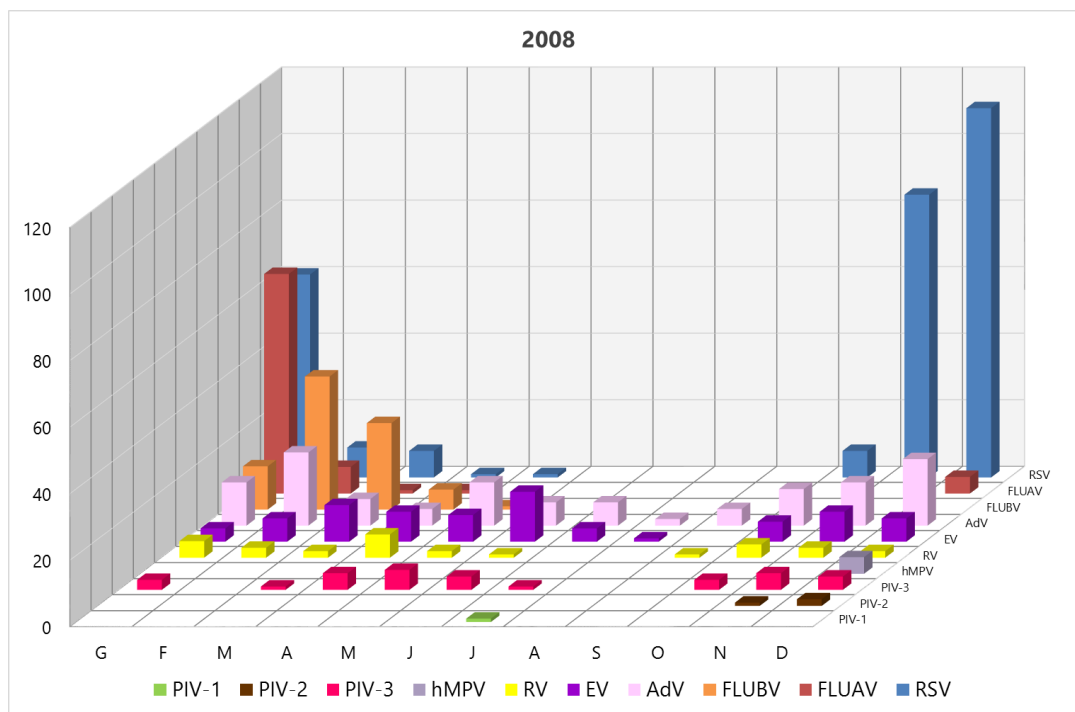


Figura 32

Virus detectats cada mes de l'any 2008. No es mostra el cas de PIV-4.

Any 2009

Es van analitzar 4.152 mostres, de les quals 1.522 (36,7%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 1.543 (37,2%) virus respiratoris, dels quals: 728 eren FLUAV (47,2%); 239 eren RSV (15,5%); 218 eren AdV (14,1%); 101 eren FLUBV (6,5%); 81 van ser EV (5,2%); 65 eren RV (4,2%); 60 van ser hMPV (3,9%); 28 van ser PIV-3 (1,8%); 15 eren PIV-2 (1%) i 8 varen ser PIV-1 (<1%). Es van detectar 21 co-deteccions (1,4%) en les mostres positives. La figura 33 representa gràficament els resultats.

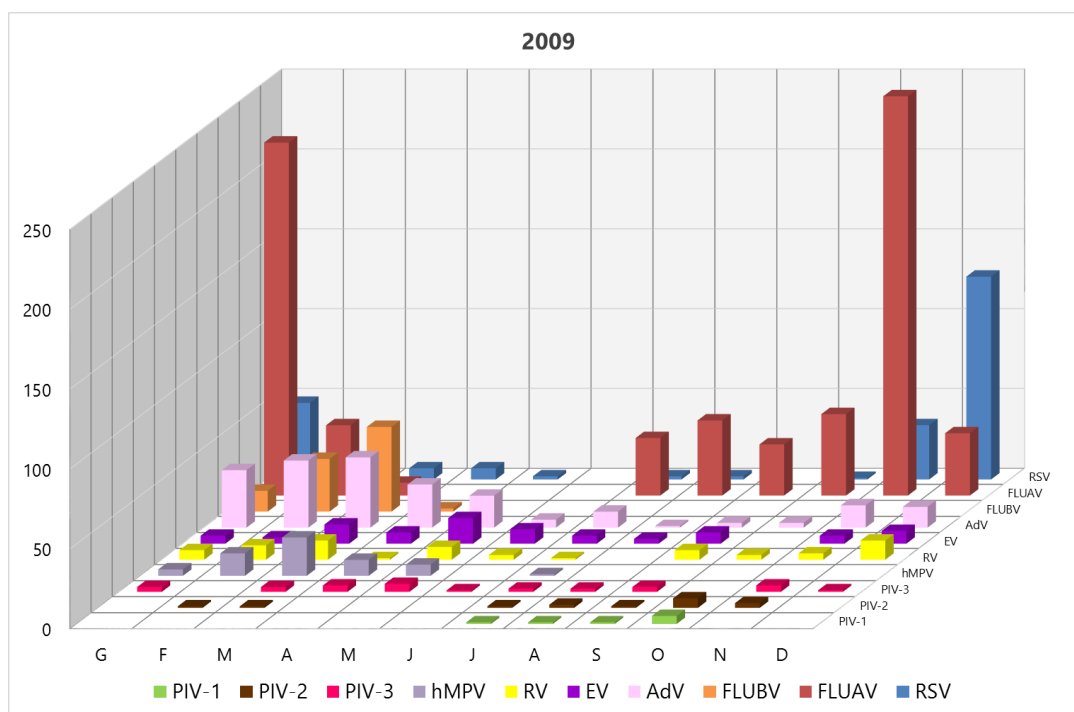


Figura 33

Virus detectats cada mes de l'any 2009.

Any 2010

Es van analitzar 2.246 mostres, de les quals 721 (32,1%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 735 (32,7%) virus respiratoris, dels quals: 208 eren RSV (28,3%); 132 eren AdV (18%); 130 eren FLUAV (17,7%); 120 eren EV (16,3%); 55 van ser RV (7,5%); 53 van ser hMPV (7,2%); 33 van ser PIV-3 (4,5%); 2 eren FLUBV (<1%); 1 era PIV-1 (<1%) i 1 va ser PIV-2 (<1%). Es van detectar 14 co-deteccions (1,9%) en les mostres positives. La figura 34 representa gràficament els resultats.

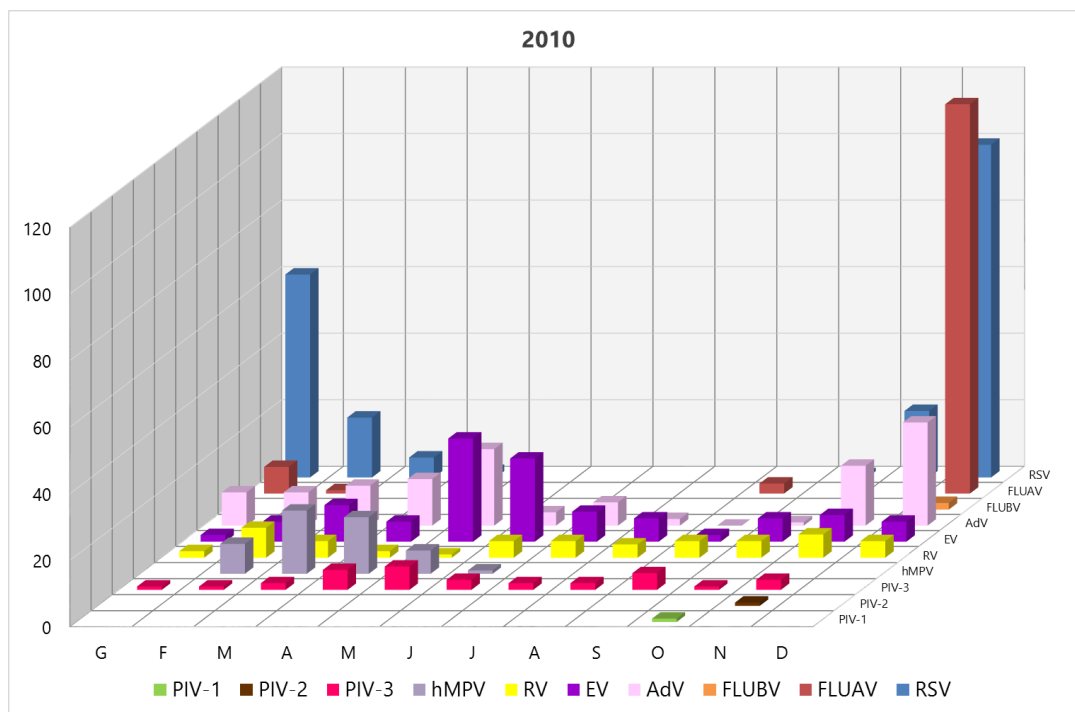


Figura 34

Viruses detectats cada mes de l'any 2010.

Any 2011

Es van analitzar 2.609 mostres, de les quals 911 (34,9%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 922 (35,3%) virus respiratoris, dels quals: 233 eren RSV (25,3%); 176 eren FLUBV (19,1%); 146 eren AdV (15,8%); 138 eren FLUAV (15%); 73 van ser hMPV (7,9%); 72 eren EV (7,8%); 46 van ser RV (5%); 33 van ser PIV-3 (3,6%); 3 eren PIV-1 (<1%) i 2 varen ser PIV-2 (<1%). Es van detectar 11 co-deteccions (1,2%) en les mostres positives. La figura 35 representa gràficament els resultats.

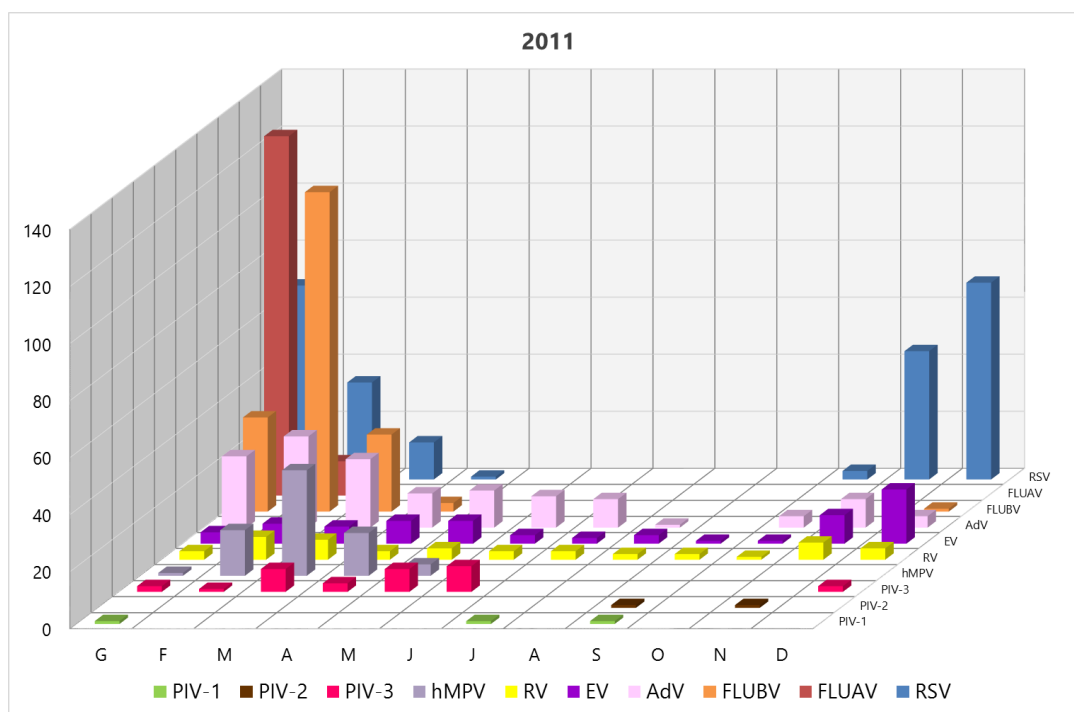


Figura 35

Virus detectats cada mes de l'any 2011.

Any 2012

Es van analitzar 2.047 mostres, de les quals 698 (34,1%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 706 (34,5%) virus respiratoris, dels quals: 308 eren FLUAV (43,6%); 115 eren RSV (16,3%); 83 eren AdV (11,8%); 54 van ser RV (7,6%); 52 eren FLUBV (7,4%); 46 eren EV (6,5%); 25 van ser hMPV (3,5%); 21 van ser PIV-3 (3%); 2 varen ser PIV-2 (<1%) i no es va detectar cap PIV-1. Es van detectar 8 co-deteccions (1,1%) en les mostres positives. La figura 36 representa gràficament els resultats.

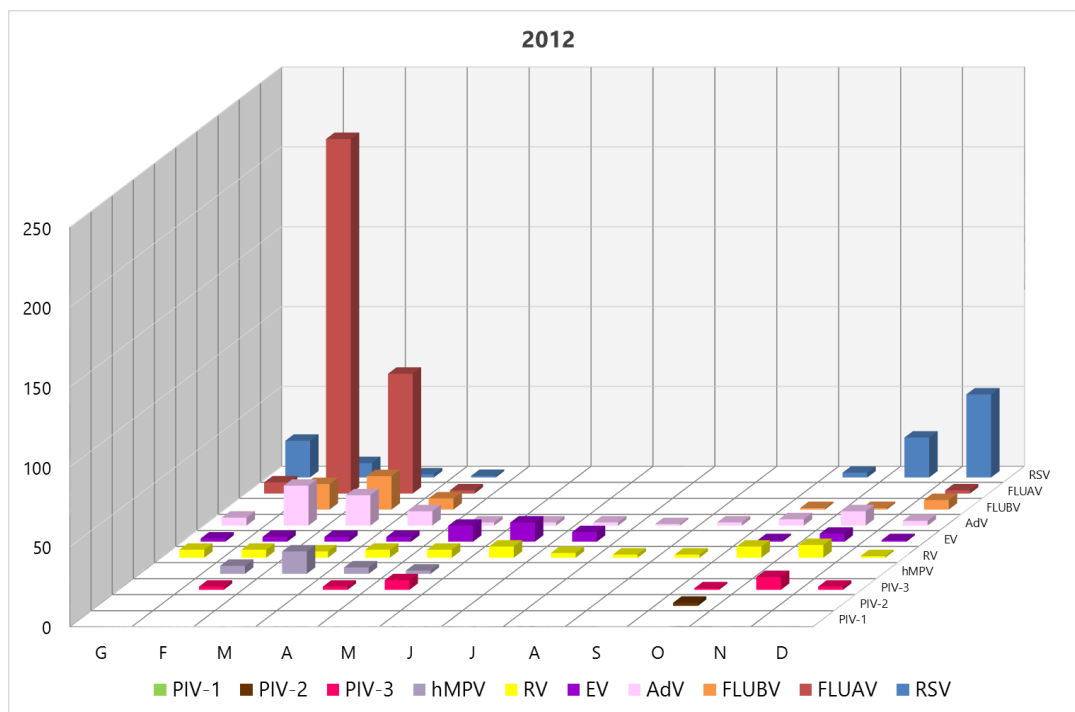


Figura 36

Virus detectats cada mes de l'any 2012.

Any 2013

Es van analitzar 2.088 mostres, de les quals 620 (29,7%) van resultar positives per un o més virus respiratoris. En total es van detectar 630 (30,2%) virus respiratoris, dels quals: 208 eren FLUBV (33%); 109 eren RSV (17,3%); 91 eren AdV (14,4%); 89 eren FLUAV (14,1%); 37 eren RV (5,9%); 31 van ser PIV-3 (4,9%); 27 van ser EV (4,3%); 22 van ser hMPV (3,5%); 13 eren PIV-1 (2,1%), 2 varen ser PIV-2 (<1%) i 1 va ser PIV-4. Es van detectar 10 co-deteccions (1,6%) en les mostres positives. La figura 37 representa gràficament els resultats.

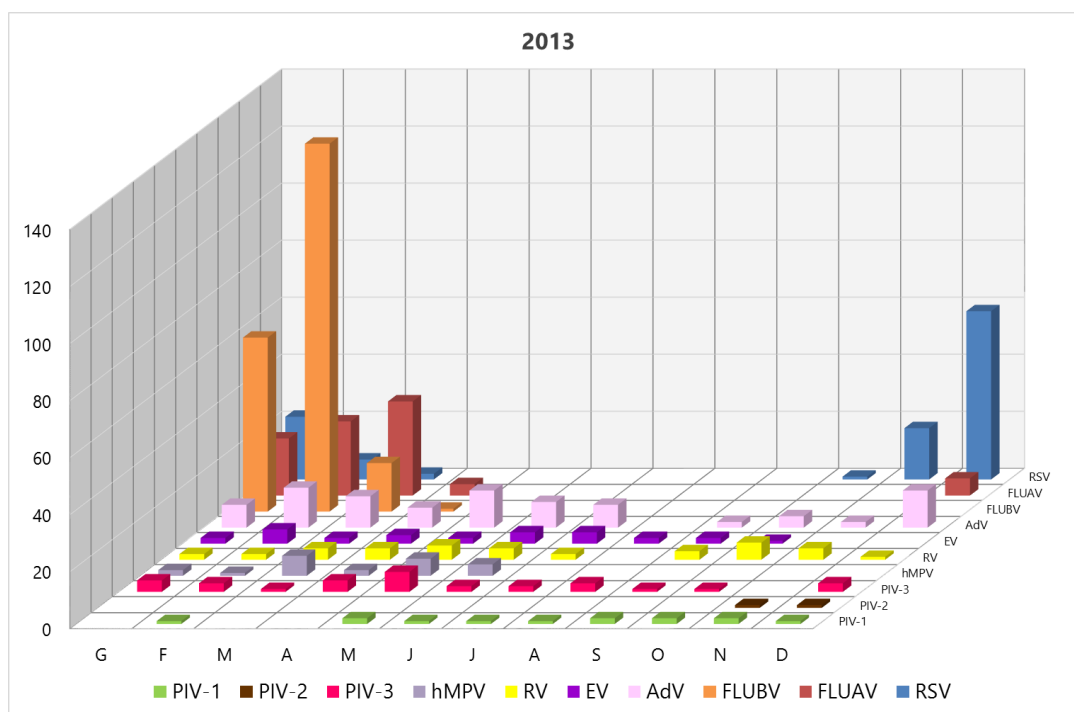


Figura 37

Virus detectats cada mes de l'any 2013. No es mostra el cas de PIV-4.

Els virus RSV, FLUAV, AdV, EV i PIV-3 es van detectar durant tots els anys de l'estudi. Els RSV va tenir una taxa de detecció que va variar del 15,5 al 46,8% durant els 17 anys d'estudi. Aquestes taxes de detecció van ser significativament més altes als anys 2004 i 1997 ($p < 0,001$), mentre que van ser significativament més baixes als anys 2009 i 2002 ($p < 0,001$). El RSV es va detectar durant tots els anys, i va estar present en sis de cada 12 mesos de l'any. La representació gràfica de la distribució de tots els casos de RSV durant els 17 anys d'estudi es mostra a la figura 38 (1997-2005) i a la figura 39 (2005-2013).

En el cas del FLUAV, la seva taxa de detecció va variar del 4 al 56,4% dels virus detectats durant els 17 anys d'estudi. Aquestes taxes van ser significativament més altes als anys 2000, 1999 i 2009 respectivament, mentre que van ser significativament més baixes als anys 2004, 1997 i 2001, respectivament ($p < 0,001$). El FLUAV es va detectar durant tots els anys, i estaven presents aproximament quatre o cinc mesos durant l'any, tret de períodes on es van detectar ininterrompudament durant molts mesos seguits: entre novembre de 1997 i fins juny de 2001; entre desembre de 2004 i fins octubre de 2005; i entre juliol de 2009 i fins febrer del 2010. Durant dos períodes als anys 1997 i 2004, no es va detectar FLUAV durant un període de 10 mesos al 1997 i 11 mesos al 2004. La representació gràfica de la distribució de tots els casos de FLUAV durant els 17 anys d'estudi es mostra a la figura 38 (1997-2005) i a la figura 39 (2005-2013).

Els AdV van tenir una taxa de detecció que va variar del 6,3 al 20,7% dels virus detectats durant els 17 anys d'estudi. Aquesta taxa va ser significativament més alta l'any 2007, mentre que va ser significativament més baixa l'any 2000 ($p < 0,001$). L'AdV va estar present de 10 a els 12 mesos de l'any. La representació gràfica de la distribució de tots els casos d'AdV durant els 17 anys d'estudi es mostra a la figura 40 (1997-2005) i a la figura 41 (2005-2013). Els EV tenien una distribució com els AdV. La seva taxa de detecció va variar del 4,3 al 20% dels virus detectats durant els 17 anys d'estudi. Aquestes taxes van ser significativament més altes als anys 2001 i 2010, mentre que van ser significativament més baixes als anys 2013 i 2009, respectivament ($p < 0,001$). Aquests virus van estar presents de 10 a 12 mesos l'any. La representació gràfica de la distribució de tots els casos d'EV durant els 17 anys d'estudi es mostra a la figura 40 (1997-2005) i a la figura 41 (2005-2013). En el cas dels PIV-3, també van tenir una distribució al llarg de tot l'any. La seva taxa de detecció va variar del 1,3 al 7,2% dels virus detectats durant els 17 anys d'estudi. Aquestes taxes van ser significativament més altes als anys 2006 i 2004 respectivament, mentre que van ser significativament més baixes als anys 1999, 2002 i 2000,

respectivament ($p < 0,001$). Aquests virus van estar presents de 5 a 11 mesos l'any. La representació gràfica de la distribució de tots els casos de PIV-3 durant els 17 anys d'estudi es mostra a la figura 42 (1997-2005) i a la figura 43 (2005-2013).

La detecció de hMPV es va iniciar al desembre del 2008 i des de la seva incorporació es va detectar tots els anys amb una taxa de detecció que va variar del 3,5 al 7,9% dels virus detectats durant 5 anys sencers d'estudi. Aquesta taxa va ser significativament més alta l'any 2011 ($p < 0,001$). El hMPV va estar present en sis de cada 12 mesos de l'any. La representació gràfica de la distribució de tots els casos de hMPV durant 5 anys d'estudi es mostra a la figura 44 (2005-2013).

La resta de virus respiratoris no es van detectar tots els anys d'estudi. En el cas del FLUBV no es va detectar durant l'any 2004. La seva taxa de detecció va variar del 0,1 al 33% dels virus detectats durant els 17 anys d'estudi. Aquestes taxes van ser significativament més altes als anys 2013 i 2011 respectivament, mentre que van ser significativament més baixes als anys 2000, 2010 i 2003, respectivament ($p < 0,001$). El FLUBV estava present aproximament quatre o cinc mesos durant l'any, tret de períodes on la detecció va ser molt baixa, i només es van detectar un pocs casos: vuit casos des d'abril de 1997 fins novembre de 1998; tres casos des d'abril de 1999 fins novembre de 2001; tres casos durant l'any 2003; i dos únics casos l'any 2010. La representació gràfica de la distribució de tots els casos de FLUBV durant els 17 anys d'estudi es mostra a la figura 38 (1997-2005) i a la figura 39 (2005-2013).

Els RV, no es van detectar els anys 1997 i 2000. La seva taxa de detecció va variar del 0,1 al 12,6% dels virus detectats durant els 17 anys d'estudi. Aquestes taxes van ser significativament més altes als anys 2004, 2010 i 2007, respectivament, mentre que van ser significativament més baixes als anys 1998, 1999 i 2001 ($p < 0,001$). Aquests virus van estar presents de 10 a 12 mesos l'any, tret del període comprès entre 1997 i 2001 on només es van detectar nou casos en 5 anys (incloent els anys sense deteccions). La representació gràfica de la distribució de tots els casos dels RV durant els 17 anys d'estudi es mostra a la figura 40 (1997-2005) i a la figura 41 (2005-2013).

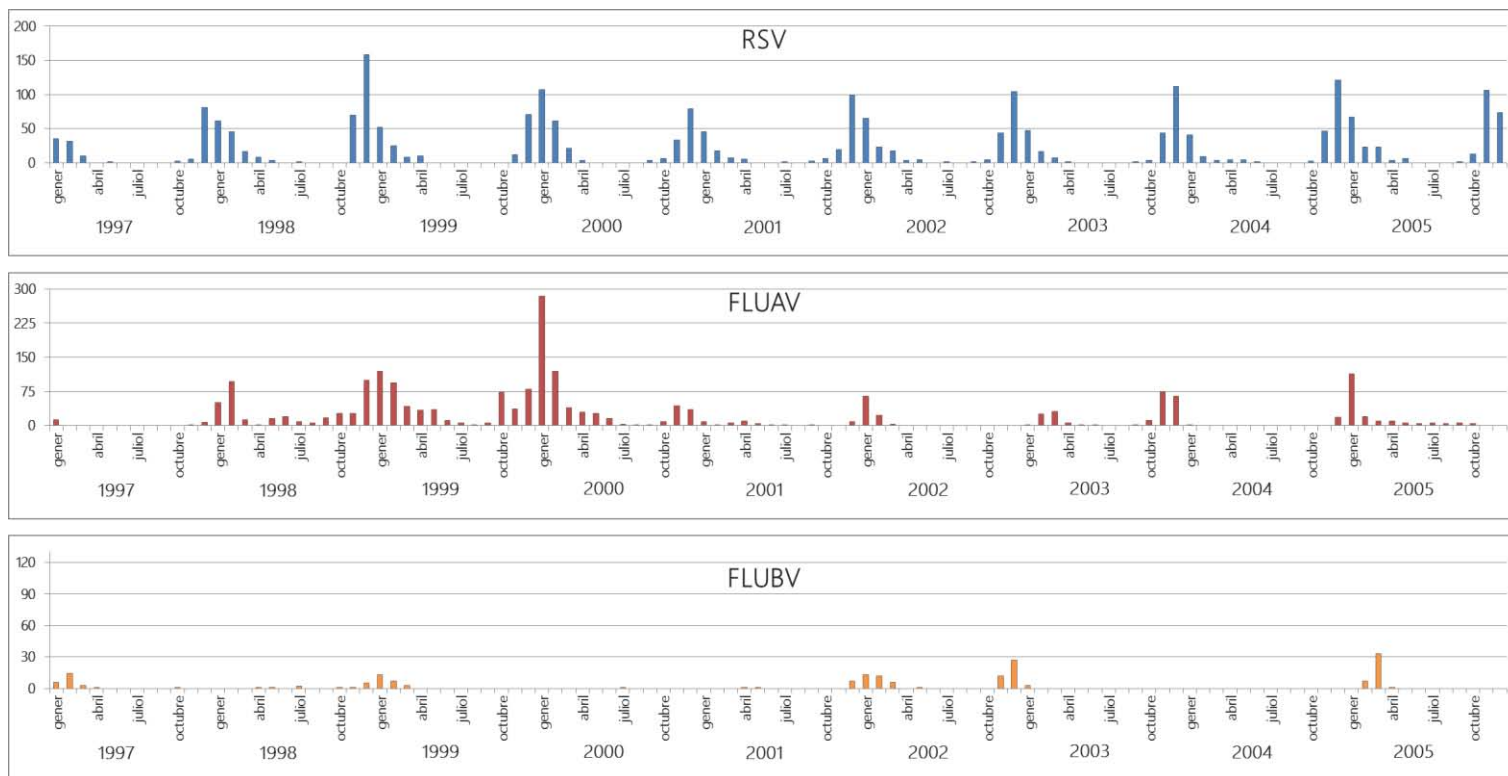


Figura 38

Distribució dels RSV, FLUAV i FLUBV detectats. Es mostren la seqüència d'anys de 1997 fins 2005.

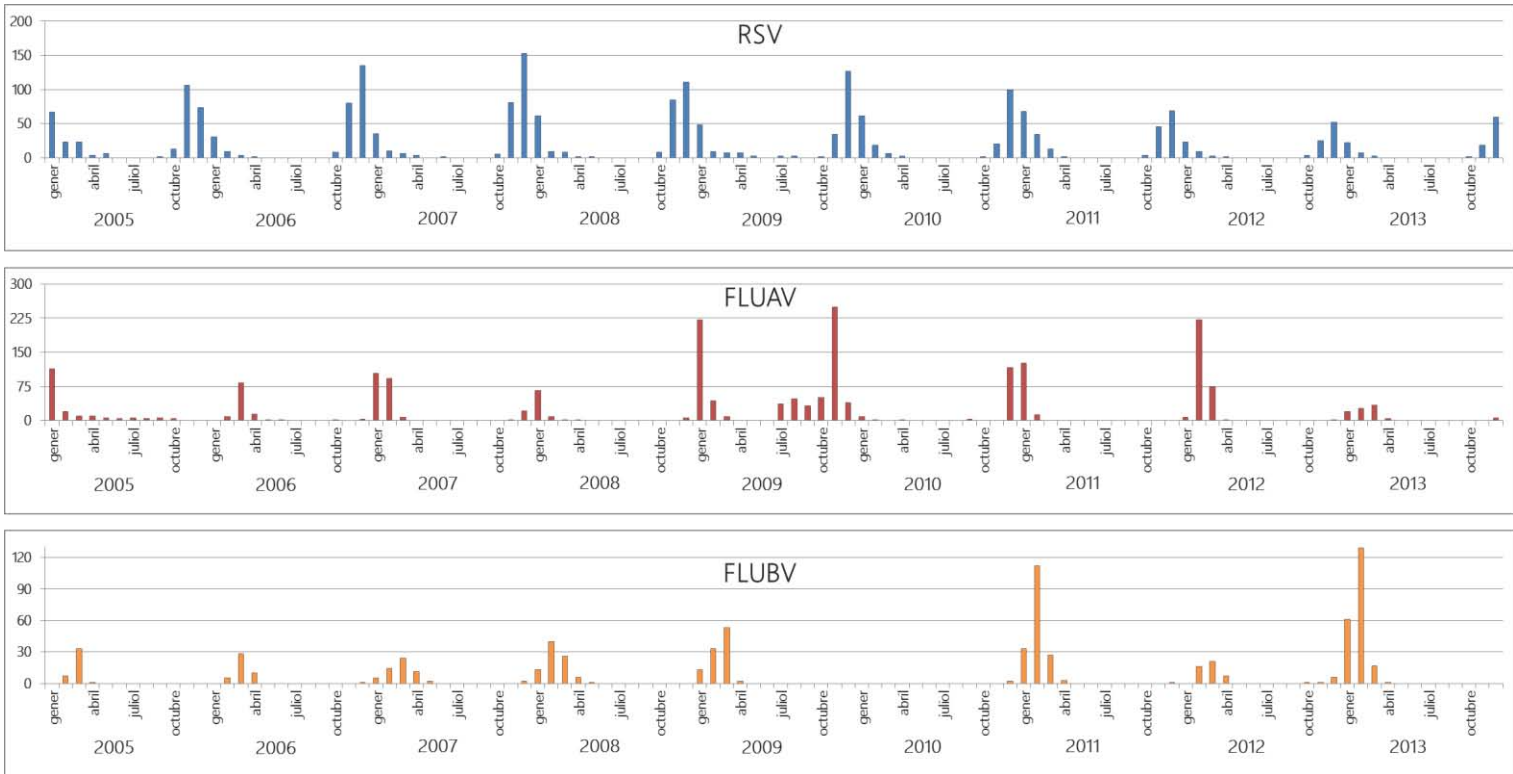


Figura 39

Distribució dels RSV, FLUAV i FLUBV detectats. Es mostren la seqüència d'anys de 2005 fins 2013.

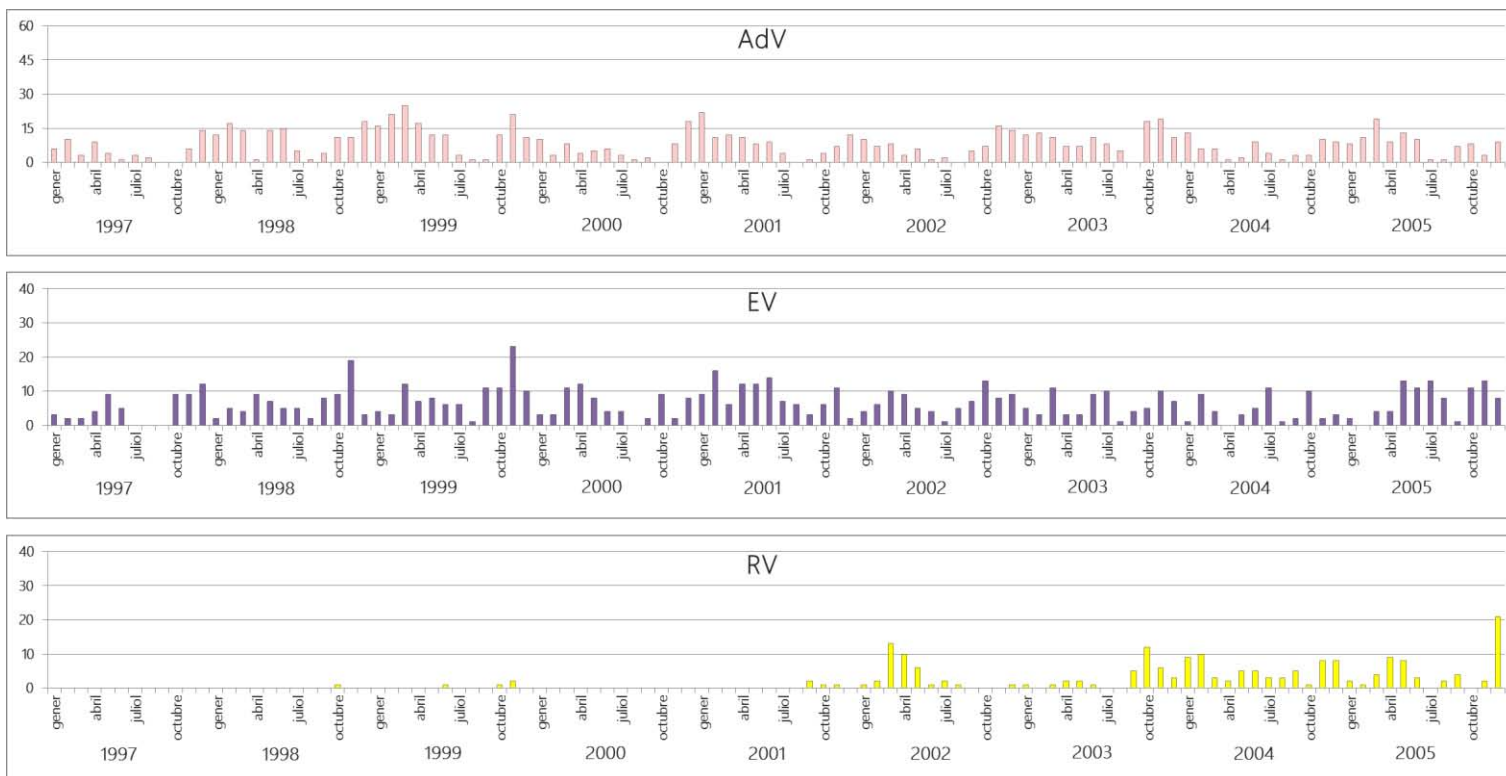


Figura 40

Distribució dels AdV, EV i RV detectats. Es mostren la seqüència d'anys de 1997 fins 2005.

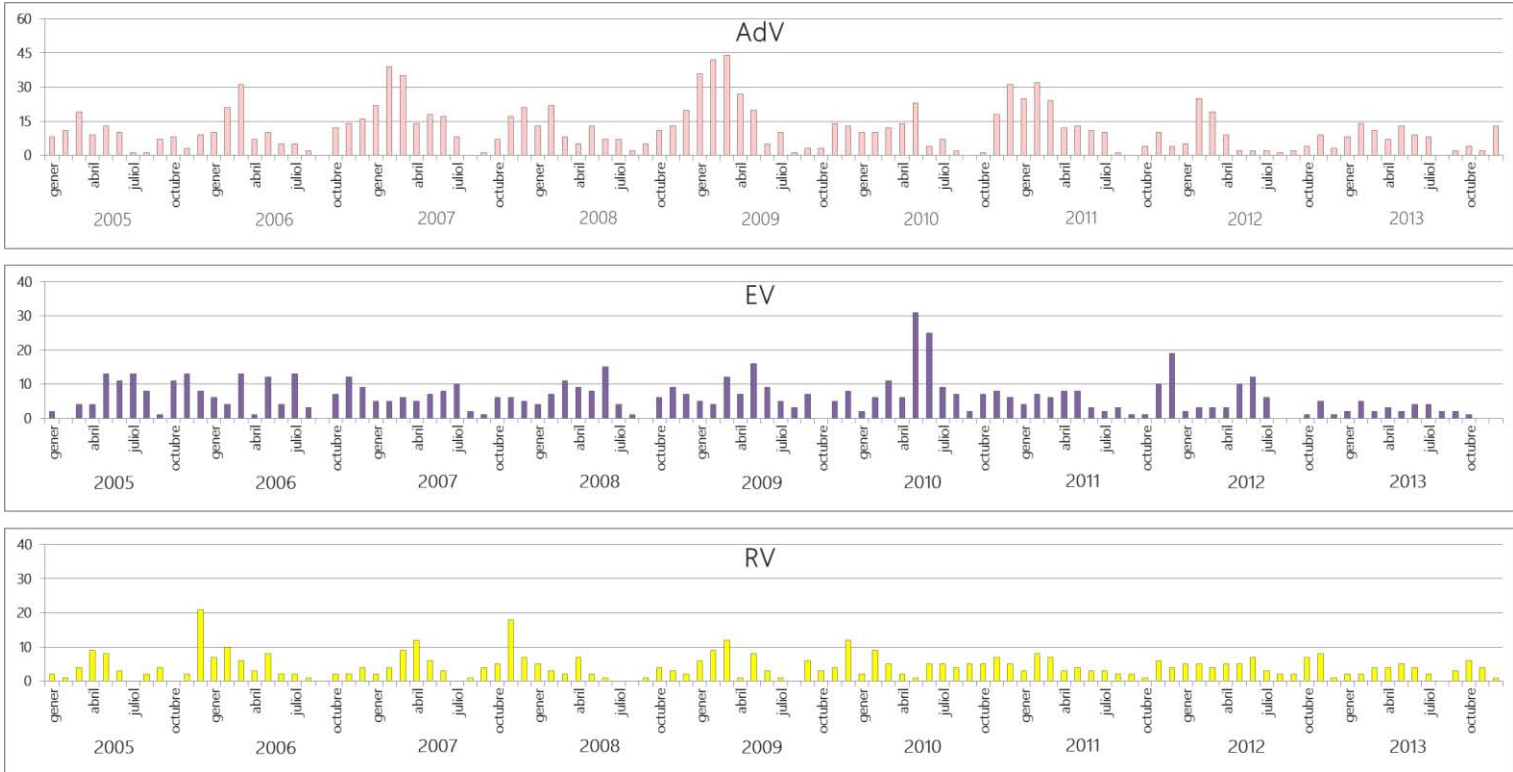


Figura 41

Distribució dels AdV, EV i RV detectats. Es mostren la seqüència d'anys de 2005 fins 2013.

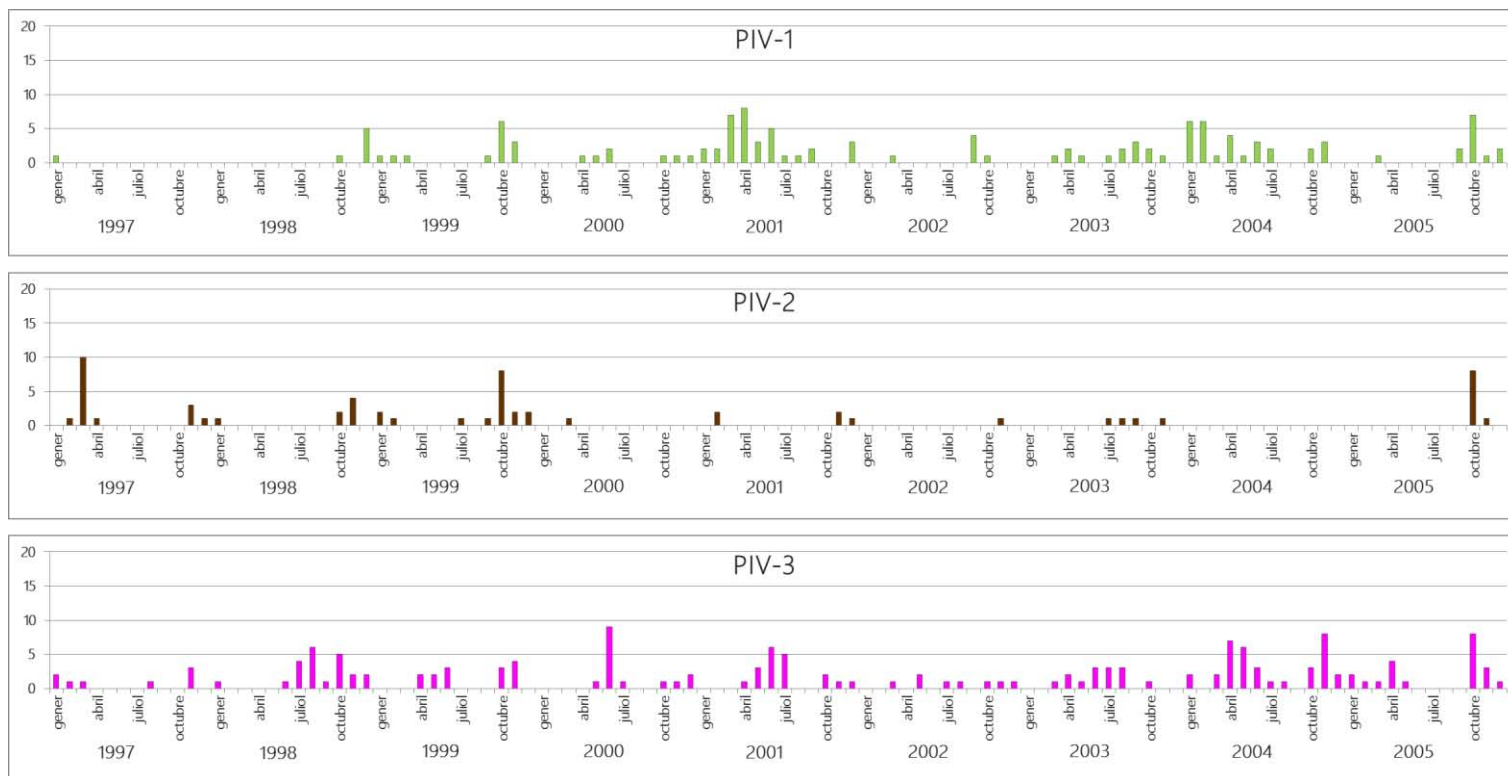


Figura 42

Distribució dels PIV-1, PIV-2 i PIV-3 detectats. Es mostren la seqüència d'anys de 1997 fins 2005.

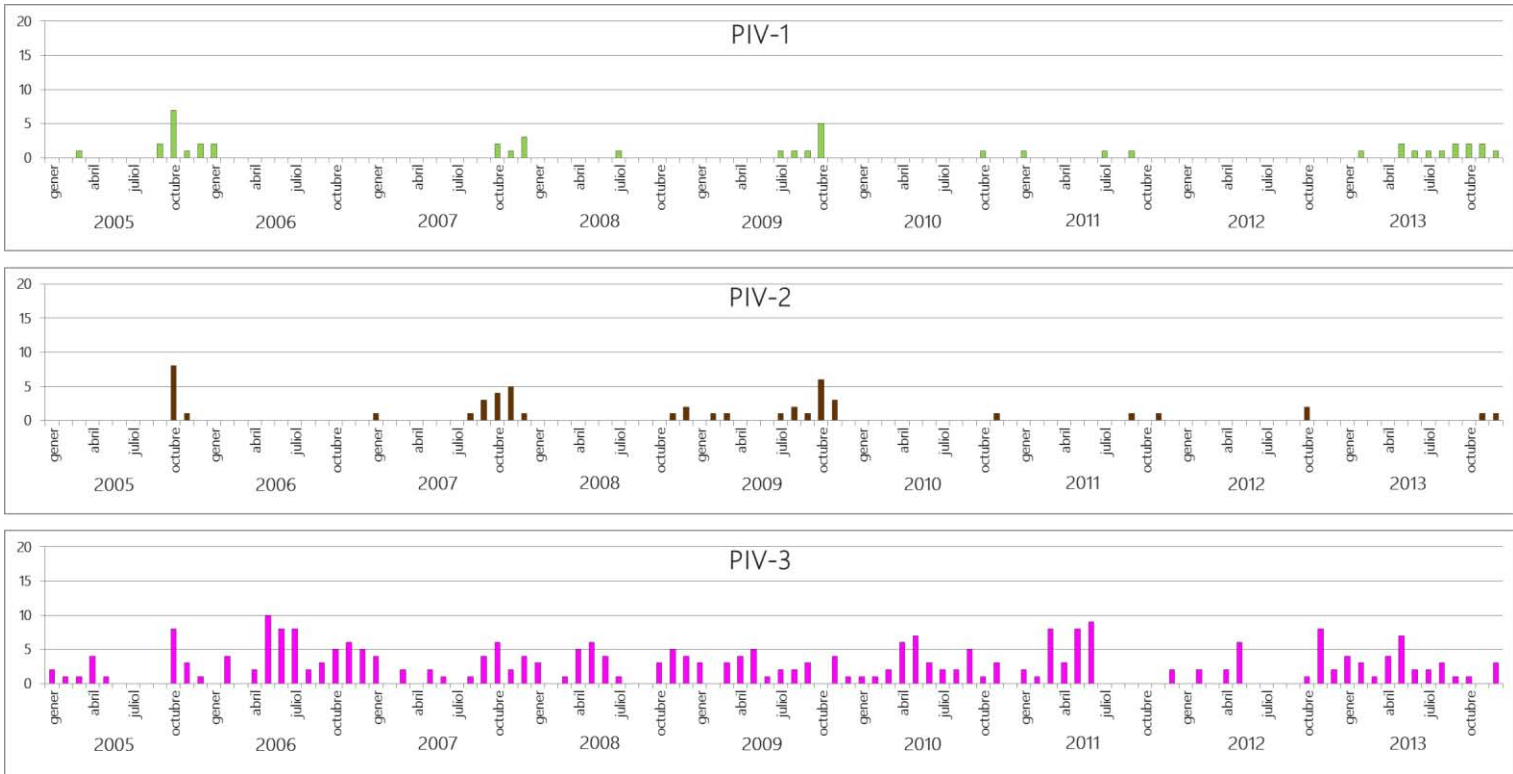


Figura 43

Distribució dels PIV-1, PIV-2 i PIV-3 detectats. Es mostren la seqüència d’anys de 2005 fins 2013.

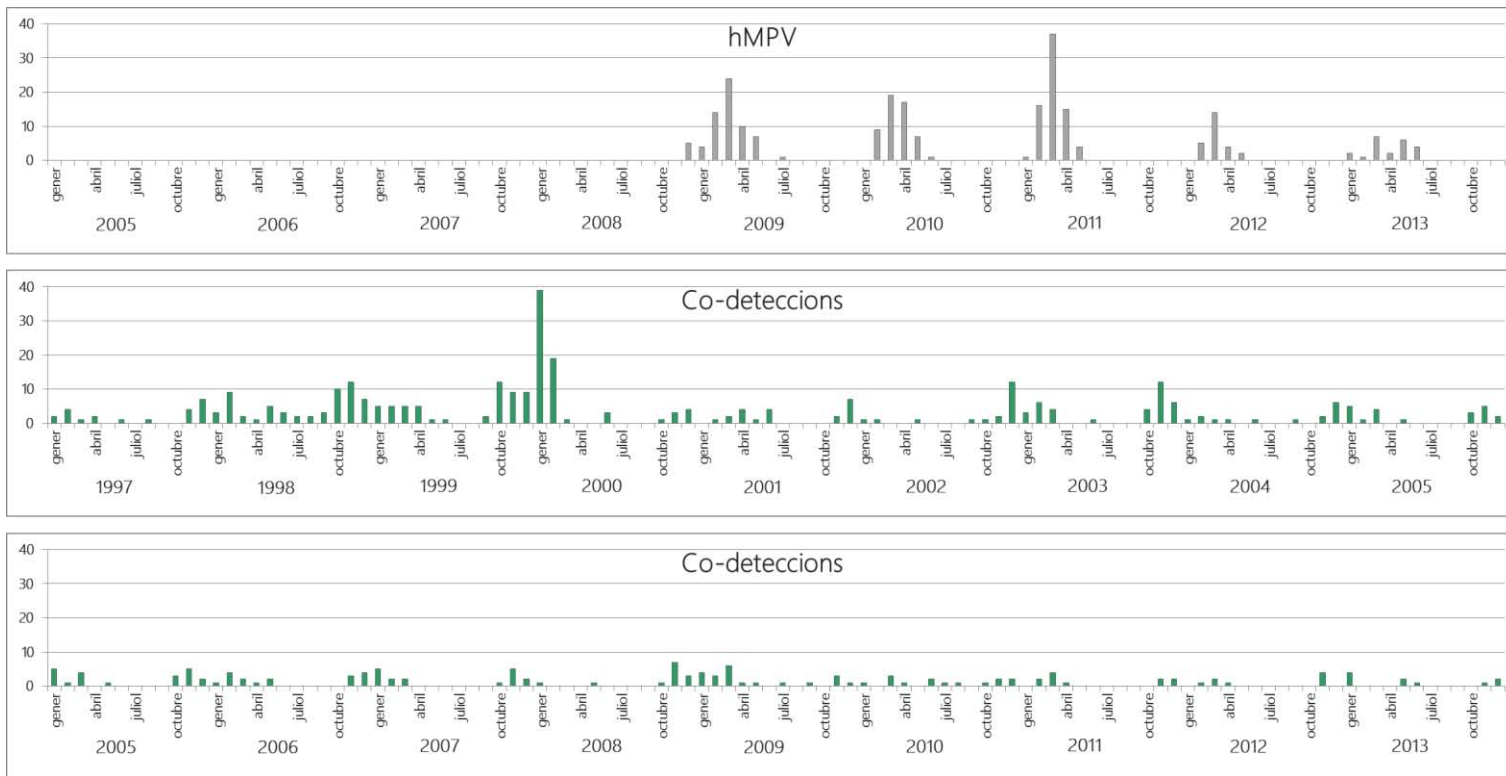


Figura 44

Distribució dels hMPV i les co-deteccions detectades. Es mostren la seqüència d'anys de 2005 fins 2013 pels hMPV, i de 1997 fins 2013 per les co-deteccions.

Els virus PIV-1 no es van detectar durant l'any 2012. La seva taxa de detecció va variar del 0,1 al 6,6% dels virus detectats durant els 17 anys d'estudi. Aquestes taxes van ser significativament més altes als anys 2001 i 2004 que en la resta d'anys estudiats ($p < 0,001$). Aquests virus podien estar presents de 5 a 10 mesos l'any, com no detectar-se durant períodes de 16 a 20 mesos.

Els PIV-2 no es van detectar durant els anys 2004 i 2006, i la seva taxa de detecció va variar del 0,1 al 4,4% dels virus detectats. Aquestes taxes van ser significativament més altes als anys 1997, 1999 i 2007 ($p < 0,001$). El PIV-2 podia estar present en cinc de cada 12 mesos de l'any, així com detectar-se només durant un o dos mesos de l'any.

La representació gràfica de la distribució de tots els casos de PIV-1 i PIV-2 durant els 17 anys d'estudi es mostra a la figura 42 (1997-2005) i a la figura 43 (2005-2013).

Els casos de deteccions múltiples es van detectar durant tots els anys de l'estudi. La taxa de co-detecció va variar del 1,1 al 6,9% de les mostres positives durant els 17 anys d'estudi. Aquestes taxes van ser significativament més altes als anys 2000, 1997 i 1998 respectivament, mentre que van ser significativament més baixes als anys 2012, 2011, i 2009 ($p < 0,001$). La representació gràfica de la distribució de totes les co-detecció durant els 17 anys d'estudi es mostra a la figura 44.

Distribució estacional dels virus respiratoris

Per avaluar l'estacionalitat dels diferents virus respiratoris al llarg de l'any es van agrupar el total de casos en mesos. La distribució estacional de tots els virus respiratoris detectats es mostra a la figura 45, on s'han distribuït els mesos de juliol a juny per poder observar gràficament els pics epidèmics del hivern.

Els mesos amb més deteccions positives per virus respiratoris van ser els mesos d'hivern i els de menys, els mesos d'estiu, a l'igual que la distribució de les mostres estudiades (veure figura 45). Alguns virus presentaven una distribució estacional en forma d'onades amb pics en mesos concrets, i altres virus es detectaven al llarg de tot l'any.

El total dels virus respiratoris detectats segon els mesos i la seva representació gràfica individual es mostren a la taula 24 i la figura 46.

Taula 24

Distribució mensual dels virus respiratoris detectats durant el període d'estudi.

VIRUS ^a	G	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Total
RSV	868 21,7%	355 8,9%	159 4,0%	53 < 1%	21 < 1%	2 < 1%	5 < 1%	2 < 1%	8 < 1%	66 1,6%	765 19,1%	1.704 42,5%	4.008
FLUAV	1.208 30,9%	793 20,3%	349 8,9%	111 2,8%	90 2,3%	54 1,4%	61 1,6%	61 1,6%	69 1,8%	176 4,5%	435 11,1%	505 12,9%	3.912
FLUBV	160 17,6%	389 42,7%	241 26,5%	44 4,8%	6 < 1%	0	3 < 1%	0	0	3 < 1%	14 1,5%	51 5,6%	911
AdV	238 11,9%	304 15,2%	290 14,5%	157 7,9%	183 9,2%	134 6,7%	90 4,5%	21 1,1%	36 1,8%	109 5,5%	198 9,9%	237 11,9%	1.997
EV	63 4,9%	88 6,9%	128 10,1%	102 8,0%	162 12,7%	143 11,2%	110 8,6%	45 3,5%	51 4,0%	112 8,8%	152 11,9%	117 9,2%	1.273
RV	45 7,5%	63 10,5%	70 11,6%	60 10,0%	60 10,0%	39 6,5%	21 3,5%	16 2,7%	39 6,5%	49 8,1%	71 11,8%	69 11,5%	602
hMPV ^b	7 2,9%	45 18,9%	101 42,4%	48 20,2%	26 10,9%	5 2,1%	1 < 1%	0	0	0	0	5 2,1%	238
PIV-1	13 8,4%	10 6,5%	12 7,7%	15 9,7%	8 5,2%	11 7,1%	8 5,2%	5 3,2%	16 10,3%	30 19,4%	12 7,7%	15 9,7%	155
PIV-2	4 4,0%	5 5,0%	12 12,0%	1 1,0%	0	0	3 3,0%	4 4,0%	7 7,0%	30 30,0%	26 26,0%	8 8,0%	100
PIV-3	24 5,8%	13 3,1%	23 5,6%	42 10,2%	67 16,2%	53 12,8%	30 7,3%	22 5,3%	17 4,1%	41 9,9%	51 12,3%	30 7,3%	413
PIV	1 5,3%	8 42,1%	0	3 15,8%	3 15,8%	0	0	1 5,3%	0	0	2 10,5%	1 5,3%	19
PIV-4	0	0	0	1 50%	0	0	0	0	0	0	1 50%	0	2
Total	2.631	2.073	1.385	637	626	441	332	177	243	616	1.727	2.742	13.630

^a El percentatge està calculat sobre el total de cadascun dels virus. ^b Inici de la detecció al desembre de 2008.

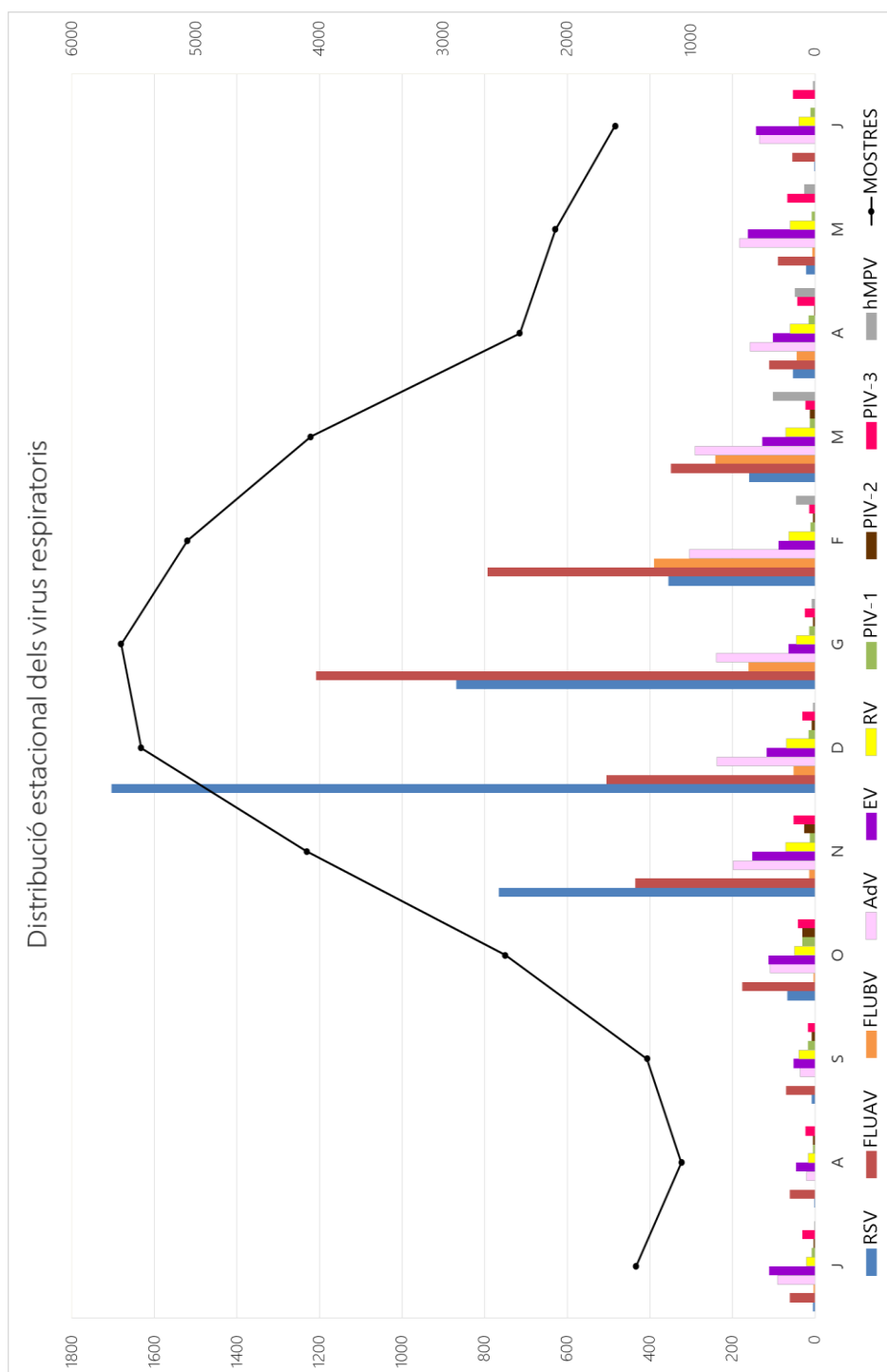


Figura 45

Distribució estacional del total de virus respiratoris detectats. Els virus i les mostres dels 17 anys d'estudi s'han agrupat per mesos de juliol a juny. L'escala esquerra correspon al número de virus detectats i l'escala dreta correspon amb el número de mostres.

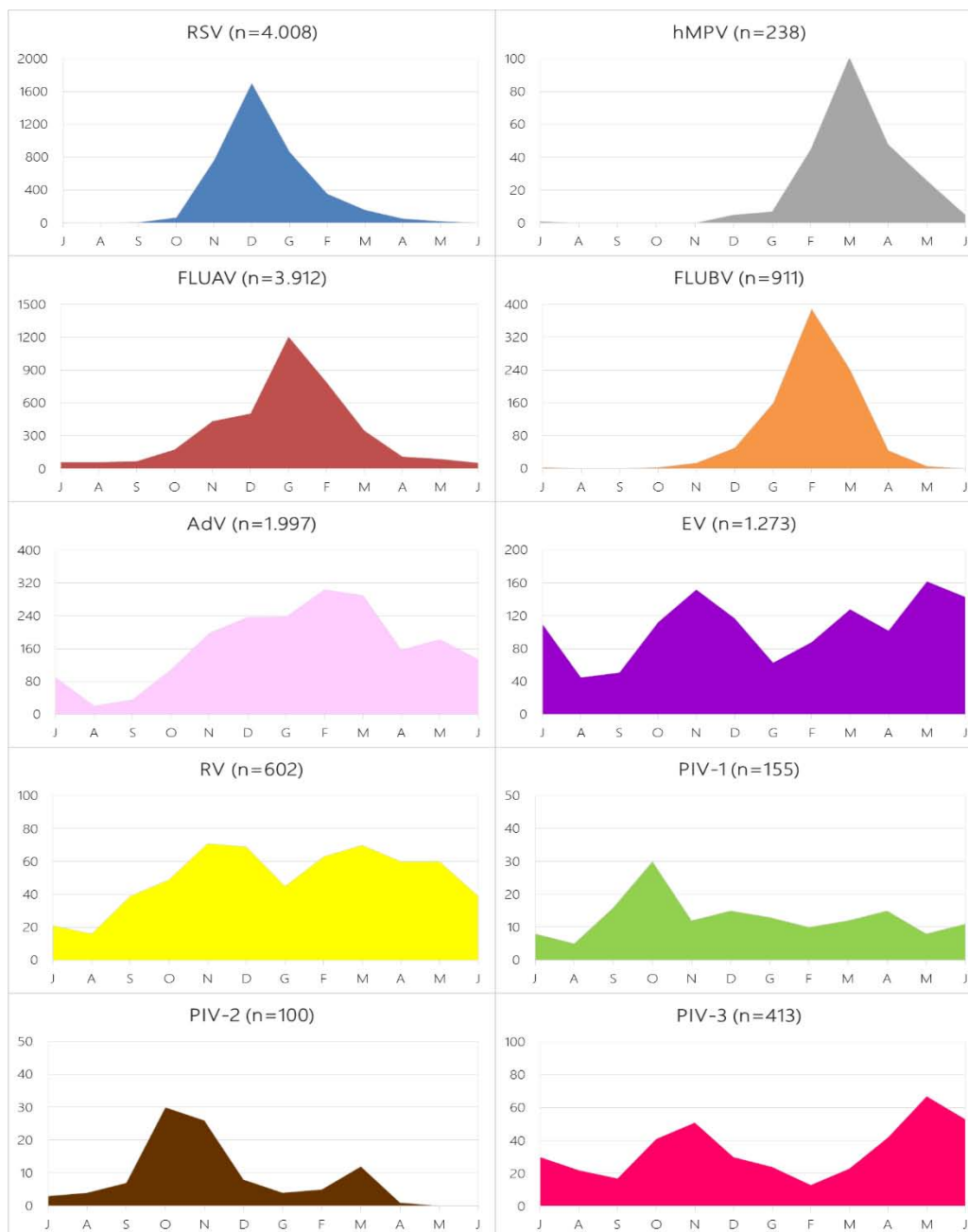


Figura 46

Patrons individuals d'estacionalitat de cada virus respiratori. Els mesos s'han distribuït de juliol a juny. La gràfica de cada virus s'adapta a la n total detectada.

En l'anàlisi individual de cada virus, s'observa que el RSV va ser més freqüent durant els mesos freds, i menys freqüent en els mesos més càlids (veure figura 46). La detecció d'aquest virus era mínima els mesos de juny a setembre. La màxima prevalença es va observar de novembre a gener i la mínima d'abril a setembre, sent significativa la relació entre període i prevalença ($p < 0,001$). El pic màxim es va detectar cada any al mes de desembre, tret dels anys 2000 (veure figura 38) i 2006 (veure figura 39) on el pic màxim es va registrar al gener i novembre respectivament.

El hMPV es va detectar a l'hivern i a l'inici de la primavera, amb un màxim de detecció registrat sempre al mes de març (veure figura 46). La màxima prevalença es va observar de febrer a maig i va ser mínima la resta de mesos de l'any, sent significativa la relació entre període i prevalença ($p < 0,001$).

L'estacionalitat del FLUAV era principalment a l'hivern. La màxima prevalença es va observar de desembre a març, i la mínima als mesos d'estiu, sent significativa la relació entre període i prevalença ($p < 0,001$) (veure figura 46). El pic màxim va ser normalment al mes de gener encara que en certs anys es va registrar en mesos diferents: als anys 1998, 2003, 2006 i 2012 el màxim es va donar durant el mes de febrer (figures 38 i 39), mentre que durant les temporades d'hivern dels anys 2000/2001, 2003/2004 i 2009/2010 el màxim es va registrar durant el mes de novembre; finalment l'any 2013 el màxim es va donar al mes de març (veure figures 38 i 39). Tots els anys en que el FLUAV es va detectar fora dels mesos de desembre a març, van fer que en la figura global aparegués un pic inicial al novembre. Es va observar que si no es tenien en compte aquests casos, s'obtenia una distribució diferent a la mostrada inicialment. Els diferents patrons estacionals del FLUAV es mostren a la figura 47.

En el cas del FLUBV l'estacionalitat principal va ser a l'hivern, amb un màxim registrat al mes de febrer (veure figura 46). La màxima prevalença es va observar de gener a març, i la mínima als mesos d'estiu, sent significativa la relació entre període i prevalença ($p < 0,001$). El pic màxim d'aquest virus es donava amb un mes de diferència amb el pic del FLUAV (veure figures 45 i 46). No obstant, els anys 1999 i 2002 es va registrar el màxim al més gener (veure figures 38 i 39), coincidint amb el FLUAV. La temporada d'hivern 2002/2003 el màxim es va registrar al mes de desembre, avançant-se a la detecció de FLUAV i durant l'any 2009 es va registrar al març, dos mesos més tard que el FLUAV (veure figures 38 i 39).

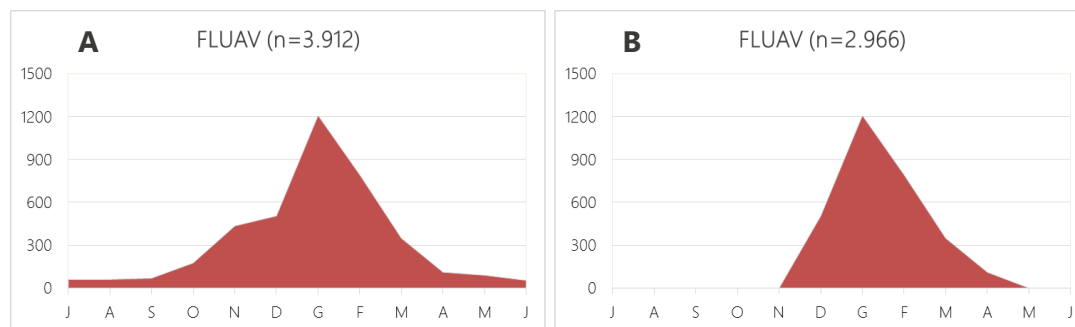


Figura 47

Patrons d'estacionalitat del FLUAV . Els mesos s'han distribuït de juliol a juny. En la imatge (B) s'han obviat les deteccions dels mesos de maig a novembre.

La màxima circulació dels PIV-2 va ser a la tardor amb un màxim a l'octubre, mentre que la detecció va ser mínima d'abril a juny, tret d'un registre màxim de 10 casos detectats al març de 1997 (veure figura 42). La màxima prevalença es va observar de setembre a desembre, i la mínima d'abril a juny, sent significativa la relació entre període i prevalença ($p < 0,001$) (veure figura 46).

La resta dels virus respiratoris estudiats es van detectar al llarg de tot l'any. L'estacionalitat de l'AdV, va ser principalment des de final de la tardor a la primavera, amb un màxim al mes de febrer. La detecció va ser mínima durant els mesos d'agost i setembre (veure figura 46). La màxima prevalença va ser de novembre a maig i la mínima d'agost a setembre, sent significativa la relació entre període i prevalença ($p < 0,001$). Els EV es van detectar sobretot durant els mesos d'octubre a desembre, i de març a juliol, i la seva detecció va ser mínima durant els mesos gener/febrer i d'agost/setembre (veure figura 46). En aquest cas, la màxima prevalença es va donar de maig a juliol i la mínima al gener i al febrer, sent significativa la relació entre mesos i prevalença ($p < 0,001$). Els RV també es van detectar tots els mesos de l'any amb un màxim de detecció al mes de novembre i al mes de març. La detecció d'aquest virus en respecte a la resta de virus respiratoris va ser mínima especialment al gener i l'agost (veure figura 46). La relació observada entre la màxima prevalença de novembre/març i la mínima d'agost/gener va ser estadísticament significativa ($p < 0,001$).

En el cas dels virus parainfluença, els virus PIV-1 i PIV-3 es van detectar al llarg de tot l'any. El PIV-1 es detectava sobretot al setembre a abril, mentre que el mínim es registrava durant els mesos d'estiu (veure figura 46). La màxima prevalença es va observar a l'octubre i la mínima a l'agost, sent significativa

la relació entre període i prevalença ($p < 0,001$). El PIV-3 es va detectar principalment els mesos d'abril a juny i d'octubre a desembre, amb un màxim al maig, i també durant el mes de novembre, i la seva detecció va ser mínima durant els mesos de febrer i setembre (veure figura 46). La màxima prevalença va ser als mesos de maig i novembre i la mínima als mesos de febrer i setembre, sent significativa la relació entre període i prevalença ($p < 0,001$).

La distribució estacional de les co-deteccions va ser principalment d'octubre a març, amb un màxim entre els mesos de novembre fins gener, i una detecció mínima als mesos de juny fins setembre. Així, la relació entre prevalença i període màxim (octubre-març) i període mínim (juny-setembre) va resultar estadísticament significativa ($p < 0,001$). La distribució estacional de les co-deteccions, es mostra a la figura 48.

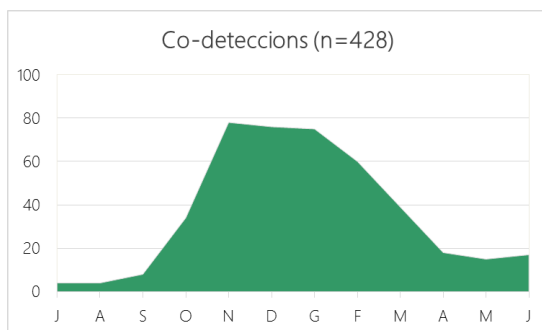


Figura 48

Patrons d'estacionalitat de les co-deteccions. Els mesos s'han distribuït de juliol a juny. La gràfica s'adapta a la n total detectada.

Els virus que es van trobar en co-detecció durant tots els mesos de l'any van ser FLUAV i AdV. Els EV i RV també es van trobar tots els mesos, menys agost en el cas del EV i abril en el cas dels RV. El virus amb major número de deteccions múltiples van ser el RSV i el FLUAV. Les co-deteccions dels RSV es van detectar durant tots els anys d'estudi. El màxim de co-deteccions ($n=65$) en un mateix any es va registrar l'any 2000. Pel que fa el FLUAV, de totes les deteccions detectades fora dels mesos més freds, entre els mesos de maig i octubre ($n=32$), el 94% ($30/32$) d'aquestes

corresponien a l'època compresa entre l'any 1998 fins l'any 2000, on es va detectar grip A cada més de l'any, i un cas es va detectar al juliol de 2009 i un altre a l'octubre de 2003. Les co-deteccions de FLUAV detectats al mes de maig van ser tres al 1998 i un al 1999; al mes de juny dos al 1998 i un al 2000; al mes de juliol un del 1998 i un del 2009; al mes d'agost dos al 1998; al mes de setembre tres al 1998 i dos al 1999 i al mes d'octubre sis al 1998, vuit al 1999, un al 2000 i un al 2003. L'únic cas de detecció múltiple del FLUBV detectat al mes de juliol també va ser al 1998.

OBJECTIU 3. CONÈIXER LA RELACIÓ ENTRE ELS VIRUS DETECTATS I L'EDAT I EL SEXE DELS PACIENTS.

Relació entre els rangs d'edat i els virus detectats

Un cop estudiada la distribució estacional dels virus respiratoris, es va estudiar la relació dels diferents virus segons l'edat del pacient. Es van definir en total nou rangs d'edats diferents i un rang per reunir aquelles mostres de les quals no es va poder recuperar l'edat del pacient. A la taula 25 es mostren els diferents virus detectats d'aquelles mostres que es van processar per l'estudi complet (n=33.696).

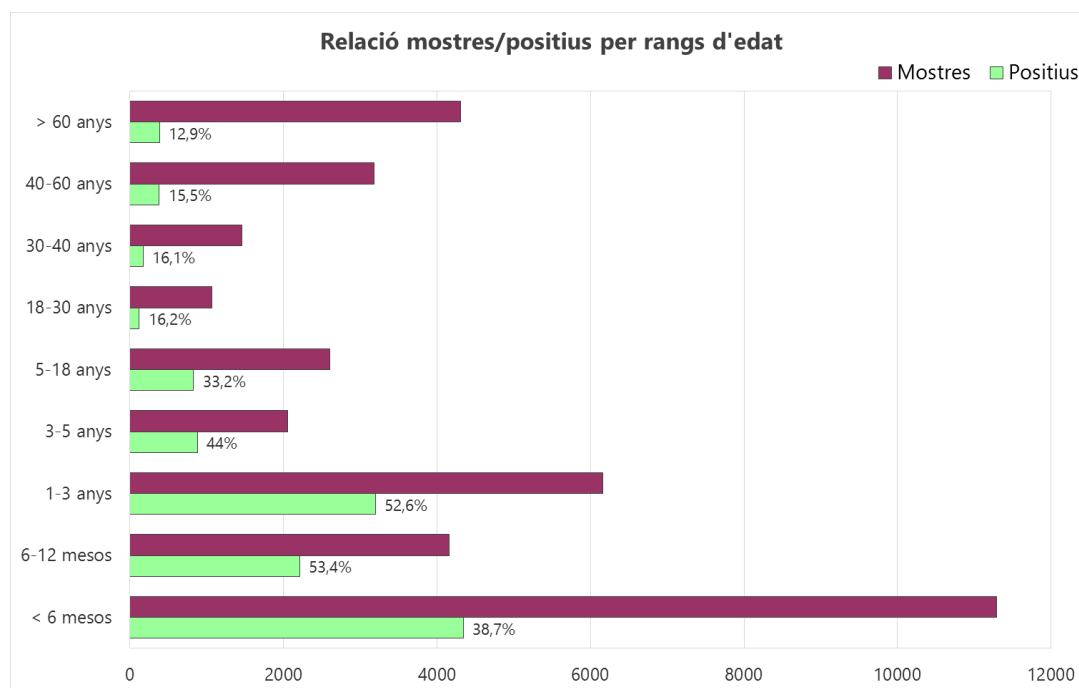


Figura 49

Relació entre les mostres rebudes i els positius detectats segons els diferents rangs d'edat establerts. Es mostra el percentatge dels positius sobre el total de mostres rebudes de cada rang. No es mostren les mostres de les no es coneixia l'edat del pacient.

Taula 25

Relació dels diferents virus detectats segons el rang d'edat en mostres processades per estudi complet de virus respiratoris (n=33.696). →

VIRUS/EDAT		≤ 6 m	6-12 m	1-3 a	3-5 a	5-18 a	18-30 a	30-40 a	40-60 a	≥ 60 a	ED ^a	Total
Mostres		11.229 30,6%	4.143 11,3%	6.098 16,6%	2.017 5,5%	2.497 6,8%	741 2%	1.074 2,9%	2.454 6,7%	2.999 8,2%	444 1,2%	33.696
Mostres positives ^b		4.205 37,4%	2.120 51,2%	3.097 50,8%	862 42,7%	804 32,2%	115 15,5%	170 15,8%	370 15,1%	381 12,7%	179 40,3%	12.303
Virus ^c	RSV	1.932 44,5%	791 35,7%	884 27,6%	122 13,8%	49 5,9%	22 18,3%	36 20,8%	57 15,0%	44 11,4%	71 37,8%	4.008
	FLUAV	819 18,6%	451 20,1%	847 26,1%	301 33,1%	302 31,6%	175 36,7%	199 42,8%	344 44,6%	425 53,0%	49 20,2%	3.178
	FLUBV	92 2,1%	54 2,4%	119 3,7%	141 15,9%	256 30,6%	19 5,0%	41 6,9%	82 8,9%	104 8,0%	3 1,6%	746
	AdV	367 8,4%	494 22,3%	749 23,4%	158 17,8%	112 13,5%	13 10,8%	12 6,9%	30 7,9%	29 7,5%	33 17,6%	1.997
	EV	526 12,1%	192 8,7%	302 9,4%	87 9,8%	78 9,4%	5 4,2%	6 3,5%	25 6,6%	26 6,7%	26 13,8%	1.273
	RV	277 6,4%	79 3,6%	92 2,9%	29 3,3%	34 4,1%	14 11,7%	15 8,7%	32 8,4%	27 7,0%	3 1,6%	602
	hMPV ^d	81 1,9%	44 2,0%	75 2,3%	17 1,9%	9 1,1%	1 < 1%	0	4 1%	7 1,8%	0	238
	PIV-1	67 1,5%	19 < 1%	27 < 1%	11 1,2%	8 1%	1 < 1%	3 1,7%	6 1,6%	4 1%	9 4,8%	155
	PIV-2	35 < 1%	16 < 1%	21 < 1%	15 1,7%	8 1%	0	1 < 1%	1 < 1%	3 < 1%	0	100
	PIV-3	156 3,6%	76 3,4%	92 2,9%	10 1,1%	14 1,7%	14 11,7%	14 8,1%	22 5,8%	10 2,6%	5 2,7%	413
	PIV-4	0	0	2 < 1%	0	0	0	0	0	0	0	2
	PIV	4 < 1%	3 < 1%	7 < 1%	3 < 1%	1 < 1%	0	0	0	1 < 1%	0	19
Deteccions múltiples ^e		140	93	110	25	25	5	3	11	6	9	427
Total virus detectats ^f		4.345 38,7%	2.214 53,4%	3.207 52,6%	887 44%	829 33,2%	120 16,2%	173 16,1%	381 15,5%	387 12,9%	188 42,3%	12.731

^a ED, edat desconeguda. ^b El percentatge està calculat sobre el total de mostres rebudes en cada rang. ^c El percentatge de cada virus està calculat sobre el total de virus detectats en cada rang. ^d Inici de la detecció al desembre de 2008. ^e Totes les infeccions múltiples són dobles, tret d'un cas d'infecció triple detectada dins el rang 6-12 mesos. ^f El percentatge està calculat sobre el total de mostres rebudes en cada rang.

En general es va observar que el major número de mostres es rebien de pacients menors de 6 mesos, però el major número de virus detectats es donava en pacients de 6 a 12 mesos. Dels pacients de 18 a 30 anys van ser dels que es van rebre menys mostres, tot i que es van detectar menys positius en pacients majors de 60 anys (figura 49). Els virus respiratoris estudiats no es van trobar a tots els rangs d'edat per igual. Les diferències trobades entre els grups d'edat van ser estadísticament significatives per a tots els virus detectats ($p < 0,001$). La representació gràfica de la distribució dels diferents virus respiratoris detectats respecte a cada rang d'edat individual es mostra a la figura 50 (1). En format agrupat, es representa a la figura 50 (2).

Del total de mostres estudiades, en el cas dels pacients pediàtrics, observàvem que en menors de 6 mesos, es va detectar almenys un virus respiratori en un 37,4% de les mostres estudiades i en els de 6 a 12 mesos, la detecció va ser del 51,2%. En pacients menors de 6 mesos els virus més detectats van ser RSV, FLUAV i EV (veure taula 25 i figures 50), mentre que en pacients d'entre 6 i 12 mesos, van ser RSV, AdV i FLUAV (veure taula 25 i figures 50). En ambdós rangs, el PIV-2, PIV-1 i hMPV van ser els virus menys detectats (veure taula 25 i figures 50). En els pacients menors de 6 mesos es van trobar 140 (3,3%) co-deteccions, i en els de 6 a 12 mesos 93 (4,4%) respecte al total de mostres positives de cada rang.

En pacients entre 1 i 3 anys, un 50,8% de les mostres van donar positiu per al menys un virus respiratori. Els virus més detectats van ser RSV, FLUAV i AdV, mentre el PIV-2, PIV-1 i hMPV (veure taula 25 i figures 50) van ser els virus menys detectats. Es van trobar 110 co-deteccions, que corresponen al 3,6% del total de mostres positives del rang d'edat.

En pacients entre 3 i 5 anys, un 42,7% de les mostres van ser positives per al menys un virus respiratori, i en pacients entre 5 i 18 anys la positivitat va ser del 32,2%. En pacients entre 3 i 5 anys els virus més detectats van ser FLUAV, AdV i FLUBV, mentre que en pacients de 5 a 18 anys, el FLUBV va ser el segon virus més detectat per davant dels AdV (veure taula 25 i figures 50). Els virus amb menor taxa de detecció van ser el PIV-3, PIV-1 i PIV-2, en pacients d'entre 3 i 5 anys, i el PIV-2, PIV-1 i hMPV en els de 5 a 18 anys (veure taula 25 i figures 50). Del total de mostres per cada grup d'edat, es van trobar 25 (2,9%) co-deteccions en pacients d'entre 3 i 5 anys, i 25 (3,1%) en els d'entre 5 i 18 anys.

De les mostres de pacients adults, en pacients entre 18 i 30 anys, un 15,5% de les mostres van ser positives per al menys un virus respiratori, i en pacients entre 30 i 40 anys la positivitat va ser del 15,8%.

En el cas dels pacients entre 18 i 30 anys no es va detectar cap PIV-2, mentre que en els pacients d'entre 30 i 40 anys no es va detectar hMPV (veure taula 25 i figures 50). En pacients entre 18 i 30 anys els virus més detectats van ser FLUAV, RSV i FLUBV, mentre que en els de 30 a 40 anys, el FLUBV va ser el segon virus més detectat per davant del RSV (veure taula 25 i figures 50). Els virus amb menor taxa de detecció van ser el PIV-1, hMPV i EV, en pacients d'entre 18 i 30 anys, i el PIV-2, PIV-1 i EV en els de 30 a 40 anys (veure taula 25 i figures 50). Del total de mostres de cada rang, es van trobar 5 (4,3%) co-deteccions en pacients d'entre 18 i 30 anys, i 3 (1,8%) en els de 30 a 40 anys.

En pacients entre 40 i 60 anys, el 15,1% de les mostres van ser positives per al menys un virus respiratori, i en pacients majors de 60 anys la positivitat va ser del 12,7%. Els virus més detectats van ser FLUAV, FLUBV i RSV en ambdós rangs (veure taula 25 i figures 50). Els virus amb menor taxa de detecció van ser el PIV-2, hMPV i PIV-1, en pacients d'entre 40 i 60 anys, mentre que en els majors de 60 anys es va detectar menys PIV-1 que hMPV (veure taula 25 i figures 50). Del total de mostres de cada rang, es van trobar 11 (3%) co-deteccions en pacients d'entre 40 i 60 anys, i 6 (1,6%) en els majors de 60 anys.

En 464 casos no es va poder recuperar l'edat del pacient. El 40,3% de les mostres van ser positives per al menys un virus respiratori i es van trobar 9 co-deteccions, que corresponen al 5% de mostres positives en aquest grup (veure taula 25 i figures 50).

De les 3.048 mostres estudiades només per PCR de virus gripals, 899 (29,5%) van resultar positives per virus gripals. El virus FLUAV va ser el virus més detectat en adults. De les mostres d'adults on només es volia detectar grip, el màxim número de mostres estudiades es trobava en pacients del rang ≥ 60 anys (42,8% del total de mostres) i en pacients del rang 40-60 anys (23,9% del total de mostres). Els diferents resultats de les deteccions exclusives de virus gripals es mostren a la taula 26.

Taula 26

Relació dels virus gripals detectats per PCR segons el rang d'edat.

VIRUS/EDAT	$\leq 6m$	6-12m	1-3 a	3-5 a	5-18a	18-30a	30-40a	40-60a	$\geq 60a$	ED ^a	TOTAL
Mostres	60	18	58	35	103	324	383	729	1.305	33	3.048
Positius	11	5	10	7	42	144	154	222	292	11	898
FLUAV	11	5	10	7	40	131	125	174	219	11	733
FLUBV	0	0	0	0	2	13	29	48	72	0	164
Co-deteccions	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Total	11	5	10	7	42	144	154	222	293	11	899

^a ED, no es va poder recuperar la informació de l'edat.

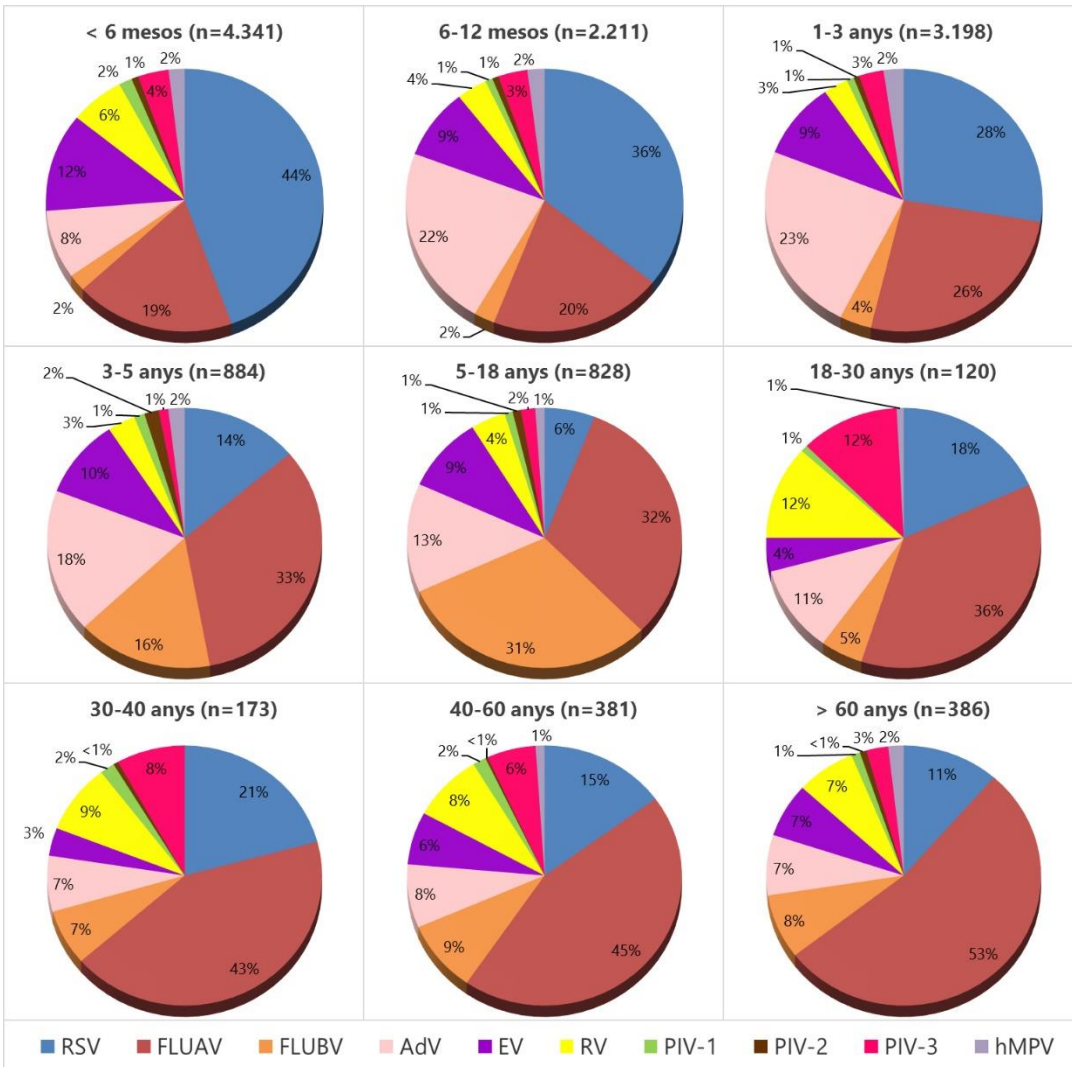


Figura 50 (1)

Relació entre els rangs d'edat i els virus detectats. A cada rang es mostra el total de virus positius (n). No s'inclouen els PIV ni els PIV-4.

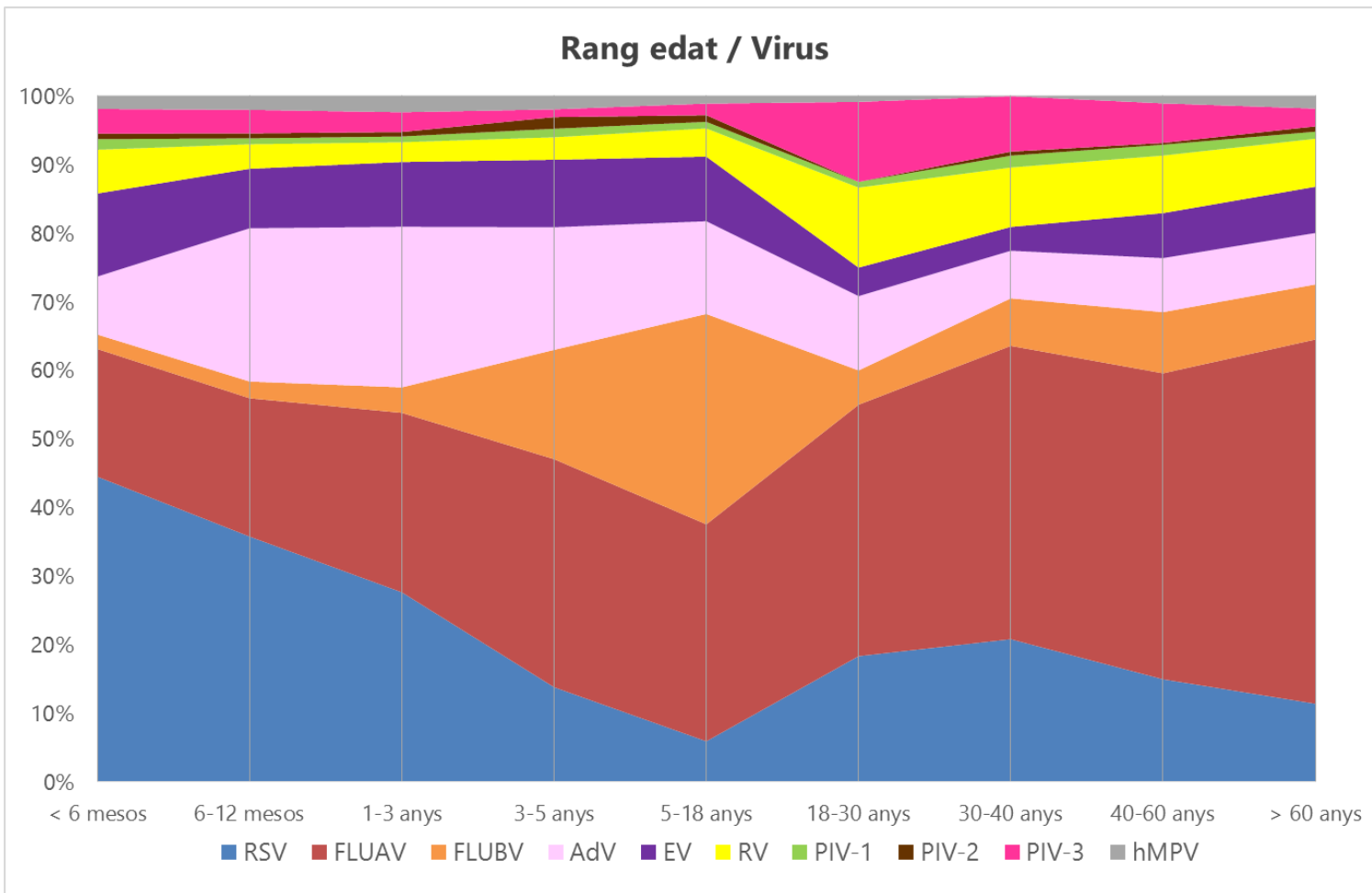


Figura 50 (2)

Relació entre els rangs d'edat i els virus detectats. No s'inclouen els PIV ni els PIV-4.

Relació entre els virus detectats i el rang d'edat

Per a aquesta part de l'estudi es va tenir en compte tots els virus detectats en cada rang d'edat, tret dels inclosos en el rang d'edat desconeguda. Tampoc s'han analitzat les deteccions de PIV ni PIV-4 al ser la n total d'aquests virus massa petita per l'estudi estadístic. En total es van analitzar 13.410 virus respiratoris positius.

La representació gràfica de cadascun dels virus detectats i els diferents rangs d'edat, es mostra a la figura 51.

Dels 3.937 RSV detectats, el 49% corresponien a nens menors de sis mesos. Aquest virus era significativament més freqüent en aquesta franja d'edat respecte a la resta ($p < 0,001$) (veure figura 51). Dels 238 hMPV detectats, el 34% van correspondre a nens menors de 6 mesos i el 32% a nens d'un a tres anys d'edat. Aquest virus era significativament més freqüent en aquests dos rangs d'edat que en la resta ($p < 0,001$) (veure figura 51).

La detecció dels virus gripals va ser significativament major en pacients pediàtrics que en adults ($p < 0,001$). En el cas del FLUAV, dels 3.863 virus detectats, el 21% i el 22% corresponien a nens menors de 6 mesos i nens d'un a tres anys d'edat, respectivament. Dels 908 FLUBV detectats, el 28% corresponien a nens de 5 a 18 anys (veure figura 51).

Dels 1.964 AdV detectats, el 38% corresponien a nens d'un a tres anys d'edat, sent significativament més freqüents en aquesta franja d'edat que en la resta ($p < 0,001$) (veure figura 51). La detecció d'EV i RV va ser significativament major en pacients pediàtrics que en adults ($p < 0,001$). En ambdós casos, tant els EV ($n=1.247$) com els RV ($n=599$), es van detectar més freqüentment en nens menors de sis mesos d'edat, sent els percentatges de detecció del 42% i 46% respectivament en aquest rang d'edat, però en el cas dels EV la freqüència de detecció en nens d'un a tres anys d'edat, va ser major que la dels RV (veure figura 51).

La detecció dels virus parainfluença va ser significativament major en pacients pediàtrics que en adults ($p < 0,001$). En tots els casos, els PIV es van detectar més freqüentment en nens menors de sis mesos, que en la resta de grups d'edat (veure figura 51). Dels 146 PIV-1, el 46% eren nens menors de sis mesos, dels 100 PIV-2, n'eren el 35% i dels 408 PIV-3, en van ser el 38%.

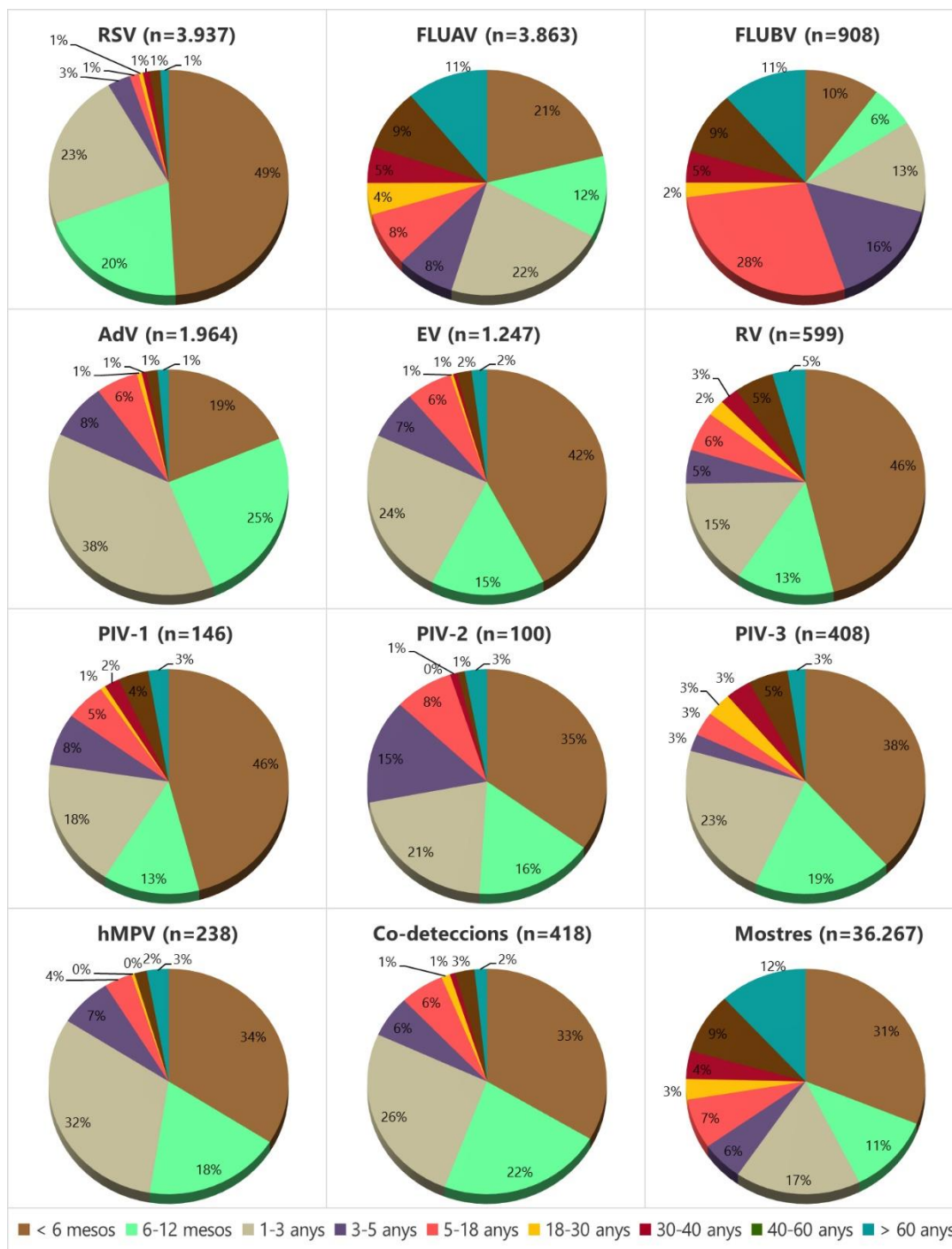


Figura 51

Relació entre els virus detectats, les co-deteccions i les mostres estudiades, amb el rang d'edat. Per cada imatge es mostra el total de positius (n) sense tenir en compte els que no es coneixia l'edat.

Distribució dels virus segons el sexe

Per a aquesta part de l'estudi es va tenir en compte tant la relació entre els virus detectats i el sexe dels pacients dels quals es van rebre les mostres, com la relació entre el sexe i l'edat del pacient. Del total de mostres estudiades 36.744 el 55,6% (n=20.441) de les mostres eren d'homes, front al 43,6% (n=16.009) que eren de dones i en 294 casos no es va poder recuperar la informació del sexe del pacient, tal i com es reflecteix a la taula 27. La ràtio home:dona de les mostres rebudes va ser 1,3. De les 3.048 mostres estudiades només per virus gripals mitjançant PCR, 1.575 (51,7%) corresponien a homes, i 1.446 (47,4%) corresponien a dones. La ràtio home:dona en aquestes mostres va ser 1,1.

En els casos en que es va detectar algun virus, 7.269 (55,1%) corresponien a homes i 5.825 (44,1%) a dones, això representava una ràtio de 1,2. Entre els casos de infecció múltiple, el 50,7% (217/428) eren homes i el 48,1% (206/428) eren dones. Així mateix, en quan al total de virus detectats, el 54,9% eren de mostres d'homes i el 44,2% eren de mostres de dones, conservant també la ràtio de 1,2 (veure taula 27).

Taula 27

Total de virus detectats segons els sexe del pacient i la ràtio total.

MOSTRES/VIRUS	Homes	Dones	Sexe desconegut	Ràtio home:dona	Valor de p
Mostres	20.441	16.009	294	1,3	-
Mostres positives	7.269	5.825	107	1,2	-
RSV	2.215	1.753	40	1,3	0,371
FLUAV	2.033	1.842	37	1,1	0,001
FLUBV	492	415	4	1,2	0,137
AdV	1.154	833	10	1,4	0,034
EV	731	530	12	1,4	0,089
RV	331	266	5	1,2	0,392
hMPV ^a	137	101	0	1,4	0,346
PIV-1	97	58	0	1,7	0,060
PIV-2	51	47	2	1,1	0,240
PIV-3	232	179	2	1,3	0,460
PIV-4	2	0	0	-	-
PIV	12	7	0	1,7	-
Total virus detectats	7.487	6.031	112	1,2	-
Co-deteccions	217	206	5	1,1	0,080

^a Inici de la detecció al desembre de 2008.

Segons cada virus respiratori, en tots els casos, es van detectar més positius en pacients homes que en dones tot i que l'estudi estadístic no va donar diferències significatives en la detecció dels principals virus respiratoris segons el sexe del pacient, tret del cas del FLUAV on la $p < 0,001$ (veure taula 27).

Relació de les mostres positives segons sexe i edat.

La relació home:dona de les mostres estudiades i de les positives segons els rangs d'edat establerts es mostra a la taula 28.

Taula 28

Relació entre el sexe i els rangs d'edat.

SEXE/EDAT		≤6m	6-12m	1-3 a	3-5 a	5-18a	18-30a	30-40a	40-60a	≥60a	ED ^a
H	Mostres	6.193	2.364	3.457	1.027	1.445	526	724	1.780	2.649	276
	Mostres positives ^a	2.340 37,8%	1.229 52,0%	1.718 49,7%	436 42,5%	460 31,8%	120 22,8%	143 19,8%	321 18,0%	395 14,9%	107 38,8%
D	Mostres	4.934	1.770	2.670	1.023	1.147	533	718	1.382	1.645	187
	Mostres positives ^a	1.820 36,9%	878 49,6%	1.373 51,4%	433 42,3%	386 33,7%	138 25,9%	177 24,7%	266 19,2%	277 16,8%	77 41,2%
ED	Mostres	162	27	29	2	8	6	15	21	10	14
	Mostres positives ^c	56 34,6%	18 66,7%	16 55,2%	0	0	1 16,7%	4 26,7%	5 23,8%	1 10,0%	6 42,9%
Ràtio H:D		1,3	1,4	1,3	1,0	1,2	0,9	0,8	1,2	1,4	1,4

H: homes; D: dones; ED: no es va poder recuperar la informació de l'edat; SD: no es va poder recuperar la informació del sexe. ^a El percentatge està calculat sobre el total de mostres rebudes en cada rang.

En pacients fins a 18 anys i en els majors de 40 anys, es va observar una ràtio home:dona en quan a les mostres positives superior a 1 (més homes que dones). Per contra, en els rangs de 18 a 30 i de 30 a 40 anys, la ràtio era menor que 1 (més dones que homes). La diferència en la proporció de mostres positives segons el sexe i en respecte a l'edat va ser estadísticament significativa ($p < 0,001$).

OBJECTIU 4. DETERMINAR LA FREQUÈNCIA D'ALTRES VIRUS RESPIRATORIS DURANT LA PANDÈMIA DE FLUAV H1N1 PDM09.

Al 2009, arran de l'aparició del FLUAV H1N1 pdm09, l'OMS va declarar l'existència d'una pandèmia de virus gripal que va durar des de l'abril del 2009 fins al març del 2010.

Durant aquest període van arribar al laboratori 3.512 mostres, de les quals 1.551 es van processar només per PCR de virus gripals, i 1.961 que es van processar pels estudis convencionals. En total es van detectar 1.068 mostres positives (30,4%). De les processades per PCR de virus gripals, 407 (26,2%) van resultar positives i de les processades pels mètodes convencionals 661 (33,7%) van ser positives.

Els diferents virus respiratoris detectats durant el període pandèmic es reflecteixen a la taula 29, i la representació gràfica del període pandèmic es mostra a la figura 52.

Taula 29

Virus respiratoris detectats amb les tècniques convencionals i moleculars durant el període pandèmic.

VIRUS	CONVENCIONAL	MOLECULAR	TOTAL
RSV	260	-	260
FLUAV	57	407	464
FLUBV	2	-	2
AdV	128	-	128
EV	79	-	79
RV	54	-	54
hMPV ^a	54	-	54
PIV-1	8	-	8
PIV-2	13	-	13
PIV-3	26	-	26
Total virus detectats	673	407	1.080

^a S'inclouen només els últims 5 anys (a partir del 2008).

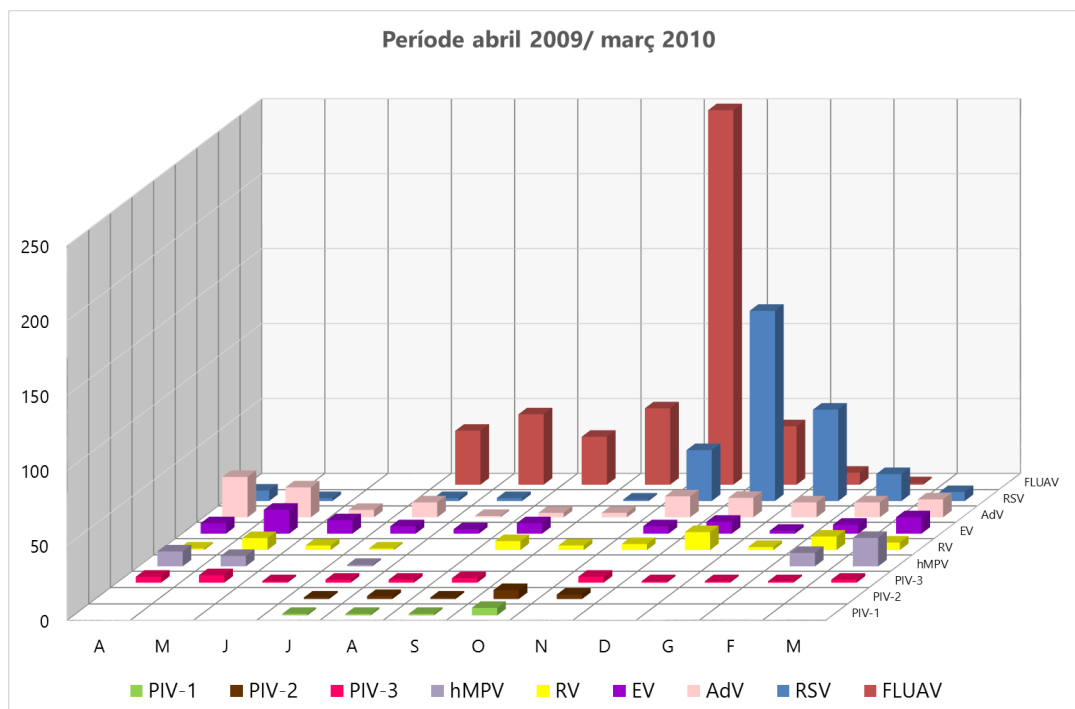


Figura 52

Virus respiratoris detectats durant la pandèmia del FLUAV H1N1 pdm09. Els mesos s'han distribuït d'abril a març coincidint amb el període d'alerta de la OMS.

Dels 673 virus respiratoris obtinguts mitjançant els mètodes convencionals, el RSV (38,6%) va ser el virus més detectat, seguit per l'AdV (19%) i l'EV (11,7%)(veure taula 29). Tots els 407 virus gripals trobats per detecció molecular, van resultar ser FLUAV.

Es va comparar la detecció dels diferents virus respiratoris detectats durant tots els anys entre els mesos d'abril fins març, per poder comparar-los amb el període pandèmic. Es van tenir en compte totes les mostres estudiades, sense diferenciar entre mètodes de diagnòstic. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 30.

Taula 30

Comparació entre les mostres i els virus respiratoris detectats durant la pandèmia de FLUAV H1N1 pdm09, i les mostres i els virus respiratoris detectats durant les temporades corresponents al mateix període de la resta d'anys Els virus detectats durant el període de la pandèmia es mostren en groc.

ANYS	RSV	FLUAV	FLUBV	AdV	EV	RV	PIV-1	PIV-2	PIV-3	hMPV ^a	Totals	Mostres
97/98	211	168	2	82	59	0	0	6	5	-	533	1.292
98/99	325	477	34	142	86	1	9	9	21	-	1.104	1.890
99/00	282	726	0	111	100	4	10	15	14	-	1.262	2.101
00/01	193	183	1	92	80	0	18	2	15	-	584	1.824
01/02	237	115	40	81	93	20	24	3	20	-	633	1.973
02/03	230	57	43	90	80	23	6	1	8	-	538	1.826
03/04	213	161	0	111	66	53	25	4	17	-	650	2.110
04/05	291	161	40	80	43	47	16	0	35	-	713	2.199
05/06	244	130	34	123	105	72	14	9	21	-	752	2.081
06/07	275	225	54	167	77	39	0	1	55	-	893	2.442
07/08	321	97	94	146	72	66	6	14	24	-	840	2.165
08/09	270	279	106	205	80	47	1	5	34	47	1.074	2.649
09/10	260	464	2	128	79	54	8	13	26	46	1.080	3.512
10/11	238	259	174	181	118	57	2	1	40	79	1.149	3.015
11/12	152	304	41	114	63	42	2	2	24	38	782	2.248
12/13	112	83	222	67	47	48	1	2	27	16	625	1.981

^a S'inclouen només els últims 5 anys (a partir del 2008).

El FLUAV va representar el 43% dels virus detectats durant la pandèmia (2009/2010) encara que es va detectar més FLUAV que l'any previ i el posterior. Per altra banda el total de mostres positives per qualsevol virus no va superar als de l'any previ ni el posterior. El màxim de detecció de FLUAV en tots els anys es va donar durant el període d'abril a març dels anys 98/99 i 99/00, amb un total de 477 FLUAV (58,4%) i 726 FLUAV (60,1%), respectivament.

Pel que fa a la resta de virus respiratoris, es va observar que es van seguir detectant amb números similars a la resta d'anys de l'estudi.

OBJECTIU 5. AVALUAR L'APORTACIÓ DE LES TÈCNiques MOLECULARS AL DIAGNÒSTIC DE RUTINA DE LES INFECCIONS RESPIRATÒRIES EN LA POBLACIÓ PEDIÀTRICA.

Resultats globals

Durant un període total de cinc mesos, es van recollir un total de 80 mocs nasofarínjics per a l'estudi en paral·lel, juntament amb els mètodes convencionals, dels virus respiratoris utilitzant mètodes de detecció molecular de PCR múltiplex. Les primeres 40 mostres es van aconseguir des d'octubre fins a novembre del 2008 i les següents 40 es van seleccionar des de febrer a març del 2009. Es van utilitzar dos tècniques de detecció molecular diferents, la tècnica Seeplex® i la tècnica CLART®. Els resultats obtinguts dels diferents mètodes de diagnòstic aplicats, convencionals i moleculars, es van comparar i analitzar entre ells. Aquests resultats es troben resumits a la taula 31.

Taula 31

Total de virus detectats per cada tècnica en el total de mostres analitzades (n=80).

VIRUS	IF/CC	Seeplex®	CLART®
RSV	11	7	12
AdV	13	14	13
EV	4	ND	10
hMPV	4	1	7
RV	2	17	27
PIV-3	2	4	4
FLUBV	0	0	3
HCoV-OC43	ND	5	ND
HBoV	ND	ND	16
PIV-4	ND	ND	1
FLUCV	ND	ND	1
HHV-5 ^a	1	ND	ND
Total virus detectats	37	48	94
Total mostres positives	37	40	62
Total mostres negatives	43	30	7
Total mostres inhibides	ND	10	11
Total mostres amb co-deteccions	0	8	25

^a Es va detectar un únic cas positiu per HHV-5 per IF/CC. No s'inclou a la comparació al no tractar-se d'un virus respiratori. ND, No detectable per la tècnica corresponent.

Del total de 80 mostres de mocs nasofaringis inclosos en l'estudi, es van detectar 37 casos positius per tècniques convencionals, 40 casos positius pel mètode Seeplex® i 62 positius pel mètode CLART®. A més, mitjançant les NAAT, es van detectar 40 positius per virus respiratoris en les mostres on les tècniques convencionals eren negatives. Únicament 3 mostres (4%) van donar negatives amb totes les tècniques utilitzades (taula 31).

Mitjançant el mètode Seeplex® es van detectar 11 virus respiratoris més que amb els mètodes convencionals. Amb el mètode CLART®, es van detectar 57 virus respiratoris addicionals als detectats per IF/CC. Tant en el cas de Seeplex® com en el cas de CLART®, el virus més detectat va ser el RV, mentre que amb els mètodes convencionals el virus més detectat va ser l'AdV, el qual va ser el segon virus més detectat per ambdues NAAT. Els RV van ser els virus més freqüentment detectats per PCR, però amb els mètodes convencionals només es va detectar en dos casos (taula 31).

Pel que fa als virus que només es podien detectar mitjançant una tècnica, el mètode CLART® va detectar 16 HBoV, 1 FLUCV i 1 PIV-4 de més, i el mètode Seeplex® va detectar 5 HCoV-OC43 addicionals. En un únic cas es va detectar un positiu per HHV-5 mitjançant les tècniques convencionals.

Es van obtenir 30 infeccions múltiples mitjançant les NAAT i cap per les convencionals.

En 19 casos les mostres van resultar inhibides pels NAAT, 10 mostres mitjançant el mètode Seeplex® (12,5%) i 11 per CLART® (14%). Només dues mostres van ser inhibides per ambdós mètodes.

Comparació entre mètodes convencionals i moleculars.

Degut a les diferències en els virus detectables per les tècniques utilitzades en l'estudi, la comparació entre els tres mètodes, IF/CC, Seeplex® i CLART® es va realitzar només amb els virus que eren comuns a les tres deteccions. Els virus detectats comparables entre les tres tècniques van ser: RSV, AdV, RV, hMPV i PIV-3. En el cas dels EV es van comparar les dues tècniques capaces de detectar-los, IF/CC i CLART®.

Segons el criteri de positivitat establert, 46 mostres (57,5%) es van considerar positives per virus respiratoris (virus clínicament rellevants). D'aquestes mostres, 36 es van detectar per IF/CC independentment del resultat molecular i 10 van ser positives únicament per les dues NAAT. La detecció viral coincidia entre les tres tècniques en 20 de les 36 mostres. De la resta de mostres, el resultat de

IF/CC coincidia amb només una tècnica molecular en 12 casos, 1 per Seeplex® i 11 per CLART®. Tres mostres van donar un resultat positiu per IF/CC mentre que el resultat molecular per ambdues NAAT va ser negatiu, i en un únic cas el resultat molecular va resultar inhibit per ambdues tècniques de PCR. Addicionalment, en les mostres positives per IF/CC, les NAAT van detectar altres virus respiratoris. En totes les mostres positives únicament per les NAAT, el virus obtingut va ser RV (n=10) i addicionalment en un cas es va detectar també AdV.

En total, es van detectar 50 virus en 46 mostres. Tenint en compte aquests virus clínicament rellevants, es va determinar la sensibilitat de les tres tècniques estudiades i es va establir en: 70% (32/46) per IF/CC, 76% (35/46) per Seeplex® i 89% (41/46) per CLART®, els resultats es mostren a la taula 32. Atès que els EV només es podien detectar mitjançant la tècnica de IF/CC i CLART®, no es van incloure en els càlculs.

Taula 32.

Total de virus detectats per cada tècnica tenint en compte el criteri de positivitat.

VIRUS	TOTAL	IF/CC	Seeplex®	CLART®
RSV	11	11	7	10
AdV	14	13	11	12
PIV-3	2	2	2	2
hMPV	4	4	1	3
RV	15	2	14	14
EV	4	4	ND	4
Co-deteccions	4	0	2	4
Total de virus detectats	50	36	35	45
Sensitivitat	-	72%	76% ^a	90%

^a En el cas de Seeplex®, es consideren un total de 46 virus positius degut a l'exclusió del EV. ND, No detectable per la tècnica corresponent.

Co-deteccions

Els resultats obtinguts per les NAAT van mostrar una elevada taxa de co-deteccions de virus respiratoris (37.5%; 30/80), el qual es corresponia amb un 10% (8/80) per Seeplex® i un 31% (25/80) per CLART®. De les 30 co-deteccions positives, el 64% (9/14) eren d'AdV, el 46% (6/13) corresponien a RSV i el 50% (15/30) eren per RV. Addicionalment, mitjançant el mètode CLART® es van detectar 16 HBoV, 13 (81%) dels quals es trobaven en co-detecció amb un altre virus respiratori, i mitjançant el mètode Seeplex® es van detectar 5 HCoV-OC43, 3 (60%) dels quals es trobaven en co-detecció amb un altre virus

respiratori. Segons els virus considerats clínicament rellevants (criteri de positivitat), només es van detectar 4 co-deteccions reals, tots ells detectats mitjançant les NAAT. Això corresponia al 4% (2/50) per Seeplex® i al 8% (4/50) per CLART®. Tots els casos de co-deteccions es mostren a la taula 33 on també es destaquen les mostres amb co-deteccions reals.

Taula 33

Co-deteccions totals. Les co-deteccions reals segons el criteri de positivitat es mostren en negreta.

Mostra	IF/CC	Seeplex®	CLART®
1	RSV	RSV	RSV + HBoV
2	NEG	RV + HCoV-OC43	RV
8	NEG	RV	RV + HBoV + PIV-3
10	NEG	RV	RV + HBoV
13	NEG	Mostra inhibida	HBoV + EV + PIV-4
15	PIV-3	PIV-3 + RV	PIV-3 + RV
17	NEG	PIV-3 + RV	Mostra inhibida
18	EV	RV	RV + EV
20	AdV	AdV	AdV + RV
21	RSV	RSV	RSV + HBoV
22	RSV	RSV	RSV + HBoV
23	EV	RV	RV + EV
26	PIV-3	PIV-3	PIV-3 + HBoV
27	NEG	AdV + RV	AdV + RV + RSV
29	NEG	NEG	AdV + RV
30	RSV	NEG	RSV + HBoV
36	EV	NEG	EV + RV + HBoV
37	RSV	NEG	RSV + EV + RV + HBoV
38	RSV	NEG	RSV + EV + RV
43	AdV	AdV	AdV + HBoV
47	AdV	AdV	AdV + FLUCV
51	AdV	AdV + RV	AdV
52	AdV	AdV + HCoV-OC43	AdV
55	hMPV	hMPV + HCoV-OC43	hMPV + RV
60	AdV	AdV	AdV + HBoV
63	AdV	AdV + RV	AdV
65	AdV	AdV	AdV + hMPV
67	NEG	Mostra inhibida	EV + FLUBV
69	NEG	NEG	hMPV + HBoV
79	EV	NEG	EV + hMPV

NEG, resultat negatiu

Anàlisi clínic i demogràfic

Respecte l'anàlisi clínic i demogràfic, no es van obtenir dades significativament rellevants. Els virus respiratoris detectats segons la clínica del pacient es mostren a la taula 34. Per a l'estudi de la clínica, es van considerar tots els virus respiratoris possibles detectats per alguna de les tres tècniques.

Taula 34

Global de virus respiratoris detectats amb les tres tècniques d'estudi.

VIRUS	ITRS	ITRI	TOTAL
RSV	4	9	13
AdV	11	7	18
EV	4	6	10
hMPV	3	5	8
RV	16	15	31
PIV-3	1	5	6
FLUBV	2	1	3
HCoV	3	2	5
HBoV	5	11	16
PIV-4	0	1	1
FLUCV	1	0	1

No s'inclou el HHV-5 detectat per les tècniques convencionals.

Del total de 80 mostres avaluades, 39 corresponien a pacients amb infecció del tracte respiratori superior (ITRS) i 41 eren de pacients amb infecció del tracte respiratori inferior (ITRI). La distribució segons el virus no va seguir un patró significativament definit segons la clínica establerta, encara que es va detectar que els RSV es trobaven principalment en pacients amb ITRI i els AdV en pacients amb ITRS. En aquests casos en particular, de les mostres que complien el criteri de positivitat, es va observar la mateixa tendència clínica tant per RSV (9/11) com per AdV (9/14). Així mateix, els PIV-3 es van detectar principalment en pacients amb ITRI, tant en les mostres que complien el criteri de positivitat com en el global de detectats.

Dels virus que només es podien detectar amb una sola tècnica, es va observar que únicament els HBoV tenien una distribució superior en ITRI. La resta de virus detectats en totes les mostres clíniques es van detectar amb freqüència similar en ambdós grups clínics.

L'anàlisi estadístic no va revelar una relació significativa entre els virus detectats i cada grup clínic. Els virus respiratoris detectats segons el quadre clínic es representen a la figura 53.

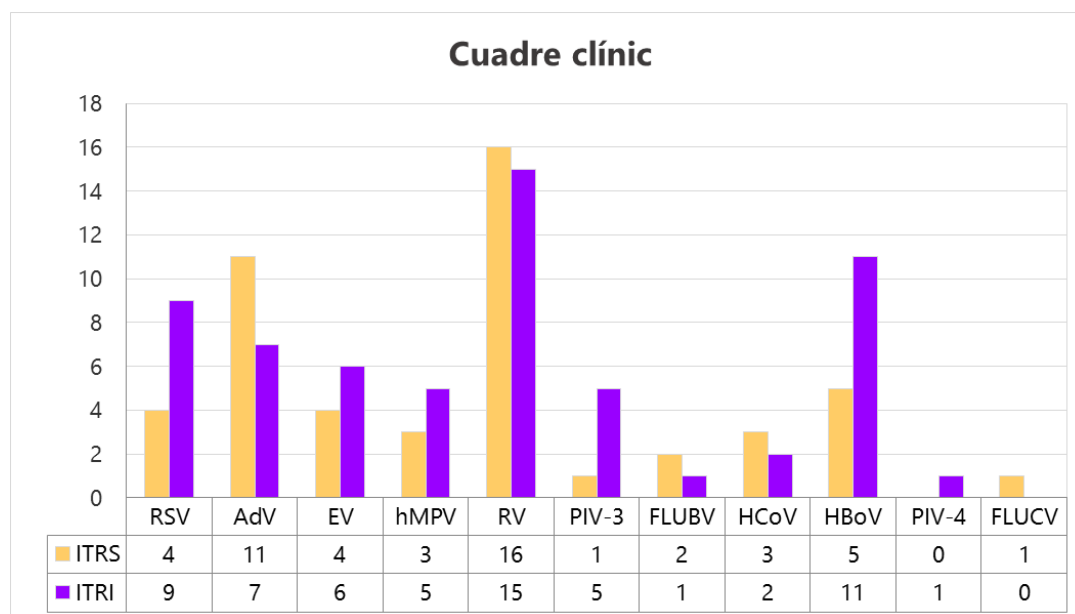


Figura 53

Virus respiratoris detectats segons el quadre clínic (ITRS o ITRI). No s'inclou el HHV-5 detectat per les tècniques convencionals.

Finalment, pel que fa a la distribució estacional de les mostres recollides, es va observar que el resultat obtingut era diferent depenent del virus estudiat. Degut a la separació temporal de la recollida de mostres, es van analitzar dos èpoques estacionals diferents: principis de tardor i finals d'hivern. Tots els RSV detectats es van trobar durant la tardor. Així mateix, tots els FLUBV i hMPV detectats es van trobar únicament durant l'època d'hivern. La resta de virus estudiats es van detectar durant els dos períodes.

L'anàlisi estadístic no va revelar una relació significativa entre els virus detectats i l'època de recollida de la mostra. La distribució estacional dels diferents virus respiratoris detectats es mostren a la figura 54.

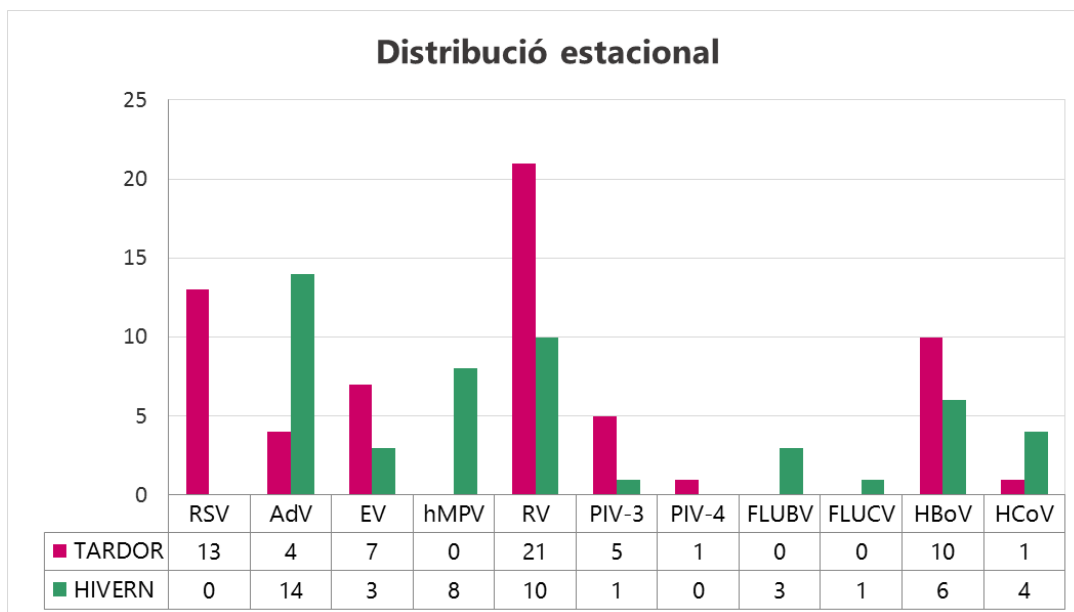


Figura 54

Distribució estacional dels virus respiratoris detectats segons el quadre clínic. No s'inclou el HHV-5 detectat per les tècniques convencionals.

DISCUSSIÓ

Les infeccions respiratòries agudes causades per virus són una de las causes més freqüents de consulta i hospitalització, en especial pediàtrica, degut a la seva morbimortalitat. Existeixen una gran diversitat de quadres clínics associats amb aquestes infeccions, amb diferents nivells de gravetat, que van des del refredat comú fins a processos més greus amb afectació de les vies respiratòries baixes ¹⁴¹. Una mateixa síndrome respiratòria pot estar causada per diferents virus, i un mateix virus pot originar diverses síndromes. La inespecificitat del quadre clínic fa imprescindible la realització d'un diagnòstic microbiològic per determinar l'agent etiològic causant de la infecció ⁴. Tradicionalment, el diagnòstic virològic de les infeccions respiratòries s'ha basat en l'aïllament i la identificació del virus mitjançant cultiu cel·lular i/o en tècniques de detecció d'antigen, per RSV, FLUAV, FLUBV, PIV, AdV, RV i EV. Els avenços en la biologia molecular i particularment el desenvolupament de tècniques basades en la PCR, han augmentat la rendibilitat diagnòstica i han permès la detecció de més virus respiratoris i, sobretot d'aquells que no es multipliquen o ho fan molt pobrament en cultiu cel·lular ^{5, 45, 142, 143}, com són els

hMPV, SARS-CoV, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, els HBoV i els descoberts més recentment com els poliomavirus humans KI i WU ⁴.

Amb aquest treball s'ha pretès conèixer la freqüència i la distribució en el nostre medi dels diferents virus causants d'infecció respiratòria, durant el període comprès entre 1997 i 2013. També es va voler analitzar la influència d'algunes variables com l'època de l'any, el sexe i l'edat del pacient, en els resultats obtinguts. Paral·lelament, també es va avaluar l'ús dels sistemes de detecció d'àcids nucleics per PCR en el diagnòstic virològic. Els principals punts forts del treball que es presenta són l'elevat nombre de mostres analitzades i la llarga durada de l'estudi, que ens permet assolir una visió global molt ampla, amb la que podem reflectir l'epidemiologia dels virus respiratoris en un ampli rang d'edat en el nostre medi. Cal tenir en compte que aquest estudi s'ha realitzat a partir dels virus detectats al laboratori a partir de mostres recollides de pacients i a criteri exclusiu del metge responsable. Això pot constituir una limitació a l'hora de comparar amb altres estudis. D'altra banda, les limitacions pròpies de les diferents tècniques emprades també han pogut condicionar els resultats.

Actualment existeixen pocs treballs epidemiològics que englobin més de deu anys d'estudi com el nostre. La majoria de treballs estan basats en períodes de no més de cinc o sis anys ^{141, 144-153}. No obstant, hi ha tres estudis realitzats amb una cobertura de temps més llarga ¹⁵⁴⁻¹⁵⁶, on destaca l'estudi de Khor *et al.* ¹⁵⁷ que van realitzar un treball epidemiològic de 27 anys. A Espanya s'han publicat estudis epidemiològics sobre virus respiratoris que només recullen una o algunes temporades ¹⁵⁸⁻¹⁶⁰, que versen sobre virus concrets ¹⁶¹⁻¹⁶³, o que estan restringits a només un grup de pacients ¹⁶⁴. Fins a la data de la publicació d'aquesta tesi, no s'ha trobat cap treball a Espanya que reculli l'epidemiologia de diferents virus respiratoris, en una ampla població i que cobreixi un període de més de cinc anys consecutius.

En el nostre treball es van analitzar els resultats de 36.744 mostres respiratòries. En 13.201 d'elles s'havia detectat algun virus respiratori, el que suposa una positivitat del 35,9% del total de mostres de pacients de totes les edats. Altres autors que van realitzar estudis epidemiològics utilitzant mètodes convencionals han trobat percentatges de positivitat entre 34% i el 43% en pacients adults o de totes les edats ^{144, 153, 154}, mentre que els autors que han treballat només amb població pediàtrica ^{141, 145, 146, 157, 165} han trobat un percentatge de positivitat que va del 26,4% al 59,7%. Les diferències de percentatges de positivitat d'aquests estudis amb el nostre treball estarien donades sobretot per la varietat dels virus estudiats, ja que també s'estudiaven alguns herpesvirus ^{145, 154}. No obstant, en el cas

de l'estudi de Khor *et al.*¹⁵⁷ en nens menors de cinc anys hospitalitzats, utilitzant IF i cultiu cel·lular van obtenir una taxa de positivitat del 26,4%, inferior a la nostra, possiblement degut a que no incorporaven l'estudi de RV ni EV. Finalment, Artiles-Campelo *et al.*¹⁴¹, utilitzant tècniques de detecció d'antigen i cultiu cel·lular per detectar diferents virus respiratoris, en nens menors de 14 anys, van obtenir una positivitat del 59,7%. Aquesta elevada positivitat és probable que estigui relacionada amb que el 76% dels pacients presentaven clínica de bronquiolitis i que l'edat mitjana dels pacients de l'estudi va ser de dos mesos. Els nostres resultats en aquest grup d'edat mostren una positivitat del 34%, i podríem explicar la diferència pel fet de que els nostres pacients presentaven diferents quadres clínics d'infecció respiratòria.

Pel que fa als estudis epidemiològics realitzats fonamentalment utilitzant tècniques de PCR, ja sigui a temps real o PCR múltiple, els percentatges de positivitat descrits estan per sobre dels nostres i van del 43,2% fins al 75%^{148-152, 155, 166-169}. Les diferències de detecció en aquests estudis respecte al nostre treball, probablement siguin degudes a la superior sensibilitat de les tècniques moleculars i a que el panell de virus respiratoris detectats inclou els PIV-4, diferents HCoV i els HBoV i la nova espècie de RV-C, els quals no es multipliquen en cultiu.

A més de la metodologia emprada en el diagnòstic, és de gran importància el tipus de mostra recollida per dur a terme una detecció òptima dels virus respiratoris. Es considera al moc nasofaringi com la mostra de referència per l'estudi de virus respiratoris, i els exsudats nasals i faringis com a la millor alternativa^{4, 6, 170}. Tot i que no era un objectiu principal d'aquest treball avaluar el tipus de mostra, si hem detectat un major nombre de casos positius en els mocs nasofaringis que en qualsevol altre mostra analitzada. En el nostre treball es van processar 28.394 mocs nasofaringis i 3.962 exsudats nasals i faringis, i la taxa de detecció va ser casi el doble en els mocs nasofaringis (41,2%) que en els exsudats (24,8%). Aquestes dades concorden amb estudis d'altres autors on es defineix el moc nasofaringi com la mostra d'elecció, sobretot en la població pediàtrica, per la seva major sensibilitat⁴.

La distribució de les mostres analitzades va ser homogènia durant els 17 anys d'estudi amb l'excepció de l'any 2009 on el nombre de mostres rebudes va ser el doble que la resta d'anys. Aquestes dades s'expliquen per la introducció al nostre medi del FLUAV H1N1 pdm09 en el context de la pandèmia declarada per l'OMS l'any 2009.

L'anàlisi dels resultats positius de cada any individual ens ha permès observar que no hi ha la mateixa freqüència, ni la mateixa distribució de cada virus durant tots els anys. No obstant i tal i com esperàvem, les infeccions per virus respiratoris, tot i variar en intensitat i distribució any rere any, poden tenir certa predictibilitat, particularment en climes temperats amb les estacions definides com és el nostre cas. Diferents estudis epidemiològics que recullen informació de varis anys consecutius, mostren també patrons estacionals d'infecció vírica clarament marcats segons els virus que estudien ^{148, 149, 155, 157, 171, 172}. Les infeccions respiratòries víriques encara que les podem trobar al llarg de tot l'any, tendeixen a presentar brots epidèmics durant les temporades d'hivern ^{146, 171}. En el nostre estudi, el major nombre de mostres rebudes i també la major detecció de virus respiratoris es va donar durant els mesos de novembre a març (66% i 77,5% respectivament), mentre que als altres mesos, coincidint amb els períodes anuals més càlids, el nombre de mostres rebudes i deteccions era molt inferior. L'augment de casos d'infecció respiratòria especialment durant els mesos més freds s'ha relacionat amb factors ambientals ^{173, 174}. Es coneix que en climes temperats com el nostre, la detecció de RSV, FLUAV i AdV està inversament relacionada amb la temperatura ¹⁷³⁻¹⁷⁵, i encara no està clarament definida la relació entre hMPV i els factors ambientals ^{176, 177}. El RSV, s'ha relacionat amb temperatures baixes i una velocitat de vent elevada, mentre que el FLUAV i l'AdV s'han relacionat només amb temperatures baixes. D'altra banda, no només els virus que es detecten sobretot els mesos d'hivern semblen tenir relació amb els factors ambientals, altres virus com el RV també s'han relacionat amb el clima. Aquests virus no sobreviuen en ambients secs i per tant són dependents de la humitat relativa ¹⁷⁵. Aquesta associació de virus i factors climàtics podria tenir a veure amb dues situacions: la primera, que les persones romanen més a casa els dies freds o plujosos, facilitant la disseminació del virus als altres membres de la família i la segona que les condicions fredes i seques de l'ambient afavoreixen la transmissió vírica (menys en el cas de RV). Tot i que les baixes temperatures per si soles no poden causar una infecció, sembla que podrien causar símptomes respiratoris ¹⁷⁵. En els articles de Silva *et al.* ¹⁷³ i Khor *et al.* ¹⁵⁷, ambdós en climes tropicals, es relaciona directament la detecció dels virus respiratoris amb la humitat relativa, especialment durant l'època de pluges ^{157, 173}.

El RSV va ser el virus detectat amb més freqüència durant tot el període d'estudi, amb un percentatge del 29,4% sobre el total de positius, i un 32,6% en aquelles mostres que es van processar per l'estudi complert de virus respiratoris. Aquesta dada concorda amb alguns treballs publicats on s'estudien diferents virus respiratoris en població pediàtrica i adults i que troben uns percentatges que van del 29,1% al 42,1% ^{144, 152, 154, 156, 167, 178} i és diferent d'altres treballs que troben percentatges superiors al

70%^{141, 146, 157, 162}. Aquesta diferència en el percentatge podria ser deguda a que aquests últims treballs van ser realitzats només amb mostres obtingudes de nens petits, en especial en nens menors de sis mesos d'edat^{146, 157} amb infecció respiratòria o en nens amb diagnòstic clínic de bronquiolitis^{141, 162}. És àmpliament conegut que el RSV és la principal causa d'infecció respiratòria en nens petits^{163, 171, 179-184} i concretament de bronquiolitis^{141, 163, 179, 181}. En el nostre estudi l'elevat percentatge de població pediàtrica (71,5%) explicaria el perquè el RSV ha estat el virus més detectat durant tot el període, ja que el 91,6% dels RSV detectats es van trobar en menors de tres anys d'edat. No obstant, la infecció per RSV no és limitada als nens més petits, ja que també causa reinfeccions al llarg de la vida i en persones de totes les edats^{67, 68, 154, 185}. Així en el grup de pacients entre tres i divuit anys es van detectar el 4,3% i en els majors de 18 anys d'edat, un 4% dels RSV totals. En aquest grup de pacients de més de divuit anys el RSV corresponia al 2,2% de virus detectats. Aquesta dada es comparable a l'obtinguda en estudis que han utilitzat mètodes moleculars i que han reportat taxes de detecció que van del 1,8 al 20% de casos positius per RSV en pacients adults amb afectació respiratòria^{132, 178, 186, 187}. La cerca activa d'aquest virus que es considerava casi exclusivament pediàtric, en pacients de totes les edats, ha portat a reconèixer el seu paper en la infecció respiratòria en adults.

La infecció per RSV es presenta amb una distribució estacional molt marcada. En el nostre estudi es detecta cada any entre els mesos de novembre i febrer (92%), i és gairebé inexistent durant l'estiu. Durant els 17 anys de l'estudi únicament es van detectar 9 casos als mesos de juny, juliol i agost. Aquests resultats concorden amb altres autors que també descriuen en climes temperats els brots epidèmics cada any durant els mesos d'hivern^{168, 171, 172, 178}. La circulació del virus es troba associada a la baixa temperatura exterior¹⁷⁵ tant de l'hemisferi nord com a països de l'hemisferi sud, on la detecció es produeix als mesos juny, juliol i agost¹⁴⁶. Per contra, als climes tropicals, la detecció està més associada a la època de pluges^{157, 165, 173} o pot donar-se durant tot l'any^{156, 179}.

El FLUAV va ser el segon virus més detectat, representant el 28,7% del total de positius. Aquestes xifres coincideix amb la d'altres autors que refereixen una positivitat entre el 26 i 27,9% de FLUAV en els seus estudis^{156, 188}, i en canvi resulta superior a la trobada per altres autors que només detecten aproximadament un 8% de FLUAV en el total de virus detectats^{146, 157}. Aquestes diferències ens mostren que tot i que la infecció per FLUAV es presenta en forma epidèmica cada any, no tots els anys es presenta amb la mateixa intensitat.

En el nostre estudi 73% de FLUAV es van detectar de desembre a març i només el 6,2% de juny a setembre. Es coneix que en climes temperats de l'hemisferi nord com el nostre, la infecció per FLUAV es presenta en forma epidèmica principalment durant els mesos d'hivern i és pràcticament inexistent durant els mesos d'estiu ^{155, 178}. En el cas dels estudis realitzats en l'hemisferi sud, la infecció per FLUAV també es donava principalment durant els mesos freds ¹⁴⁶. Per contra, en els climes tropicals, la seva detecció està més lligada a l'època de pluges ¹⁴⁶ o es pot trobar durant tot l'any ^{156, 157}.

Excepcionalment, durant els anys 1998, 1999, 2000 i 2009, es va detectar FLUAV durant tots els mesos de l'any, així com a l'estiu de l'any 2005. Durant els anys 1998 al 2000, la soca de grip A (H3N2) circulant fins al moment va sofrir diverses mutacions que li conferien la capacitat d'escapar al sistema immune ¹⁸⁹, fent que augmentés la seva circulació, tant als Estats Units com a Europa ^{190, 191}. Els casos de l'estiu del 2005 van correspondre a un brot nosocomial en malalts immunodeprimits en el nostre hospital. Altres autors també han descrit brots nosocomials causats per virus gripals fora de l'època epidèmica habitual ¹⁹²⁻¹⁹⁴. Finalment a l'abril del 2009, l'OMS va declarar una pandèmia causada per un nou FLUAV (FLUAV H1N1 pdm09), que va durar fins març del 2010. Els primers casos van arribar al nostre hospital durant el mes de juliol i es va detectar tots els mesos fins febrer del 2010.

Tot i que s'ha trobat FLUAV en pacients de totes les edats, tal i com també confirmen altres autors ¹⁴⁵, ha resultat el virus respiratori detectat amb més freqüència en els pacients de més de divuit anys. El percentatge de detecció d'aquest virus respecte a la resta de virus respiratoris, augmenta amb l'edat. Els nostres resultats, mostren que en pacients menors de sis mesos d'edat el FLUAV es detecta en un 18,6% respecte a la resta de virus respiratoris, mentre que en majors de 60 anys representa el 53%. Altres autors que també han estudiat població de totes les edats, troben una variació similar a la nostra ^{154, 168, 178}. Les infeccions per virus respiratoris es repeteixen al llarg de la vida essent, en general, els quadres clínics cada vegada més lleus. La diferència que es troba en el comportament de les infeccions pel FLUAV és deguda a les variacions del propi virus que fan que la immunitat desenvolupada prèviament per l'organisme no sigui totalment efectiva front el nou virus.

Els FLUBV corresponien globalment al 6,7% del total de virus detectats. Aquest percentatge resulta diferent als obtinguts per altres autors, els quals oscil·len entre el 0,7 i el 3% ^{141, 148, 151, 152, 154, 157, 165, 167}. D'altra banda, Lina *et al.* ¹⁴⁴, en un clima semblant al nostre, van detectar uns percentatges molt més alts, 13,5% de positivitat per FLUBV, i Lin *et al.* ¹⁴⁵ en un estudi realitzat a Taiwan, un 15,9%. Tot i que ambdós estudis es van realitzar emprant mètodes de cultiu cel·lular, en el cas de Lina l'estudi va durar

únicament una temporada d'hivern i el de Lin va durar dos anys, i en tots dos casos els anys d'estudi van ser anteriors als nostres. Segons els *Centers for Disease Control and Prevention for the United States* (CDC), el *National Institute for Medical Research for Europe* (NIMR), i el *National Institute of Infectious Diseases for Japan* (NIID), la incidència de la infecció per FLUBV és variable segons els anys ¹⁹⁵ i no es detecta tots els anys ¹⁵⁵. En aquest sentit, el nostre estudi confirma aquest fet ja que l'any 2004 no es va detectar FLUBV i durant els anys 2000, 2003 i 2010, la detecció d'aquest virus no va superar el 0,3% del total. L'amplitud del nostre estudi, ens ha permès obtenir una visió global de les oscil·lacions del FLUBV al llarg de les diferents temporades. A més, segons les dades proporcionades pel *Ministerio de Sanidad* espanyol la incidència del FLUBV és diferent fins i tot segons les comunitats i en una mateixa temporada epidèmica ¹⁹⁶.

En el nostre estudi el FLUBV es va detectar principalment entre gener i març (87% de tots els FLUBV) coincidint amb altres estudis ¹⁷⁸, i en general, després de l'epidèmia causada pel FLUAV ¹⁹⁷. Així mateix, aquest virus es detectava sobretot en nens d'edat escolar i adults joves, tot i que tots els grups d'edat són susceptibles a la infecció. En la nostra sèrie la població més afectada eren els nens de 5 a 18 anys d'edat, resultats que concorden amb la bibliografia consultada ^{47, 49, 141}.

El hMPV va representar el 5,1% del total dels virus detectats. Aquestes dades són semblants a les obtingudes per altres autors que reporten valors que oscil·len entre el 4 i el 5,7% ^{148, 149, 151} tot i que, a diferència de nosaltres que utilitzàvem IF, els autors esmentats utilitzaven mètodes de detecció d'àcids nucleics. En altres casos, el percentatge de positius emprant tècniques de PCR és major que el nostre, Schlaudecker *et al.* ¹⁶⁶, mitjançant una PCR múltiple detecten un 8,1% de hMPV i Tanner *et al.* ¹⁶⁷ un 11,3% amb una PCR a temps real. Al llarg dels anys analitzats hem pogut veure que la infecció per hMPV es donava normalment després dels casos d'infecció per RSV i virus gripals i principalment a finals d'hivern i principis de la primavera, entre febrer i maig (92%) coincidint amb altres autors ^{70, 155, 178}. Es considera que la major part dels nens menors de cinc anys ja han estat infectats per hMPV ^{70, 198}. En el nostre estudi, la incidència de la infecció per hMPV es va detectar sobretot en els nens de menys de tres anys d'edat tal com apunten altres autors ¹⁹⁸.

Els AdV van ser els tercers virus més detectats durant tot el període d'estudi, representant un 14,7% del total de virus detectats. Aquestes dades coincideixen amb altres publicades que troben AdV en un 12% dels casos i també com a tercer virus més detectat ¹⁵⁶. En canvi, en un estudi realitzat en un camp de refugiats a Kenya durant els anys 2007 i 2010, troben que l'AdV és el virus més detectat (21,7%) ¹⁴⁹. En

aquest cas, això podria ser degut a les condicions de vida en que es trobava la població, considerades d'alt risc per la transmissió d'infeccions, sobretot per la gran densitat de població en espais petits i tancats, i les condicions higièniques dels campaments ¹⁴⁹. Els AdV es van detectar durant tot l'any coincidint amb alguns treballs publicats ^{141, 146, 155, 178}, tot i que la freqüència va ser superior entre finals de tardor i principis de primavera (80%), com també han trobat alguns autors ^{155, 157, 199}.

Els EV i els RV són picornavirus que fins fa poc es consideraven gèneres diferents i que recentment s'han agrupat taxonòmicament en un mateix gènere (veure taula 1 i taula 3). Aquest dos grups de virus es poden diferenciar amb relativa facilitat amb els mètodes convencionals d'aïllament i identificació en cultiu, però no totes les tècniques moleculars comercialitzades permeten aquesta diferenciació (taula 5).

En el nostre estudi realitzat amb tècniques convencionals, hem detectat que els EV eren el 9,3% i els RV el 4,4% de tots els virus detectats. Altres estudis realitzats amb la mateixa metodologia van reportar una detecció més elevada que la nostra, com Lina *et al.* ¹⁴⁴ que refereix que els RV eren el 10% dels virus detectats o Lin *et al.* ¹⁴⁵ que esmenten que els EV eren un 22% dels virus detectats. No obstant, aquests treballs es van realitzar durant només una temporada epidèmica ¹⁴⁴ o dues temporades ¹⁴⁵. En el nostre cas que es van analitzar 17 anys consecutius, la detecció dels EV i RV diferia al llarg dels anys. El percentatge d'EV anava d'un 4,3% l'any 2013 a un 20% l'any 2001, i en el cas dels RV la variació va ser d'un 0,1% l'any 1998 a un 12,6% l'any 2004.

Utilitzant PCR a temps real alguns autors han detectat amb més freqüència RV que RSV en nens menors de sis mesos ¹⁶⁰, i juntament amb els EV, han estat considerats els més predominants en mostres del tracte respiratori superior i inferior, tant en nens petits com en adults ¹⁶⁸. Els percentatges de RV que s'han trobat amb aquestes tècniques, van del 29,3% en mostres de pacients de totes les edats ¹⁶⁷ al 38% en mostres de nens menors de cinc anys ¹⁴⁸. Un cas apart és el d'un treball realitzat en lactants prematurs menors d'un any, on s'ha trobat un percentatge del 79% de RV respecte als altres virus ¹⁶⁴. Aquest elevat percentatge ve donat per què s'inclouien mostres de seguiment dels pacients d'estudi fins l'alta hospitalària. D'altra banda en la majoria dels treballs realitzats amb tècniques de PCR múltiple no es diferencia entre EV i RV ^{151, 152, 166, 200}. En aquests treballs, les taxes de detecció per EV/RV varien del 21,5 al 35%.

En general, els resultats obtinguts amb tècniques moleculars per la detecció de RV són superiors als obtinguts amb tècniques de cultiu cel·lular. Els RV són els agents causals més comuns de les infeccions respiratòries de vies altes i se sap que també causen infeccions asimptomàtiques. En la població infantil s'han detectat RV, per tècniques moleculars entre un 12 i un 32% de nens asimptomàtics ⁷³. La detecció de RV en aquests casos pot reflectir diferents situacions com l'eliminació perllongada després d'una infecció simptomàtica, la presència de símptomes molt lleugers que passen desapercebuts o l'estat d'incubació de la malaltia ⁷³. En aquest sentit les taxes de detecció més baixes obtingudes amb els mètodes convencionals podrien ser degudes a que reflecteixen les infeccions actuals. Per altra banda cal tenir en compte la recent descripció de l'espècie de RV-C. Els virus d'aquesta espècie no es detecten amb els mètodes convencionals.

Tants els EV com els RV mostren un caràcter endèmic ¹⁵⁵. En general, RV i EV tenen una corba de distribució bimodal, amb pics estacionals a la primavera i la tardor ^{45, 200}. Aquestes dades coincideixen amb les nostres troballes, ja que com altres autors es van detectar els RV principalment durant finals de primavera i la tardor (63% de tots els RV) ¹⁵⁵ i els EV sobretot entre els mesos de març i juliol (51% dels EV) i també durant octubre i desembre (30% dels EV) ¹⁴⁵.

Els RV i els EV es van detectar principalment en nens menors de tres anys d'edat, en especial en nens menors de sis mesos, on representaven el 12,1% i el 6,4% dels virus detectats en aquesta franja d'edat, i en nens d'entre un i tres anys d'edat els EV un 9,4% i els RV un 2,9% dels virus detectats. Aquestes dades estan per sota de les obtingudes en un estudi realitzat en menors amb símptomes de bronquiolitis, on els RV representaven el 21% dels virus detectats i els EV el 9% ²⁰¹. En aquest estudi, no obstant, tant els EV com els RV es van determinar mitjançant tècniques de PCR, mentre que la resta de virus respiratoris es van determinar emprant tècniques convencionals. D'altra banda, en estudis realitzats en població pediàtrica, es va observar que l'edat mitja d'infecció per EV/RV era de 2,4 anys d'edat ²⁰⁰, així com que els EV es troben sobretot en pacients entre un i cinc anys d'edat ¹⁴⁵.

El grup dels PIV va constituir el 5,2% dels virus detectats. Els PIV-1 van representar l'1,1%, els PIV-2 el 0,8% i els PIV-3 el 3%, la resta van ser els casos de PIV no tipats i els casos de PIV-4. Aquestes dades són similars a les d'Östlund *et al.* ¹⁵⁴, que en un estudi realitzat amb mostres de pacients de totes les edats, troben que el 6,7% del total dels virus detectats són PIV. D'altra banda els estudis realitzats només amb mostres pediàtriques difereixen dels nostres resultats. Així en un estudi realitzat amb nens menors de 12 anys, van detectar uns percentatges de PIV-1 (1%) i de PIV-3 (2,7%) similars als nostres, no així

els de PIV-2 (2,3%) que van ser superiors ¹⁶⁵. Altres autors que també s'han centrat en aquest tipus de població ^{141, 157}, detecten els PIV com els segons després del RSV com a causants d'infecció respiratòria en nens, dades molt diferents a les nostres, en les que són els sisens en freqüència. Aquests autors troben una positivitat similar a la nostra en quan a PIV-1 i PIV-2 (1,3 i 1,0%, respectivament), però detecten PIV-3 amb una freqüència del 7,8% ¹⁴¹, mentre que en un altre estudi la detecció del PIV-1 era del 3,1%, el PIV-2 el 0,9% i el PIV-3 el 7,8% ¹⁵⁷. Podríem atribuir les diferències en la detecció d'aquests virus al tipus de població inclosa, ja que hem de tenir en compte que en el nostre el 30% dels pacients tenien més de 14 anys (dades no mostrades als resultats).

D'altra banda es coneix que els PIV no circulen de manera regular al llarg de l'any ni dels anys i varia segons les zones geogràfiques ¹⁷². En el nostre cas els PIV-1 i PIV-2 no es van detectar tots els anys d'estudi, mentre que el PIV-3 sí, com ja ha estat referit a la literatura ¹⁵⁵. Els nostres casos d'infecció per PIV-1 es van presentar gairebé durant tots els anys d'estudi, tret de l'any 2012. Així mateix, tot i tenir una distribució al llarg de tot l'any, es van detectar principalment durant la tardor, aquestes dades coincideixen amb altres autors que els van detectar principalment entre setembre i desembre ¹⁷². Per contra, en un clima tropical els PIV-1 es troben durant els mesos de març a maig ¹⁵⁷. Els PIV-2, van ser els virus menys detectats en el nostre estudi (sense tenir en compte els PIV no tipats i els PIV-4), i principalment es van trobar durant els mesos de setembre a novembre, tret de l'any 1997 on es van detectar 10 casos al març, i no es va detectar cap cas en els mesos de maig i juny. Aquesta distribució estacional dels PIV-2 coincideix amb la descrita per alguns autors ^{141, 172}, tot i que altres conclouen que no presenten un patró estacional concret ¹⁴⁷ o que presenten un patró bianual ¹⁷². Nosaltres no hem pogut establir aquests comportament, tot i que les diferents deteccions de PIV-2 semblaven seguir la tendència d'aparèixer cada dos anys. Finalment, el PIV-3 va ser el PIV més detectat en el nostre estudi, presentant una distribució estacional amb pics epidèmics durant la primavera i tardor, fet que concorda amb la bibliografia en la que es descriu que apareix tots els anys i sobretot d'abril a juny ^{157, 172}.

Els PIV-4 detectats en aquest estudi van ser només 2, ja que es tracta d'un virus que no es multiplica bé en cultius cel·lulars i pel que habitualment no es realitza la detecció d'antigen. Els estudis que inclouen aquest virus presenten una positivitat del 4,1% ¹⁶⁶ al 5,8% ⁶².

Pel que fa a l'edat, els casos d'infecció per PIV-1 i PIV-3 es van detectar principalment en nens menors de sis mesos, mentre que en el cas del PIV-2 el major número de casos va ser en menors de sis mesos i en el rang entre un i tres anys d'edat. Això concorda amb els treballs consultats que descriuen les

infeccions més greus per PIV-1 i PIV-2 en nens de entre quatre mesos i sis anys mentre que el PIV-3 es comporta com el RSV ⁶³.

Com a resum general podríem dir que durant els mesos d'hivern, es detecten sobretot el RSV, el hMPV i els virus gripals. Aquests virus es solen presentar en forma d'epidèmies anuals durant el mesos d'hivern i principis de primavera, generalment entre novembre i març. En la nostra experiència el primer que es detecta sol ser el RSV al mes de novembre, seguit del FLUAV, el FLUBV i per últim el hMPV al mes de febrer i fins l'abril. A banda de les epidèmies dels mesos d'hivern causades pels virus ja esmentats, també s'han detectat casos d'infecció respiratòria al llarg de la resta de l'any, causades per altres virus com els AdV, els EV, els RV i els PIV-3. Aquests virus són endèmics en diferents àrees geogràfiques ^{145, 154, 155, 175} i en la nostra experiència, també en la nostra.

Amb la millora constant de les tècniques pel diagnòstic de les infeccions respiratòries víriques s'ha observat un increment en el número de co-deteccions de diferents virus respiratoris ¹⁵⁰. Aquest fet és més freqüent quan s'augmenta el ventall de virus estudiats i quan s'utilitzen diferents tècniques simultàniament com la detecció d'antígens o tècniques de detecció d'àcids nucleics. L'increment és especialment significatiu al utilitzar les tècniques moleculars on el que es detecta són fragments d'àcids nucleics i no partícules infectives com és el cas del cultiu cel·lular ¹⁵⁰. Les dades de co-detecció vírica utilitzant tècniques convencionals com el cultiu i/o detecció d'antigen, i algunes de les primeres tècniques moleculars, donaven una xifra al voltant del 10%, mentre que actualment amb les tècniques moleculars actuals, la xifra ha augmentat fins a més del 44% en els nens petits ¹⁵⁰.

En el nostre estudi utilitzant mètodes de detecció d'antigen i aïllament en cultiu cel·lular, es van obtenir co-deteccions en el 3,2% de les mostres positives. Les nostres dades estan per sobre de les obtingudes per altres autors que també utilitzaven tècniques convencionals per a la detecció ^{141, 157}, no així en el cas dels que van utilitzar tècniques moleculars. Comparant amb estudis que utilitzen mètodes de PCR, els nostres resultats estan molt allunyats dels reportats a la literatura, on la freqüència de co-deteccions va des d'un 10 al 50% ^{149, 167, 168, 202}, per tant pensem que el nostre nombre de co-deteccions més baix estaria lligat a les tècniques utilitzades, donat que amb les tècniques moleculars es poden detectar més virus respiratoris diferents. L'impacte clínic real de les co-deteccions encara ens resulta desconegut, alguns autors parlen d'una relació entre un curs clínic més greu i la detecció de més d'un virus respiratori ²⁰², mentre que d'altres no troben la mateixa associació ²⁰³.

En aquest treball, la co-detecció més freqüent va ser entre RSV i FLUAV, a l'igual que descriuen Östlund *et al.* ¹⁵⁴. Per altra banda Ambrosioni *et al.* ¹⁶⁸ descriuen com a co-deteccions més freqüents les de RV i AdV, atribuint-ho al fet que són virus que es troben durant tot l'any. Així mateix, sembla que les co-deteccions entre diferents virus respiratoris no són aleatòries. En un estudi publicat per Tanner *et al.* ¹⁶⁷ es mostrava que hi havia associacions més comuns entre alguns virus, i destacava la freqüència d'associació entre RV i AdV, mentre que era menys comú entre virus gripals i RV. Els nostres resultats també demostren una baixa freqüència de l'associació entre FLUAV i RV, i tot i que les co-deteccions entre AdV i RV no siguin les més detectades, sí que trobem que els AdV són els virus amb més co-deteccions amb la resta de virus respiratoris.

Les co-deteccions, es van trobar principalment durant els mesos d'hivern, coincidint amb el màxim de virus positius detectats. En el nostre cas, utilitzant els mètodes convencionals, es donen sobretot en el període estacional en el que la circulació de virus és més intensa i concretament quan circulen RSV i FLUAV. En canvi quan s'utilitzen mètodes moleculars (dades mostrades taula 33), els virus que es troben amb més freqüència en les co-deteccions són els virus que es detecten al llarg de tot l'any, com els RV i els AdV, tal i com han trobat altres autors ¹⁶⁸.

Tal i com s'esperava la positivitat més alta es va obtenir en la població pediàtrica (pacients menors de 18 anys d'edat) on el 42,5% de les mostres van ser positives per al menys un virus respiratori, front al 18,5% en la població adulta. Així mateix, entre la població pediàtrica, el percentatge més elevat de positius es va obtenir en els rangs d'edat de sis a 12 mesos i d'un a tres anys. L'elevada positivitat en nens petits ve donada perquè és en aquesta edat que tenen el primer contacte amb aquests virus i la infecció dona lloc a manifestacions clíniques més evidents i a vegades més greus. També degut a aquesta circumstància, la càrrega viral és significativament més gran que en els adults ¹⁶⁸ en els que les infeccions solen ser de repetició. A més, el petit diàmetre de les vies respiratòries i el desenvolupament incomplet de l'estructura pulmonar, poden explicar el per què els nens tenen més malalties causades per virus respiratoris ¹⁹⁸. D'altra banda, tot i que els menors de sis mesos són el grup de pacients dels que es van rebre més mostres, la positivitat va resultar inferior (37,4%) a la dels nens entre els sis mesos i els tres anys d'edat (51%). Aquest fet s'ha explicat dient que els nens més petits presenten una protecció front alguns virus respiratoris durant els primers mesos de vida deguda als anticossos materns ⁵.

En mostres pediàtriques es van detectar tots els virus estudiats, i com era d'esperar, el virus més detectat va ser el RSV, especialment en menors d'un any, mentre que en els adults no es van detectar tots els virus respiratoris, i el virus més trobat va ser el FLUAV. Cal assenyalar que la taxa de detecció dels virus respiratoris diferents als virus gripals en els adults pot haver estat subestimada, ja que, el 27,4% de les mostres respiratòries d'adults es van processar només per la detecció dels virus gripals. A més, els adults ja tenen un cert nivell d'immunitat a través de l'exposició prèvia als mateixos virus respiratoris, per la qual cosa l'excreció del virus pot no durar tant com en els nens ¹⁷⁸ i la càrrega vírica ser més baixa ¹⁶⁸. D'altra banda hi ha un major número de co-deteccions en l'edat infantil que en pacients adults. Els nostres resultats revelen que un 80% de les co-deteccions s'han trobat en pacients menors de tres anys, tal i com descriuen altres autors ¹⁶⁸.

Pel que fa a l'estudi poblacional, es va trobar que del total de mostres estudiades el 55,6% corresponien a homes, front al 43,6% que eren de dones. La major detecció d'infeccions en homes que en dones concorda amb alguns treballs, en els que es descriu el sexe masculí com el més afectat pels diferents virus respiratoris ^{145, 152, 157, 165, 184, 199} en canvi altres autors, detecten més infeccions en el sexe femení ^{151, 153}. Ara bé, les dades són dispars, ja que Shatizadeh *et al.* ¹⁹⁹ associa una major detecció de RSV, PIV-1, virus gripals i hMPV amb el sexe femení, i una major detecció d'AdV amb el sexe masculí, a diferencia de Muenchhoff *et al.* ¹⁸⁴, que diu que el RSV i el PIV estan més associats al sexe masculí. En el nostre estudi no es van trobar diferències significatives en la freqüència de detecció d'un virus respiratori en particular segons el sexe dels pacients, tret dels casos de FLUAV detectat més en homes, on si es va trobar una significació estadística.

En general, es creu que les possibles diferències en les infeccions entre homes i dones estarien degudes a que les dones tenen respostes immunes humorals i cel·lulars més fortes a les infeccions que els homes, principalment, a causa de l'impacte de les hormones sexuals, en especial els estrògens, en el desenvolupament del sistema immune ¹⁸⁴. No obstant, tot i que en condicions normals les dones semblen tenir una predisposició a les malalties infeccioses menor que els homes, en el nostre estudi, relacionant les edats amb el sexe dels pacients es va observar que en pacients de 30-40 anys d'edat les dones tenien més infeccions respiratòries víriques que els homes. Una possible explicació podria ser que en certes edats les dones joves estan en més contacte amb nens petits que els homes de la mateixa franja d'edat. En aquest sentit, les mares treballadores tenen menys infeccions respiratòries que les mares que cuiden els nens a casa ²⁰⁴. Per altra banda hi ha més risc de desenvolupar una malaltia

respiratòria en una família en la que hi ha un membre que estigui malalt, ja que els principals introductors de malalties són els nens petits en edat preescolar i els següents són les mares ²⁰⁴.

A l'abril de 2009 l'OMS va declarar el començament d'una pandèmia causada per un virus gripal A (FLUAV H1N1 pdm09) i que va durar fins el març de 2010. Coincidint amb aquesta pandèmia, en la que la detecció d'aquest virus va ser prioritària, també van circular altres virus respiratoris. En la nostra experiència, dels virus trobats durant aquest període, el FLUAV va ser el més detectat i va correspondre al 43% de tots els virus, per sobre del RSV i dels altres virus respiratoris, tal com també es recull a la literatura ²⁰⁵.

A Espanya, a banda del virus pandèmic, els altres virus respiratoris detectats per quatre laboratoris regionals diferents van ser per ordre de freqüència els RV, RSV, PIV, AdV i hMPV ²⁰⁵. En la nostra experiència, la detecció més freqüent després del FLUAV van ser el RSV, seguit del AdV i del EV, mentre que RV i PIV es van detectar en menys casos. No obstant, tot i que desconeixem les tècniques emprades en els laboratoris abans esmentats, l'elevat número de RV i PIV fa pensar que les tècniques emprades eren moleculars, a diferència de les utilitzades en el nostre estudi en el que només es va utilitzar la PCR pels virus gripals.

Alguns autors parlen d'una possible interferència entre el FLUAV H1N1 pdm09 i el RSV, ja que durant la pandèmia, el pic d'incidència del RSV es va retardar respecte a altres anys ²⁰⁵⁻²⁰⁷. Els nostres resultats no confirmen aquesta dada, ja que es va detectar el pic del RSV en els mateixos mesos que els anys anteriors (figura 39). Aquestes dades coincideixen amb les dades d'Espanya, on es veu que la incidència del RSV i la grip pandèmica van ser independents, al contrari del que es va registrar a França ²⁰⁵.

Es coneix que diversos virus circulen simultàniament entre la població i que les manifestacions clíniques de la infecció respiratòria vírica no són específiques d'un virus concret ^{167, 206}. En aquest sentit els nostres resultats mostren la circulació freqüent d'altres virus durant les epidèmies o pandèmies de virus gripals. Més del 50% dels virus detectats en pacients amb infecció respiratòria durant la pandèmia 2009/2010 corresponien a altres virus respiratoris.

Les proves d'amplificació d'àcids nucleics (NAAT) s'han convertit en una alternativa que ofereix una alta sensibilitat en comparació amb els mètodes convencionals ^{45, 208, 209}. Tot i que les tècniques basades en la PCR estaven limitades inicialment pel baix nombre de virus que podien ser detectats en una sola prova ^{142, 186, 210, 211}, actualment ja hi ha disponibles nombrosos assajos de PCR múltiple comercialitzats,

que permeten detectar diversos virus en un únic assaig, incloent aquells que no es podien detectar pels mètodes convencionals ^{123-129, 135}.

Així doncs, es van avaluar dues tècniques basades en diferents tecnologies moleculars, els sistemes Seeplex® i CLART®, per tal de comparar-los amb els mètodes convencionals, la immunofluorescència (IF) i el cultiu cel·lular (CC). Ambdues NAAT han estat aplicades per altres autors ^{124-129, 134, 135}, però no tots utilitzaven dos mètodes convencionals per a la comparació i tret de Culebras *et al.* ¹³⁵, cap altre treball comparava les dues NAAT entre si.

La principal troballa d'aquesta comparació va ser que les NAAT donaven resultats diferents entre elles. Aquest fet podria ser especialment preocupant tant en el diagnòstic correcte de l'etiologia viral d'un procés infecció com en la pràctica clínica. Moltes variables poden afectar els resultats obtinguts per les NAAT i per tant dificultar la comparació entre elles. Pel que fa a la mostra, aquestes variables són l'edat del pacient, el tipus de mostra, la seva correcta obtenció i en quin moment es fa l'extracció ²¹². Al laboratori, les principals variables són si la mostra es processa immediatament o no, el mètode d'extracció d'àcids nucleics utilitzat i les pròpies instal·lacions del laboratori. Finalment, una variable addicional seria la pròpia experiència del personal que realitzi tots els processos.

Com era d'esperar, les NAAT van detectar més virus que les tècniques convencionals. Al comparar Seeplex® i CLART® amb els mètodes convencionals, els resultats de CLART® concordaven amb els dels convencionals amb més freqüència i tenien una taxa de detecció més elevada que els de Seeplex®. Una de les causes podria ser el ventall diferent de virus cobert per cada tècnica. Ambdues NAAT han estat prèviament estudiades per altres autors, però els mètodes utilitzats com a *gold standard* eren diferents ^{124-129, 134, 135}. Això posa en evidència que el principal inconvenient per a la comparació de diferents NAAT és la falta d'un veritable *gold standard*.

Tant els mètodes convencionals com les NAAT, van donar resultats similars per RSV i AdV. En el cas del RSV, la IF va resultar més sensible que el CC, i era igual de sensible que ambdues NAAT. En el cas d'AdV, l'aïllament en CC resulta necessari donada la poca sensibilitat de la IF, i el nombre d'AdV aïllats coincidien amb els detectats per les NAAT. Aquests resultats coincideixen amb l'experiència assolida pel nostre grup en les últimes dues dècades i també amb els resultats d'altres autors ^{45, 128, 213, 214}. Si tenim en compte els virus detectats només per PCR, observem que aproximadament el 72% corresponien a RV, hMPV, HCoV-OC43, PIV-4, FLUCV i HBoV, que no es detecten fàcilment amb les

tècniques convencionals, ja sigui per falta de reactius antigènics o per la dificultat de multiplicar-se en cultiu. Tot i així, les NAAT han estat clau per al diagnòstic de nous virus que no es multipliquen en els cultius cel·lulars habituals, com es el cas dels HCoV i HBoV, i la nova espècie de RV (RV-C). En el nostre cas, es van detectar 16 HBoV, i cinc HCoV-OC43 mitjançant l'única NAAT que incloïa aquests virus. Així mateix, amb les NAAT es va incrementar el nombre de RV detectats, fet que concorda amb estudis realitzats per altres autors^{124, 128, 136, 142, 215}. De totes maneres, cal tenir present que els estudis realitzats amb cultius cel·lulars tenen com a principal aportació la capacitat de confirmar la viabilitat i infectivitat d'un virus respiratori i el descobriment de nous virus o serotips prèviament no identificats⁴.

Malgrat les altes expectatives en les NAAT, no sempre donen un resultat vàlid donat que en alguns casos s'observa una inhibició de la reacció i això representa un gran inconvenient d'aquestes tècniques. La inhibició es dona principalment per les característiques pròpies de la mostra en si i/o del protocol d'extracció, encara que altres aspectes inherents als mètodes també poden afectar-ne el resultat. En el nostre cas, ambdues NAAT van donar resultats inhibits, 10 mostres mitjançant el mètode Seeplex® (12,5%) i 11 per CLART® (14%). Únicament en dos casos les mostres van resultar inhibides per ambdues tècniques, el que suggereix que possiblement els inhibidors estaven a la mostra o hi va haver problemes a l'hora d'obtenir l'extracte. Ara bé, en la resta de mostres inhibides, els resultats obtinguts diferien entre les dues tècniques, tot i utilitzar el mateix extracte, això ens suggereix que els propis mètodes i reactius utilitzats en l'amplificació i detecció poden inhibir l'amplificació, el que implica una dificultat afegida.

Per altra banda, si s'utilitzen únicament NAAT, ens podem trobar amb que determinats virus no siguin detectats per qüestions de disseny de la prova. Així, és obvi que si els reactius moleculars no contenen els encebadors i sondes per a un determinat virus, aquest no serà detectat. Aquest fet és especialment rellevant en situacions clíniques on el ventall d'agents etiològics pot ser molt ampli incloent virus que són poc freqüents. Aquest pot ser per exemple el cas dels virus no considerats com estrictament respiratoris i que en el grup de pacients immunodeprimits poden donar afectació en aquest nivell, com és el cas de l'herpesvirus humà 5 detectat pel CC. Una altre limitació, és la possible variabilitat que els virus puguin presentar en les regions on s'han d'unir els encebadors i les sondes dissenyades. En aquesta situació es poden generar resultats falsament negatius. Per tant, els laboratoris estan obligats a revisar constantment els virus inclosos en els assaigs que utilitzen; especialment si basen el seu diagnòstic només en NAAT²¹⁶.

Les NAAT han creat un nou escenari en el diagnòstic de les infeccions respiratòries virals, el gran número de co-deteccions virals ^{44, 217, 218}. En el nostre cas, es van obtenir un gran nombre de co-deteccions amb les NAAT i cap mitjançant les tècniques convencionals. En comparació amb Seeplex®, la tècnica CLART® va triplicar el nombre de co-deteccions detectades. Aquesta elevada taxa de co-deteccions coincideix amb altres autors que també van utilitzar Seeplex® ^{124, 126, 127, 219} o CLART® en mostres pediàtriques ^{134, 135}. L'elevat nombre de co-deteccions trobades pot ser degut a que la població d'estudi era pediàtrica, ja que en aquest tipus de pacients es pot presentar més d'un quadre infecció a la vegada i es difícil discernir entre infeccions presents o passades ^{45, 208, 209, 212}.

Així, la pregunta important seria, quina és realment la rellevància clínica dels resultats obtinguts per les NAAT? Donat que cobreixen un ampli ventall d'agents etiològics, aquestes tècniques poden ser especialment útils en pacients immunodeprimits o en estat crític, tot i que el seu impacte clínic encara no està ben definit ^{220, 221}. No obstant això, com mitjançant les NAAT es poden detectar fragments d'àcids nucleics, independentment de la presència d'antígens virals o de virus amb capacitat infecciosa ^{4, 77}, un resultat positiu podria reflectir una infecció present o bé una infecció anterior ^{45, 208, 209, 212}. En aquests casos, la determinació de la càrrega viral podria ser un indicador per predir la correlació d'un virus i un determinat quadre clínic, però aquesta relació no està encara ben establerta per a les infeccions respiratòries víriques ^{85, 217}.

La prevalença dels virus respiratoris detectats mitjançant les NAAT, difereix entre els nens simptomàtics i asimptomàtics i segons el virus ²²². A més, s'ha vist que els nens en els que es troben co-deteccions no difereixen en simptomatologia o en intensitat de la malaltia dels nens que tenen una infecció respiratòria causada per un únic virus, però si sembla que l'eliminació del virus és més perllongada ¹⁵⁰. Alguns virus, com ara el RSV, s'associen generalment amb malaltia clínica, i la seva detecció en pacients amb símptomes respiratoris, implicaria que es tracta de l'agent etiològic causant de la malaltia en curs. Per contra, virus com els RV, HCoV i HBoV solen trobar-se freqüentment en nens asimptomàtics ^{85, 223}, i per tant la seva detecció no necessàriament implica que juguin un paper etiològic en els pacients amb símptomes respiratoris, Es necessiten més estudis sobre aquesta qüestió.

L'adequat maneig de les infeccions requereix de la capacitat, per part del laboratori, de generar resultats dins d'una escala de temps clínicament rellevant. El laboratori de microbiologia ha de tenir-ho en compte a l'hora d'escollir una prova diagnòstica. Les NAAT són més ràpides que el CC, el qual requereix entre dos dies i 14 dies, mentre que la majoria de PCR múltiplex poden donar un resultat entre sis i nou

hores. No obstant això, la majoria de NAAT no són més ràpides que la IF o la IC. Certes proves d'IC per RSV o FLUAV/FLUBV, són les més ràpides que existeixen i proporcionen un resultat amb una especificitat molt alta, en especial pel RSV, en aproximadament 15-30 minuts ²²⁴. Per tant, en èpoques de situació epidèmica, les quals es donen en el nostre medi cada temporada, l'ús de tècniques d'IC com a primera tria per a la detecció de virus com el RSV o la grip, pot accelerar els resultats i aportar simplicitat al laboratori. En aquests casos, tan sols els resultats negatius requeririen d'un segon anàlisi amb tècniques més sensibles, ja sigui per cultiu o per PCR, per poder determinar l'agent causal de la infecció ^{112, 222}.

Per tant, la combinació de diversos mètodes de diagnòstic per les infeccions respiratòries virals segueix sent una excel·lent opció. Ara bé s'ha de tenir en compte que no tots els laboratoris poden tenir les instal·lacions o el personal necessaris per dur a terme una ampli ventall de tècniques. Sí be és cert que les NAAT s'estan utilitzant cada vegada més, creiem que necessiten un major desenvolupament. Està demostrat que aquestes tècniques són particularment útils en la detecció de nous virus respiratoris i en donar un resultat ràpid, però la interpretació no sempre resulta senzilla. Sens dubte, el gran repte que planteja el diagnòstic molecular de les infeccions respiratòries víriques no és altre que poder determinar si el virus detectat en el tracte respiratori és el causant del quadre clínic del pacient. El viròleg clínic ha de considerar els pros i els contres de la tècnica utilitzada i de l'impacte clínic del resultat obtingut.

CONCLUSIONS

1. El diagnòstic virològic de les infeccions respiratòries utilitzant tècniques de cultiu cel·lular, detecció d'antigen i detecció d'àcids nucleics, permet establir l'etiologia en un 36% dels casos. En la majoria de casos es detecta un únic virus, no obstant en un 3% de les mostres se'n troba més d'un.
2. La freqüència de la detecció de cadascun dels virus és variable. Els virus que es detecten amb més freqüència són el RSV i el FLUAV cada un d'ells representant un 29% dels virus detectats. Els segueix l'AdV amb un 15% i la resta de virus respiratoris amb una freqüència individual inferior al 10%.
3. La presència de cadascun dels virus és inconstant segons els anys. Els RSV, FLUAV, AdV, EV, PIV-3 i hMPV es detecten tots els anys mentre que la resta no.

4. Durant els mesos d'hivern es detecten més virus respiratoris que als mesos d'estiu, el 77,5% dels virus detectats es troben entre novembre i març, sent el període màxim de detecció diferent per cadascun d'ells.
5. En els pacients menors de 18 anys es detecten més virus que en la resta. En els pacients d'un a tres anys i en els de tres a cinc es detecta almenys un virus en més del 50% dels casos. En pacients majors de 18 anys, el percentatge de positivitat és al voltant del 15%.
6. La freqüència de detecció de cada virus respiratori és diferent segons l'edat. En menors de tres anys s'han detectat tots els virus, essent el RSV el més comú. En majors de 18 anys el virus més freqüent és el FLUAV.
7. Es detecten més virus respiratoris en homes que en dones excepte en els grups de 18 a 40 anys.
8. La circulació del virus gripal A és simultània a la circulació d'altres virus respiratoris. Durant la pandèmia de virus gripal de 2009/2010 més de la meitat dels virus respiratoris detectats, un 57%, corresponen a virus no gripals.
9. Les tècniques moleculars donen resultats diferents entre elles i amb els mètodes convencionals. Les tècniques moleculars són les més sensibles i permeten la detecció de virus que no es detecten per les tècniques convencionals. Dels virus detectats només per PCR, el 72% corresponen a RV, hMPV, HCoV-OC43, PIV-4, FLUCV i HBoV.
10. Utilitzant tècniques moleculars pel diagnòstic de la infecció respiratòria en nens es troba un elevat nombre de co-deteccions. En un 38% de les mostres es detecta més d'un virus.
11. En el diagnòstic molecular de les infeccions respiratòries, especialment en la població pediàtrica, la interpretació clínica del resultat obtingut requereix d'una avaluació individualitzada en el context del pacient.

BIBLIOGRAFIA

1. **Kaslow RA, Evans AS.** 1997. Epidemiologic Concepts and Methods. A: Evans AS, Kaslow RA (ed), *Viral Infections of Humans Epidemiology and Control*, Fourth ed. ed, p 3-58. Plenum Medical Book Company, New York.
2. **Buller R, Arens M.** 2011. Molecular detection of respiratory viruses. A: Persing D, Tenover F, Tang Y, Nolte F, Hayden R, van Belkum A (ed), *Molecular microbiology Diagnostic principles and practice*, Second ed. ed, p 605-630. ASM Press, Washington, DC.
3. **Almendral JM, Carrasco L.** 2006. Concepto de virus e historia de la Virología. A: Carrasco L, Almendral JM (ed), *Virus Patógenos*, p 29-40. Helice, Madrid.
4. **Pagarolas AA, Suñé TP.** 2014. Diagnóstico microbiológico de las infecciones virales respiratorias en el paciente adulto. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **32 Suppl 1**:51-56.
5. **Tregoning JS, Schwarze J.** 2010. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clin Microbiol Rev* **23**:74-98.
6. **Navarro-Marí J, Pérez-Ruiz M.** 2007. Virus respiratorios: viejos y nuevos virus. Revisión de métodos diagnósticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **25**:60-65.

7. **Nichols WG, Peck Campbell AJ, Boeckh M.** 2008. Respiratory viruses other than influenza virus: impact and therapeutic advances. *Clin Microbiol Rev* **21**:274-290.
8. **Cherry J.** 2004. The common cold. A: Feigin R, Cherry J, Demmler G, Kaplan S (ed), *Textbook of pediatric infectious diseases*, Fifth ed. ed, vol 1, p 140-146. SAUNDERS, Philadelphia, Pennsylvania.
9. **Cherry J.** 2004. Pharyngitis (Pharyngitis, Tonsillitis, Tonsillopharyngitis, and Nasopharyngitis). A: Feigin R, Cherry J, Demmler G, Kaplan S (ed), *Textbook of pediatric infectious diseases*, Fifth ed. ed, vol 1, p 161-169. SAUNDERS, Philadelphia, Pennsylvania.
10. **Cherry J.** 2004. Epiglottitis (Supraglottitis). A: Feigin R, Cherry J, Demmler G, Kaplan S (ed), *Textbook of pediatric infectious diseases*, Fifth ed. ed, vol 1, p 241-251. SAUNDERS, Philadelphia, Pennsylvania.
11. **Klein J, Bluestone C.** 2004. Otitis Media. A: Feigin R, Cherry J, Demmler G, Kaplan S (ed), *Textbook of pediatric infectious diseases*, Fifth ed. ed, vol 1, p 215-234. SAUNDERS, Philadelphia, Pennsylvania.
12. **Chonmaitree T, Alvarez-Fernandez P, Jennings K, Trujillo R, Marom T, Loeffelholz MJ, Miller AL, McCormick DP, Patel JA, Pyles RB.** 2015. Symptomatic and asymptomatic respiratory viral infections in the first year of life: association with acute otitis media development. *Clin Infect Dis* **60**:1-9.
13. **Cherry J, Shapiro N, Deville J.** 2004. Sinusitis. A: Feigin R, Cherry J, Demmler G, Kaplan S (ed), *Textbook of pediatric infectious diseases*, Fifth ed. ed, vol 1, p 201-211. SAUNDERS, Philadelphia, Pennsylvania.
14. **Cherry J.** 2004. Croup (Laryngitis, Laryngotracheitis, Spasmodic Croup, Laryngotracheobronchitis, Bacterial Tracheitis, and Laryngotracheobronchopneumonitis). A: Feigin R, Cherry J, Demmler G, Kaplan S (ed), *Textbook of pediatric infectious diseases*, Fifth ed. ed, vol 1, p 252-265. SAUNDERS, Philadelphia, Pennsylvania.
15. **Cherry J.** 2004. Acute Bronchitis. A: Feigin R, Cherry J, Demmler G, Kaplan S (ed), *Textbook of pediatric infectious diseases*, Fifth ed. ed, vol 1, p 266-269. SAUNDERS, Philadelphia, Pennsylvania.
16. **Gobernado M, Menéndez R.** 2005. Infecciones bronquiales. A: Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S, Alvar Ezquerro J, Bouza Santiago E, Gascón Brustenga J, Gavaldà Santapau J, Gudiol Munté F, Martín Álvarez R, Pachón Díaz J, Pahissa Berga A, Pérez Trallero E, Prats Pastor G, Pumarola Suñé T, Rodríguez Tudela J, de la Torre Cisneros J, Trilla García A (ed), *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, vol 1, p 1209-1215. Editorial Médica Panamericana, Madrid.
17. **Hanson I, Shearer W.** 2004. Chronic Bronchitis. A: Feigin R, Cherry J, Demmler G, Kaplan S (ed), *Textbook of pediatric infectious diseases*, Fifth ed. ed, vol 1, p 270-273. SAUNDERS, Philadelphia, Pennsylvania.

18. **Welliver R.** 2004. Bronchiolitis and Infectious Asthma. A: Feigin R, Cherry J, Demmler G, Kaplan S (ed), Textbook of pediatric infectious diseases, Fifth ed. ed, vol 1, p 273-285. SAUNDERS, Philadelphia, Pennsylvania.
19. **Boyer K.** 2004. Nonbacterial Pneumonia. A: Feigin R, Cherry J, Demmler G, Kaplan S (ed), Textbook of pediatric infectious diseases, Fifth ed. ed, vol 1, p 286-298. SAUNDERS, Philadelphia, Pennsylvania.
20. **WHO.** 2014. Influenza (Seasonal). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
21. **Nicholson K.** 2000. Human Influenza. A: Nicholson K, Webster R, Hay A (ed), Textbook of Influenza, p 219-266. Blackwell Science Ltd, Oxford.
22. **ICTV.** 2014. Virus Taxonomy: 2014 Release. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
23. **Mahony JB, Petrich A, Smieja M.** 2011. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit Rev Clin Lab Sci* **48**:217-249.
24. **Taubenberger JK, Kash JC.** 2010. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe* **7**:440-451.
25. **Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P.** 2006. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol* **80**:7976-7983.
26. **Wise HM, Hutchinson EC, Jagger BW, Stuart AD, Kang ZH, Robb N, Schwartzman LM, Kash JC, Fodor E, Firth AE, Gog JR, Taubenberger JK, Digard P.** 2012. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS Pathog* **8**:e1002998.
27. **Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD.** 2004. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol* **78**:12665-12667.
28. **Ruigrok R.** 2000. Structure of Influenza A, B and C Viruses. A: Nicholson K, Webster R, Hay A (ed), Textbook of Influenza, p 29-42. Blackwell Science Ltd, Oxford.
29. **Westgeest KB, Russell CA, Lin X, Spronken MI, Bestebroer TM, Bahl J, van Beek R, Skepner E, Halpin RA, de Jong JC, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Smith DJ, Wentworth DE, Fouchier RA, de Graaf M.** 2014. Genomewide analysis of reassortment and evolution of human influenza A(H3N2) viruses circulating between 1968 and 2011. *J Virol* **88**:2844-2857.
30. **Webster R, Bean WJ.** 2000. Evolution and Ecology of Influenza Viruses: Interspecies Transmission. A: Nicholson K, Webster R, Hay A (ed), Textbook of Influenza, p 109-119. Blackwell Science Ltd, Oxford.
31. **Krug R.** 2000. Unique Functions of NS1 Protein. A: Nicholson K, Webster R, Hay A (ed), Textbook of Influenza, p 82-92. Blackwell Science Ltd, Oxford.

32. **Hay A.** 2000. The Virus Genome and its Replication. A: Nicholson K, Webster R, Hay A (ed), Textbook of Influenza, p 43-53. Blackwell Science Ltd, Oxford.
33. **Manjarrez Z, Arenas L.** 1999. Virus influenza: Enigma del pasado y del presente. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias **12**:290-299.
34. **Schweiger B, Zadow I, Heckler R.** 2002. Antigenic drift and variability of influenza viruses. Med Microbiol Immunol **191**:133-138.
35. **van Riel D, Munster VJ, de Wit E, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD, Kuiken T.** 2007. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. Am J Pathol **171**:1215-1223.
36. **Fiore AE, Fry A, Shay D, Gubareva L, Bresee JS, Uyeki TM.** 2011. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza --- recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep **60**:1-24.
37. **Paul Glezen W, Schmier JK, Kuehn CM, Ryan KJ, Oxford J.** 2013. The burden of influenza B: a structured literature review. Am J Public Health **103**:e43-51.
38. **Burnham AJ, Baranovich T, Govorkova EA.** 2013. Neuraminidase inhibitors for influenza B virus infection: efficacy and resistance. Antiviral Res **100**:520-534.
39. **WHO.** 2014. Avian influenza. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/.
40. **García-García J, Ramos C.** 2006. La influenza, un problema vigente de salud pública. Salud Pública Mex **48**:244-267.
41. **WHO.** 2014. FAQs: H5N1 influenza. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/h5n1_research/faqs/en/.
42. **WHO.** 2013. Overview of the emergence and characteristics of the avian influenza A(H7N9) virus. p1-38.
43. **Navarro-Marí JM, Mayoral-Cortés JM, Pérez-Ruiz M, Rodríguez-Bano J, Carratalá J, Gallardo-García V.** 2010. Infección en humanos por virus de la gripe A(H1N1): revisión al 30 de octubre de 2009. Enferm Infecc Microbiol Clin **28**:446-452.
44. **Leland DS, Ginocchio CC.** 2007. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. Clin Microbiol Rev **20**:49-78.
45. **Mahony JB.** 2008. Detection of respiratory viruses by molecular methods. Clin Microbiol Rev **21**:716-747.
46. **Socan M, Prosenk K, Ucakar V, Berginc N.** 2014. A comparison of the demographic and clinical characteristics of laboratory-confirmed influenza B Yamagata and Victoria lineage infection. J Clin Virol **61**:156-160.

47. **Glezen WP.** 2014. Editorial commentary: Changing epidemiology of influenza B virus. *Clin Infect Dis* **59**:1525-1526.
48. **Cowling BJ, Ip DK, Fang VJ, Suntarattiwong P, Olsen SJ, Levy J, Uyeki TM, Leung GM, Peiris JS, Chotpitayasunondh T, Nishiura H, Simmerman JM.** 2014. Modes of transmission of influenza B virus in households. *PLoS One* **9**:e108850.
49. **Heikkinen T, Ikonen N, Ziegler T.** 2014. Impact of influenza B lineage-level mismatch between trivalent seasonal influenza vaccines and circulating viruses, 1999-2012. *Clin Infect Dis* **59**:1519-1524.
50. **Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K, Shiraki K, Smee DF, Barnard DL.** 2013. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res* **100**:446-454.
51. **Pabbaraju K, Wong S, Wong A, May-Hadford J, Tellier R, Fonseca K.** 2013. Detection of influenza C virus by a real-time RT-PCR assay. *Influenza Other Respir Viruses* **7**:954-960.
52. **Taylor RM.** 1949. Studies on survival of influenza virus between epidemics and antigenic variants of the virus. *Am J Public Health Nations Health* **39**:171-178.
53. **Francis T, Jr., Quilligan JJ, Jr., Minuse E.** 1950. Identification of another epidemic respiratory disease. *Science* **112**:495-497.
54. **Matsuzaki Y, Katsushima N, Nagai Y, Shoji M, Itagaki T, Sakamoto M, Kitaoka S, Mizuta K, Nishimura H.** 2006. Clinical features of influenza C virus infection in children. *J Infect Dis* **193**:1229-1235.
55. **Crescenzo-Chaigne B, van der Werf S.** 2007. Rescue of influenza C virus from recombinant DNA. *J Virol* **81**:11282-11289.
56. **Wright P, Neumann G, Kawaoka Y.** 2007. Orthomyxoviruses. A: Knipe D, Griffin D, Lamb R, Straus S, Howley P, Martin M, Roizman B (ed), *Fields VIROLOGY*, Fifth ed. ed, vol 2, p 1691-1740. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER BUSINESS, Philadelphia.
57. **Glezen WP, Denny FW.** 1997. Parainfluenza Viruses. A: Evans AS, Kaslow RA (ed), *Viral Infections of Humans Epidemiology and Control*, Fourth ed. ed, p 551-568. Plenum Medical Book Company, New York.
58. **Henrickson KJ.** 2003. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev* **16**:242-264.
59. **Karron R, Collins P.** 2007. Parainfluenza Viruses. A: Knipe D, Griffin D, Lamb R, Straus S, Howley P, Martin M, Roizman B (ed), *Fields VIROLOGY*, Fifth ed. ed, vol 1, p 1497-1526. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER BUSINESS, Philadelphia.
60. **Cordey S, Thomas Y, Cherpillod P, van Belle S, Tapparel C, Kaiser L.** 2009. Simultaneous detection of parainfluenza viruses 1 and 3 by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods* **156**:166-168.

61. **Terlizzi ME, Massimiliano B, Francesca S, Sinesi F, Rosangela V, Stefano G, Costa C, Rossana C.** 2009. Quantitative RT real time PCR and indirect immunofluorescence for the detection of human parainfluenza virus 1, 2, 3. *J Virol Methods* **160**:172-177.
62. **Hasman H, Pachucki CT, Unal A, Nguyen D, Devlin T, Peeples ME, Kwilas SA.** 2009. Aetiology of influenza-like illness in adults includes parainfluenzavirus type 4. *J Med Microbiol* **58**:408-413.
63. **McIntosh K.** 1997. Respiratory Syncytial Virus. A: Evans AS, Kaslow RA (ed), *Viral Infections of Humans Epidemiology and Control*, Fourth ed. ed, p 691-706. Plenum Medical Book Company, New York.
64. **Collins P, Crowe JJ.** 2007. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. A: Knipe D, Griffin D, Lamb R, Straus S, Howley P, Martin M, Roizman B (ed), *Fields VIROLOGY*, Fifth ed. ed, vol 2, p 1601-1646. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER BUSINESS, Philadelphia.
65. **Rudraraju R, Jones BG, Sealy R, Surman SL, Hurwitz JL.** 2013. Respiratory syncytial virus: current progress in vaccine development. *Viruses* **5**:577-594.
66. **Popow-Kraupp T, Aberle JH.** 2011. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *Open Microbiol J* **5**:128-134.
67. **Falsey AR, Walsh EE.** 2000. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev* **13**:371-384.
68. **Casiano-Colon AE, Hulbert BB, Mayer TK, Walsh EE, Falsey AR.** 2003. Lack of sensitivity of rapid antigen tests for the diagnosis of respiratory syncytial virus infection in adults. *J Clin Virol* **28**:169-174.
69. **Haas LE, Thijsen SF, van Elden L, Heemstra KA.** 2013. Human metapneumovirus in adults. *Viruses* **5**:87-110.
70. **Feuillet F, Lina B, Rosa-Calatrava M, Boivin G.** 2012. Ten years of human metapneumovirus research. *J Clin Virol* **53**:97-105.
71. **Cox RG, Williams JV.** 2013. Breaking in: human metapneumovirus fusion and entry. *Viruses* **5**:192-210.
72. **Gwaltney JMJ.** 1997. Rhinoviruses. A: Evans AS, Kaslow RA (ed), *Viral Infections of Humans Epidemiology and Control*, Fourth ed. ed, p 815-838. Plenum Medical Book Company, New York.
73. **Jacobs SE, Lamson DM, St George K, Walsh TJ.** 2013. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev* **26**:135-162.

74. **Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ, Kaiser L.** 2013. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Genet Evol* **14**:282-293.
75. **Briese T, Renwick N, Venter M, Jarman RG, Ghosh D, Kondgen S, Shrestha SK, Hoegh AM, Casas I, Adjogoua EV, Akoua-Koffi C, Myint KS, Williams DT, Chidlow G, van den Berg R, Calvo C, Koch O, Palacios G, Kapoor V, Villari J, Dominguez SR, Holmes KV, Harnett G, Smith D, Mackenzie JS, Ellerbrok H, Schweiger B, Schonning K, Chadha MS, Leendertz FH, Mishra AC, Gibbons RV, Holmes EC, Lipkin WI.** 2008. Global distribution of novel rhinovirus genotype. *Emerg Infect Dis* **14**:944-947.
76. **Lau SK, Yip CC, Woo PC, Yuen KY.** 2010. Human rhinovirus C: a newly discovered human rhinovirus species. *Emerg Health Threats J* **3**:e2.
77. **Jacques J, Moret H, Minette D, Leveque N, Jovenin N, Deslee G, Lebargy F, Motte J, Andreoletti L.** 2008. Epidemiological, molecular, and clinical features of enterovirus respiratory infections in French children between 1999 and 2005. *J Clin Microbiol* **46**:206-213.
78. **Pallansch M, Roos R.** 2007. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. A: Knipe D, Griffin D, Lamb R, Straus S, Howley P, Martin M, Roizman B (ed), *Fields VIROLOGY*, Fifth ed. ed, vol 1, p 839-894. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER BUSINESS, Philadelphia.
79. **Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR.** 2015. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J Pathol* **235**:217-228.
80. **Foy HM.** 1997. Adenoviruses. A: Evans AS, Kaslow RA (ed), *Viral Infections of Humans Epidemiology and Control*, Fourth ed. ed, p 119-138. Plenum Medical Book Company, New York.
81. **Feghoul L, Le Goff J.** 2012. Les infections à adénovirus. *Revue Francophone des Laboratoires* **2012**:63-71.
82. **Schildgen O, Muller A, Allander T, Mackay IM, Volz S, Kupfer B, Simon A.** 2008. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev* **21**:291-304.
83. **Moreno CM, Solís YO, O’Ryan MG.** 2009. Bocavirus humano: Estudios en la literatura médica y en Chile. *Rev Chilena Infectol* **26**:504-510.
84. **Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B.** 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:12891-12896.
85. **Debiaggi M, Canducci F, Ceresola ER, Clementi M.** 2012. The role of infections and coinfections with newly identified and emerging respiratory viruses in children. *Virol J* **9**:247.

86. **van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B.** 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* **10**:368-373.
87. **Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY.** 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* **79**:884-895.
88. **Assiri A, Al-Tawfiq JA, Al-Rabeeah AA, Al-Rabiah FA, Al-Hajjar S, Al-Barrak A, Flemban H, Al-Nassir WN, Balkhy HH, Al-Hakeem RF, Makhdoom HQ, Zumla AI, Memish ZA.** 2013. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* **13**:752-761.
89. **Marcos Maeso M, de Benito Hernández M.** 2005. Infecciones por rinovirus y coronavirus. Síndrome Respiratorio Agudo Grave. A: Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S, Alvar Ezquerra J, Bouza Santiago E, Gascón Brustenga J, Gavalda Santapau J, Gudiol Munté F, Martín Álvarez R, Pachón Díaz J, Pahissa Berga A, Pérez Trallero E, Prats Pastor G, Pumarola Suñé T, Rodríguez Tudela J, de la Torre Cisneros J, Trilla García A (ed), *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, vol 1, p 874-885. Editorial Médica Panamericana, Madrid.
90. **WHO.** 2003. Preliminary Clinical Description of Severe Acute Respiratory Syndrome. <http://www.who.int/csr/sars/clinical/en/>.
91. **Raj VS, Osterhaus AD, Fouchier RA, Haagmans BL.** 2014. MERS: emergence of a novel human coronavirus. *Curr Opin Virol* **5**:58-62.
92. **WHO.** 2013. State of Knowledge and Data Gaps of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) in Humans. *PLoS Curr* **5**.
93. **Roizman B, Knipe D, Whitley R.** 2007. Herpes Simplex Viruses. A: Knipe D, Griffin D, Lamb R, Straus S, Howley P, Martin M, Roizman B (ed), *Fields VIROLOGY*, Fifth ed. ed, vol 2, p 2501-2602. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER BUSINESS, Philadelphia.
94. **Tjotta E, Hoddevik G.** 2002. Herpes Simplex Virus (HSV1 and HSV2). A: Haaheim L, Pattison J, Whitley R (ed), *A Practical Guide to Clinical Virology*, Second ed. ed, p 127-136. WILEY, London.
95. **Cohen J, Straus S, Arvin A.** 2007. Varicella-Zoster Virus. A: Knipe D, Griffin D, Lamb R, Straus S, Howley P, Martin M, Roizman B (ed), *Fields VIROLOGY*, Fifth ed. ed, vol 2, p 2773-2818. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER BUSINESS, Philadelphia.
96. **Winsnes A, Winsnes R.** 2002. Varicella-Zoster Virus (VZV)-Varicella. A: Haaheim L, Pattison J, Whitley R (ed), *A Practical Guide to Clinical Virology*, Second ed. ed, p 137-144. WILEY, London.

97. **Rickinson A, Kieff E.** 2007. Epstein-Barr Virus. A: Knipe D, Griffin D, Lamb R, Straus S, Howley P, Martin M, Roizman B (ed), Fields VIROLOGY, Fifth ed. ed, vol 2, p 2655-2700. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER BUSINESS, Philadelphia.
98. **Tjotta E.** 2002. Epstein-Barr Virus (EBV). A: Haaheim L, Pattison J, Whitley R (ed), A Practical Guide to Clinical Virology, Second ed. ed, p 157-166. WILEY, London.
99. **Mocarski E, Shenk T, Pass R.** 2007. Cytomegaloviruses. A: Knipe D, Griffin D, Lamb R, Straus S, Howley P, Martin M, Roizman B (ed), Fields VIROLOGY, Fifth ed. ed, vol 2, p 2701-2772. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER BUSINESS, Philadelphia.
100. **Dalen A.** 2002. Cytomegalovirus (CMV). A: Haaheim L, Pattison J, Whitley R (ed), A Practical Guide to Clinical Virology, Second ed. ed, p 149-156. WILEY, London.
101. **Schmaljohn C, Nichol S.** 2007. Bunyaviridae. A: Knipe D, Griffin D, Lamb R, Straus S, Howley P, Martin M, Roizman B (ed), Fields VIROLOGY, Fifth ed. ed, vol 2, p 1741-1790. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER BUSINESS, Philadelphia.
102. **Haukenes G.** 2002. Hantaviruses-HFRS and HPS. A: Haaheim L, Pattison J, Whitley R (ed), A Practical Guide to Clinical Virology, Second ed. ed, p 235-240. WILEY, London.
103. **Griffin D.** 2007. Measles Virus. A: Knipe D, Griffin D, Lamb R, Straus S, Howley P, Martin M, Roizman B (ed), Fields VIROLOGY, Fifth ed. ed, vol 2, p 1551-1586. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER BUSINESS, Philadelphia.
104. **Halsey N.** 2002. Measles Virus. A: Haaheim L, Pattison J, Whitley R (ed), A Practical Guide to Clinical Virology, Second ed. ed, p 97-104. WILEY, London.
105. **Carbone K, Rubin S.** 2007. Mumps Virus. A: Knipe D, Griffin D, Lamb R, Straus S, Howley P, Martin M, Roizman B (ed), Fields VIROLOGY, Fifth ed. ed, vol 1, p 1527-1550. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER BUSINESS, Philadelphia.
106. **Bjorvatn B, Haukenes G.** 2002. Mumps Virus. A: Haaheim L, Pattison J, Whitley R (ed), A Practical Guide to Clinical Virology, Second ed. ed, p 81-88. WILEY, London.
107. **Abed Y, Boivin G.** 2006. Human parechovirus types 1, 2 and 3 infections in Canada. Emerg Infect Dis **12**:969-975.
108. **Dare RK, Chittaganpitch M, Erdman DD.** 2008. Screening pneumonia patients for mimivirus. Emerg Infect Dis **14**:465-467.
109. **Riggs J.** 1979. Immunofluorescent Staining. A: Lennette E, Schimdt N (ed), Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections, Fifth ed. ed, p 141-152. American Public Health Association, Washington, DC.
110. **Ray CG, Minnich LL.** 1987. Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses. J Clin Microbiol **25**:355-357.

111. **Matas Andreu L, Alonso-Tarrés C, Echevarría Mayo J.** 2005. Diagnóstico de las enfermedades infecciosas. A: Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S, Alvar Ezquerro J, Bouza Santiago E, Gascón Brustenga J, Gavaldà Santapau J, Gudiol Munté F, Martín Álvarez R, Pachón Díaz J, Pahissa Berga A, Pérez Trallero E, Prats Pastor G, Pumarola Suñé T, Rodríguez Tudela J, de la Torre Cisneros J, Trilla García A (ed), Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica, vol 1, p 53-70. Editorial Médica Panamericana, Madrid.
112. **Aldous WK, Gerber K, Taggart EW, Thomas J, Tidwell D, Daly JA.** 2004. A comparison of Binax NOW to viral culture and direct fluorescent assay testing for respiratory syncytial virus. *Diagn Microbiol Infect Dis* **49**:265-268.
113. **Cazacu AC, Demmler GJ, Neuman MA, Forbes BA, Chung S, Greer J, Alvarez AE, Williams R, Bartholoma NY.** 2004. Comparison of a new lateral-flow chromatographic membrane immunoassay to viral culture for rapid detection and differentiation of influenza A and B viruses in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* **42**:3661-3664.
114. **Landry ML, Cohen S, Ferguson D.** 2004. Comparison of Binax NOW and Directigen for rapid detection of influenza A and B. *J Clin Virol* **31**:113-115.
115. **Selvarangan R, Abel D, Hamilton M.** 2008. Comparison of BD Directigen EZ RSV and Binax NOW RSV tests for rapid detection of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates in a pediatric population. *Diagn Microbiol Infect Dis* **62**:157-161.
116. **Pérez-Ruiz M, Fernández-Roldán C, Navarro-Martí JM, de la Rosa-Fraile M.** 2003. Evaluación preliminar de nuevos métodos de detección de antígeno para el diagnóstico rápido de virus respiratorio sincitial. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **21**:602-603.
117. **Weinberg A, Walker ML.** 2005. Evaluation of three immunoassay kits for rapid detection of influenza virus A and B. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**:367-370.
118. **Manuguerra J, Hannoun C.** 1999. Méthodes de diagnostic de la grippe. A: Manuguerra J, Hannoun C (ed), Grippe et Autres Virus Respiratoires Surveillance et Diagnostic de Laboratoire, p 186-189. Institut Pasteur, Paris.
119. **Pumarola A, Rodríguez-Torres A, Vidal J, Orta J.** 1969. Estudi etiològic del brot epidèmic gripal observat a Barcelona durant el mes de febrer de 1968. *Microbiol Esp* **22**:233-249.
120. **Weinberg GA, Erdman DD, Edwards KM, Hall CB, Walker FJ, Griffin MR, Schwartz B.** 2004. Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. *J Infect Dis* **189**:706-710.
121. **Hill C.** 2011. Nucleic Acid Isolation: Overview of Sample Preparation Methods. A: Persing D, Tenover F, Tang Y, Nolte F, Hayden R, van Belkum A (ed), *Molecular Microbiology Diagnostic Principles and Practice*, Second ed. ed, vol 1, p 119-125. ASM Press, Washington DC.

122. **Nolte F, Caliendo A.** 2007. Molecular Detection and Identification of Microorganisms. A: Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M (ed), Manual of Clinical Microbiology, Ninth ed. ed, vol 1, p 218-244. ASM Press, Washington DC.
123. **Reijans M, Dingemans G, Klaassen CH, Meis JF, Keijden J, Mulders B, Eadie K, van Leeuwen W, van Belkum A, Horrevorts AM, Simons G.** 2008. RespiFinder: a new multiparameter test to differentially identify fifteen respiratory viruses. *J Clin Microbiol* **46**:1232-1240.
124. **Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Swanink CM, van Zwet AA, Nijhuis RH, Schirm J, Wallinga JA, Ruijs GJ.** 2010. Comparison of two commercial molecular assays for simultaneous detection of respiratory viruses in clinical samples using two automatic electrophoresis detection systems. *J Virol Methods* **169**:188-192.
125. **Pillet S, Lardeux M, Dina J, Grattard F, Verhoeven P, Le Goff J, Vabret A, Pozzetto B.** 2013. Comparative evaluation of six commercialized multiplex PCR kits for the diagnosis of respiratory infections. *PLoS One* **8**:e72174.
126. **Roh KH, Kim J, Nam MH, Yoon S, Lee CK, Lee K, Yoo Y, Kim MJ, Cho Y.** 2008. Comparison of the Seplex reverse transcription PCR assay with the R-mix viral culture and immunofluorescence techniques for detection of eight respiratory viruses. *Ann Clin Lab Sci* **38**:41-46.
127. **Zhang G, Hu Y, Wang H, Zhang L, Bao Y, Zhou X.** 2012. High incidence of multiple viral infections identified in upper respiratory tract infected children under three years of age in Shanghai, China. *PLoS One* **7**:e44568.
128. **Cho CH, Chulten B, Lee CK, Nam MH, Yoon SY, Lim CS, Cho Y, Kim YK.** 2013. Evaluation of a novel real-time RT-PCR using TOCE technology compared with culture and Seplex RV15 for simultaneous detection of respiratory viruses. *J Clin Virol* **57**:338-342.
129. **Kim HK, Oh SH, Yun KA, Sung H, Kim MN.** 2013. Comparison of Anyplex II RV16 with the xTAG respiratory viral panel and Seplex RV15 for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* **51**:1137-1141.
130. **Henrickson KJ, Kraft AJ, Canter D, Shaw J.** 2007. Comparison of electronic microarray to enzyme hybridization assay for multiplex reverse-transcriptase PCR detection of common respiratory viruses in children. *Clinical Microbiology Newsletter* **29**:113-119.
131. **Raymond F, Carbonneau J, Boucher N, Robitaille L, Boisvert S, Wu WK, De Serres G, Boivin G, Corbeil J.** 2009. Comparison of automated microarray detection with real-time PCR assays for detection of respiratory viruses in specimens obtained from children. *J Clin Microbiol* **47**:743-750.
132. **Cannon GA, Carr MJ, Yandle Z, Schaffer K, Kidney R, Hosny G, Doyle A, Ryan J, Gunson R, Collins T, Carman WF, Connell J, Hall WW.** 2010. A low density oligonucleotide microarray

- for the detection of viral and atypical bacterial respiratory pathogens. *J Virol Methods* **163**:17-24.
133. **Renois F, Talmud D, Huguenin A, Moutte L, Strady C, Cousson J, Leveque N, Andreoletti L.** 2010. Rapid detection of respiratory tract viral infections and coinfections in patients with influenza-like illnesses by use of reverse transcription-PCR DNA microarray systems. *J Clin Microbiol* **48**:3836-3842.
134. **Frobert E, Escuret V, Javouhey E, Casalegno JS, Bouscambert-Duchamp M, Moulinier C, Gillet Y, Lina B, Floret D, Morfin F.** 2011. Respiratory viruses in children admitted to hospital intensive care units: evaluating the CLART(R) Pneumovir DNA array. *J Med Virol* **83**:150-155.
135. **Culebras E, Betriu C, Vázquez-Cid E, López-Varela E, Rueda S, Picazo JJ.** 2013. Detection and genotyping of human respiratory viruses in clinical specimens from children with acute respiratory tract infections. *Rev Esp Quimioter* **26**:47-50.
136. **Mahony J, Chong S, Merante F, Yaghoubian S, Sinha T, Lisle C, Janeczko R.** 2007. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *J Clin Microbiol* **45**:2965-2970.
137. **Kesson AM.** 2007. Respiratory virus infections. *Paediatr Respir Rev* **8**:240-248.
138. **WHO.** 2010. WHO recommendations for the post-pandemic period. http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/briefing_20100810/en/.
139. **Suwannakarn K, Payungporn S, Chieochansin T, Samransamruajkit R, Amonsin A, Songserm T, Chaisingh A, Chamnanpood P, Chutinimitkul S, Theamboonlers A, Poovorawan Y.** 2008. Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A viruses by multiplex real-time RT-PCR assays. *J Virol Methods* **152**:25-31.
140. **CDC.** 2009. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A(H1N1). http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf?ua=1.
141. **Artiles-Campelo F, Pérez-González Mdel C, Caballero-Hidalgo A, Pena-López MJ.** 2006. Diagnóstico etiológico de las infecciones respiratorias agudas de origen vírico en un hospital pediátrico de Gran Canaria. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **24**:556-561.
142. **Freytmuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, Gouarin S, Petitjean J, Eckart P, Brouard J.** 2006. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol* **78**:1498-1504.
143. **Jartti T, Soderlund-Venermo M, Hedman K, Ruuskanen O, Makela MJ.** 2013. New molecular virus detection methods and their clinical value in lower respiratory tract infections in children. *Paediatr Respir Rev* **14**:38-45.

144. **Lina B, Valette M, Foray S, Luciani J, Stagnara J, See DM, Aymard M.** 1996. Surveillance of community-acquired viral infections due to respiratory viruses in Rhone-Alpes (France) during winter 1994 to 1995. *J Clin Microbiol* **34**:3007-3011.
145. **Lin TY, Huang YC, Ning HC, Tsao KC.** 2004. Surveillance of respiratory viral infections among pediatric outpatients in northern Taiwan. *J Clin Virol* **30**:81-85.
146. **Viegas M, Barrero PR, Maffey AF, Mistchenko AS.** 2004. Respiratory viruses seasonality in children under five years of age in Buenos Aires, Argentina: a five-year analysis. *J Infect* **49**:222-228.
147. **Fox JD.** 2007. Respiratory virus surveillance and outbreak investigation. *J Clin Virol* **40 Suppl 1**:S24-30.
148. **Vidaurreta SM, Marccone DN, Ellis A, Ekstrom J, Cukier D, Videla C, Carballal G, Echavarría M.** 2011. Infección respiratoria aguda viral en niños menores de 5 años. Estudio epidemiológico en dos centros de Buenos Aires, Argentina. *Arch Argent Pediatr* **109**:296-304.
149. **Ahmed JA, Katz MA, Auko E, Njenga MK, Weinberg M, Kapella BK, Burke H, Nyoka R, Gichangi A, Waiboci LW, Mahamud A, Qassim M, Swai B, Wagacha B, Mutonga D, Nguhi M, Breiman RF, Eidex RB.** 2012. Epidemiology of respiratory viral infections in two long-term refugee camps in Kenya, 2007-2010. *BMC Infect Dis* **12**:7.
150. **Martin ET, Fairchok MP, Stednick ZJ, Kuypers J, Englund JA.** 2013. Epidemiology of multiple respiratory viruses in childcare attendees. *J Infect Dis* **207**:982-989.
151. **Sentilhes AC, Choumlivong K, Celhay O, Sisouk T, Phonekeo D, Vongphrachanh P, Brey P, Buchy P.** 2013. Respiratory virus infections in hospitalized children and adults in Lao PDR. *Influenza Other Respir Viruses* **7**:1070-1078.
152. **He Y, Lin GY, Wang Q, Cai XY, Zhang YH, Lin CX, Lu CD, Lu XD.** 2014. A 3-year prospective study of the epidemiology of acute respiratory viral infections in hospitalized children in Shenzhen, China. *Influenza Other Respir Viruses* **8**:443-451.
153. **Riquelme R, Rioseco ML, Agüero Y, Ubilla D, Mechsner P, Inzunza C, Riquelme M.** 2014. Infección por virus respiratorios en adultos hospitalizados en un Servicio de Medicina Interna. *Rev Med Chil* **142**:696-701.
154. **Östlund MR, Wirgart BZ, Linde A, Grillner L.** 2004. Respiratory virus infections in Stockholm during seven seasons: a retrospective study of laboratory diagnosis. *Scand J Infect Dis* **36**:460-465.
155. **Weigl JA, Puppe W, Meyer CU, Berner R, Forster J, Schmitt HJ, Zepp F.** 2007. Ten years' experience with year-round active surveillance of up to 19 respiratory pathogens in children. *Eur J Pediatr* **166**:957-966.

156. **Freitas FT.** 2013. Sentinel surveillance of influenza and other respiratory viruses, Brazil, 2000-2010. *Braz J Infect Dis* **17**:62-68.
157. **Khor CS, Sam IC, Hooi PS, Quek KF, Chan YF.** 2012. Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 years. *BMC Pediatr* **12**:32.
158. **Pilar Orive FJ, Casado Flores J, García Teresa MA, Rodríguez Nuñez A, Quiroga Ordóñez E, Cambra Lasaosa F, Melendo Jimeno J, Ruiz Extremera A, Soult Rubio JA, Calvo Macías C, Teja Barbero JL.** 1998. Infecciones respiratorias agudas en unidades de cuidados intensivos pediátricos. Estudio prospectivo multicéntrico. *An Esp Pediatr* **48**:138-142.
159. **Giménez Sánchez F, Sánchez Marengo A, Battles Garrido JM, López Soler JA, Sánchez-Solís Querol M.** 2007. Características clínico-epidemiológicas de la neumonía adquirida en la comunidad en niños menores de 6 años. *An Pediatr (Barc)* **66**:578-584.
160. **Bueno Campaña M, Calvo Rey C, Vázquez Álvarez MC, Parra Cuadrado E, Molina Amores C, Rodrigo García G, Echávarri Olavarria F, Valverde Cánovas J, Casas Flecha I.** 2008. Infecciones virales de vías respiratorias en los primeros seis meses de vida. *An Pediatr (Barc)* **69**:400-405.
161. **Calvo Rey C, García García ML, Casas Flecha I, Martín del Valle F, Centeno Jimenez M, Pérez-Brena P.** 2005. Infecciones por virus de la gripe en menores de dos años. *An Pediatr (Barc)* **63**:22-28.
162. **Oñoro G, Pérez Suárez E, Iglesias Bouzas MI, Serrano A, Martínez De Azagra A, García-Teresa MA, Casado Flores J.** 2011. Bronquiolitis grave. Cambios epidemiológicos y de soporte respiratorio. *An Pediatr (Barc)* **74**:371-376.
163. **Domínguez-Pinilla N, Belda Hofheinz S, Vivanco Martínez JL, Baro-Fernández M, Ruiz-Contreras J, González-Granado LI.** 2015. Infección por virus respiratorio sincitial en los pacientes inmunodeprimidos en un hospital pediátrico: experiencia de 5 años. *An Pediatr (Barc)* **82**:35-40.
164. **González-Carrasco E, Calvo C, García-García ML, Beato M, Muñóz-Archidona C, Pozo F, Casas I.** 2015. Infecciones virales de las vías respiratorias en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales. *An Pediatr (Barc)* **82**:242-246.
165. **Tsai HP, Kuo PH, Liu CC, Wang JR.** 2001. Respiratory viral infections among pediatric inpatients and outpatients in Taiwan from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* **39**:111-118.
166. **Schlaudecker EP, Heck JP, Macintyre ET, Martinez R, Dodd CN, McNeal MM, Staat MA, Heck JE, Steinhoff MC.** 2012. Etiology and seasonality of viral respiratory infections in rural Honduran children. *Pediatr Infect Dis J* **31**:1113-1118.

167. **Tanner H, Boxall E, Osman H.** 2012. Respiratory viral infections during the 2009-2010 winter season in Central England, UK: incidence and patterns of multiple virus co-infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**:3001-3006.
168. **Ambrosioni J, Bridevaux PO, Wagner G, Mamin A, Kaiser L.** 2014. Epidemiology of viral respiratory infections in a tertiary care centre in the era of molecular diagnosis, Geneva, Switzerland, 2011-2012. *Clin Microbiol Infect* **20**:O578-584.
169. **Lu Y, Wang S, Zhang L, Xu C, Bian C, Wang Z, Ma Y, Wang K, Ma L, Meng C, Ni C, Tong J, Li G, Han J.** 2013. Epidemiology of human respiratory viruses in children with acute respiratory tract infections in Jinan, China. *Clin Dev Immunol* **2013**:210490.
170. **Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R, Tenorio A, Casas I, Pozo F, Ruiz G, Pérez-Breña P.** 2009. Diagnóstico microbiológico de las infecciones virales respiratorias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **27**:168-177.
171. **Monto AS.** 2004. Occurrence of respiratory virus: time, place and person. *Pediatr Infect Dis J* **23**:S58-64.
172. **Fry AM, Curns AT, Harbour K, Hutwagner L, Holman RC, Anderson LJ.** 2006. Seasonal trends of human parainfluenza viral infections: United States, 1990-2004. *Clin Infect Dis* **43**:1016-1022.
173. **Silva DR, Viana VP, Muller AM, Livi FP, Dalcin Pde T.** 2014. Respiratory viral infections and effects of meteorological parameters and air pollution in adults with respiratory symptoms admitted to the emergency room. *Influenza Other Respir Viruses* **8**:42-52.
174. **Chen Z, Zhu Y, Wang Y, Zhou W, Yan Y, Zhu C, Zhang X, Sun H, Ji W.** 2014. Association of meteorological factors with childhood viral acute respiratory infections in subtropical China: an analysis over 11 years. *Arch Virol* **159**:631-639.
175. **du Prel JB, Puppe W, Grondahl B, Knuf M, Weigl JA, Schaaff F, Schmitt HJ.** 2009. Are meteorological parameters associated with acute respiratory tract infections? *Clin Infect Dis* **49**:861-868.
176. **Gardinassi LG, Marques Simas PV, Salomao JB, Durigon EL, Zanetta Trevisan DM, Cordeiro JA, Lacerda MN, Rahal P, de Souza FP.** 2012. Seasonality of viral respiratory infections in southeast of Brazil: the influence of temperature and air humidity. *Braz J Microbiol* **43**:98-108.
177. **Li H, Wei Q, Tan A, Wang L.** 2013. Epidemiological analysis of respiratory viral etiology for influenza-like illness during 2010 in Zhuhai, China. *Virology* **10**:143.
178. **Seo YB, Song JY, Choi MJ, Kim IS, Yang TU, Hong KW, Cheong HJ, Kim WJ.** 2014. Etiology and clinical outcomes of acute respiratory virus infection in hospitalized adults. *Infect Chemother* **46**:67-76.

179. **Lee JT, Chang LY, Wang LC, Kao CL, Shao PL, Lu CY, Lee PI, Chen JM, Lee CY, Huang LM.** 2007. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in northern Taiwan, 2001-2005 -- seasonality, clinical characteristics, and disease burden. *J Microbiol Immunol Infect* **40**:293-301.
180. **Chan PK, Sung RY, Fung KS, Hui M, Chik KW, Adeyemi-Doro FA, Cheng AF.** 1999. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection among paediatric patients in Hong Kong: seasonality and disease impact. *Epidemiol Infect* **123**:257-262.
181. **Blanco del Val A, Eiros Bouza JM, Mayo Iscar A, Bachillar Luque MR, Blanco del Val B, Sanchez Porto A, Ortiz de Lejarzu R.** 2012. Respiratory syncytial virus infection: a decade of contributions. *Infez Med* **20**:169-175.
182. **Haynes AK, Manangan AP, Iwane MK, Sturm-Ramirez K, Homaira N, Brooks WA, Luby S, Rahman M, Klena JD, Zhang Y, Yu H, Zhan F, Dueger E, Mansour AM, Azazy N, McCracken JP, Bryan JP, Lopez MR, Burton DC, Bigogo G, Breiman RF, Feikin DR, Njenga K, Montgomery J, Cohen AL, Moyes J, Pretorius M, Cohen C, Venter M, Chittaganpitch M, Thamthitawat S, Sawatwong P, Baggett HC, Luber G, Gerber SI.** 2013. Respiratory syncytial virus circulation in seven countries with Global Disease Detection Regional Centers. *J Infect Dis* **208 Suppl 3**:S246-254.
183. **Bigogo GM, Breiman RF, Feikin DR, Audi AO, Aura B, Cosmas L, Njenga MK, Fields BS, Omballa V, Njuguna H, Ochieng PM, Mogeni DO, Aol GO, Olack B, Katz MA, Montgomery JM, Burton DC.** 2013. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in rural and urban Kenya. *J Infect Dis* **208 Suppl 3**:S207-216.
184. **Muenchhoff M, Goulder PJ.** 2014. Sex differences in pediatric infectious diseases. *J Infect Dis* **209 Suppl 3**:S120-126.
185. **McCracken JP, Prill MM, Arvelo W, Lindblade KA, Lopez MR, Estevez A, Muller ML, Munoz F, Bernart C, Cortez M, Moir JC, Ortiz J, Paredes A, Iwane MK.** 2013. Respiratory syncytial virus infection in Guatemala, 2007-2012. *J Infect Dis* **208 Suppl 3**:S197-206.
186. **Liolios L, Jenney A, Spelman D, Kotsimbos T, Catton M, Wesselingh S.** 2001. Comparison of a multiplex reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay with conventional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens. *J Clin Microbiol* **39**:2779-2783.
187. **Brittain-Long R, Westin J, Olofsson S, Lindh M, Andersson LM.** 2010. Prospective evaluation of a novel multiplex real-time PCR assay for detection of fifteen respiratory pathogens-duration of symptoms significantly affects detection rate. *J Clin Virol* **47**:263-267.
188. **Walker E, Ison MG.** 2014. Respiratory viral infections among hospitalized adults: experience of a single tertiary healthcare hospital. *Influenza Other Respir Viruses* **8**:282-292.

189. **Voeten JT, Bestebroer TM, Nieuwkoop NJ, Fouchier RA, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF.** 2000. Antigenic drift in the influenza A virus (H3N2) nucleoprotein and escape from recognition by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* **74**:6800-6807.
190. **Paget J, Marquet R, Meijer A, van der Velden K.** 2007. Influenza activity in Europe during eight seasons (1999-2007): an evaluation of the indicators used to measure activity and an assessment of the timing, length and course of peak activity (spread) across Europe. *BMC Infect Dis* **7**:141.
191. **Campa A, Quattrocchi M, Guido M, Gabutti G, Germinario C, De Donno A, Group TI.** 2010. Ten-year (1999-2009) epidemiological and virological surveillance of influenza in South Italy (Apulia). *Influenza Res Treat* **2010**:642492.
192. **Sagrera X, Ginovart G, Raspall F, Rabella N, Sala P, Sierra M, Demestre X, Vila C.** 2002. Outbreaks of influenza A virus infection in neonatal intensive care units. *Pediatr Infect Dis J* **21**:196-200.
193. **Piralla A, Percivalle E, Di Cesare-Merlone A, Locatelli F, Gerna G.** 2009. Multicenter nosocomial outbreak of parainfluenza virus type 3 infection in a pediatric oncology unit: a phylogenetic study. *Haematologica* **94**:833-839.
194. **Martinez JA, Pumarola T.** 2013. Viriasis nosocomiales. Virus de la hepatitis, herpesvirus y virus de la gripe. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **31**:471-479.
195. **ECDC.** 2015. Influenza activity maps for EU/EEA. http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/seasonal_influenza/epidemiological_data/Pages/influenza_activity_EU_EEA_activity_maps.aspx.
196. **SVGE.** 2015. Actividad de la Gripe en España. <http://vgripe.isciii.es/gripe/inicio.do>.
197. **Foy HM, Cooney MK, Allan I, Kenny GE.** 1979. Rates of pneumonia during influenza epidemics in Seattle, 1964 to 1975. *JAMA* **241**:253-258.
198. **Wang Y, Chen Z, Yan YD, Guo H, Chu C, Liu J, Ding Y, Shao X, Xu J, Ji W.** 2013. Seasonal distribution and epidemiological characteristics of human metapneumovirus infections in pediatric inpatients in Southeast China. *Arch Virol* **158**:417-424.
199. **Shatizadeh S, Yavarian J, Rezaie F, Mahmoodi M, Naseri M, Mokhtari Azad T.** 2014. Epidemiological and clinical evaluation of children with respiratory virus infections. *Med J Islam Repub Iran* **28**:102.
200. **Messacar K, Robinson CC, Bagdure D, Curtis DJ, Glode MP, Dominguez SR.** 2013. Rhino/enteroviruses in hospitalized children: a comparison to influenza viruses. *J Clin Virol* **56**:41-45.

201. **Jacques J, Bouscambert-Duchamp M, Moret H, Carquin J, Brodard V, Lina B, Motte J, Andreoletti L.** 2006. Association of respiratory picornaviruses with acute bronchiolitis in French infants. *J Clin Virol* **35**:463-466.
202. **Cantais A, Mory O, Pillet S, Verhoeven PO, Bonneau J, Patural H, Pozzetto B.** 2014. Epidemiology and microbiological investigations of community-acquired pneumonia in children admitted at the emergency department of a university hospital. *J Clin Virol* **60**:402-407.
203. **Brand HK, de Groot R, Galama JM, Brouwer ML, Teuwen K, Hermans PW, Melchers WJ, Warris A.** 2012. Infection with multiple viruses is not associated with increased disease severity in children with bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* **47**:393-400.
204. **Monto AS.** 2002. Epidemiology of viral respiratory infections. *Am J Med* **112 Suppl 6A**:4S-12S.
205. **Navarro-Marí JM, Pérez-Ruiz M, Galan Montemayor JC, Marcos Maeso MA, Reina J, de Ona Navarro M, Cilla Eguiluz CG.** 2012. Circulation of other respiratory viruses and viral co-infection during the 2009 pandemic influenza. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **30 Suppl 4**:25-31.
206. **Schnepf N, Resche-Rigon M, Chaillon A, Scemla A, Gras G, Semoun O, Taboulet P, Molina JM, Simon F, Goudeau A, LeGoff J.** 2011. High burden of non-influenza viruses in influenza-like illness in the early weeks of H1N1v epidemic in France. *PLoS One* **6**:e23514.
207. **Mak GC, Wong AH, Ho WY, Lim W.** 2012. The impact of pandemic influenza A (H1N1) 2009 on the circulation of respiratory viruses 2009-2011. *Influenza Other Respir Viruses* **6**:e6-10.
208. **Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE.** 2000. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* **13**:559-570.
209. **Ginocchio CC, McAdam AJ.** 2011. Current Best Practices for Respiratory Virus Testing. *J Clin Microbiol* **49**:S44-S48.
210. **Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Perez-Brena P.** 2004. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* **72**:484-495.
211. **Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, Pozzetto B, Ginevra C, Freymuth F.** 2005. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods* **126**:53-63.
212. **Jansen RR, Wieringa J, Koekkoek SM, Visser CE, Pajkrt D, Molenkamp R, de Jong MD, Schinkel J.** 2011. Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: toward defining clinically relevant cutoff values. *J Clin Microbiol* **49**:2631-2636.
213. **Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, Carroll KC.** 2004. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J Clin Microbiol* **42**:79-82.

214. **Doan Q, Enarson P, Kisson N, Klassen TP, Johnson DW.** 2012. Rapid viral diagnosis for acute febrile respiratory illness in children in the Emergency Department. *Cochrane Database Syst Rev* **5**:CD006452.
215. **Li H, McCormac MA, Estes RW, Sefers SE, Dare RK, Chappell JD, Erdman DD, Wright PF, Tang YW.** 2007. Simultaneous detection and high-throughput identification of a panel of RNA viruses causing respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* **45**:2105-2109.
216. **Ogilvie M.** 2001. Molecular techniques should not now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Rev Med Virol* **11**:351-354.
217. **Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, Huang ML, Cent A, Corey L, Morrow R.** 2006. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *J Clin Microbiol* **44**:2382-2388.
218. **Madhi SA, Klugman KP.** 2006. Acute Respiratory Infections.
219. **Kim SR, Ki CS, Lee NY.** 2009. Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *J Virol Methods* **156**:111-116.
220. **Garbino J, Soccia PM, Aubert JD, Rochat T, Meylan P, Thomas Y, Tapparel C, Bridevaux PO, Kaiser L.** 2009. Respiratory viruses in bronchoalveolar lavage: a hospital-based cohort study in adults. *Thorax* **64**:399-404.
221. **Schnell D, Legoff J, Mariotte E, Seguin A, Canet E, Lemiale V, Darmon M, Schlemmer B, Simon F, Azoulay E.** 2012. Molecular detection of respiratory viruses in immunocompromised ICU patients: incidence and meaning. *Respir Med* **106**:1184-1191.
222. **Buller RS.** 2013. Molecular detection of respiratory viruses. *Clin Lab Med* **33**:439-460.
223. **Meriluoto M, Hedman L, Tanner L, Simell V, Makinen M, Simell S, Mykkanen J, Korpelainen J, Ruuskanen O, Ilonen J, Knip M, Simell O, Hedman K, Soderlund-Venermo M.** 2012. Association of human bocavirus 1 infection with respiratory disease in childhood follow-up study, Finland. *Emerg Infect Dis* **18**:264-271.
224. **Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM, Jr., Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG.** 2007. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* **44 Suppl 2**:S27-72.

ANNEXOS

Annex I

- Barreja d'antibiòtics.
- Medis de cultiu.

Annex II

- Procediment coloració de Harris-Shorr modificada.
- Procediment operatiu del sistema *NucliSENS easyMAG*.

Annex III

- Publicació: *"Benefits and Drawbacks of Molecular Techniques for Diagnosis of Viral Respiratory Infections. Experience With Two Multiplex PCR Assays"*. J. Med. Virol. DOI 10.1002/jmv. (factor impacte: 2.347).

ANNEX I

Barreja d'antibiòtics:

- Penicil·lina (50.000 U/ml)
- Estreptomina (50 mg/ml)
- Gentamicina (2,5 mg/ml)
- Amfotericina (Fungizona®) (0,05 mg/ml)

Medis de cultiu:

Els medis utilitzats són de dos tipus:

1. medis de creixement utilitzats per afavorir la multiplicació cel·lular
2. medis de manteniment que substitueixen a l'anterior un cop formada la monocapa

Els medis es preparen en una campana de flux laminar per evitar-ne la contaminació i es conserven un màxim de 7 dies a la nevera. En cada medi s'ha d'ajustar el pH entre 7'2 i 7'4 (l'ideal és 7'3) utilitzant hidròxid sòdic (1N) (1'6 ml).

Medi creixement. Es realitzava amb un volum final de 1 litre.

- Medi Mínim Essencial (MEM) d'Eagle (10x): 100 ml
- Sèrum boví fetal (SBF): 100 ml
- L-glutamina (200 mM): 10 ml
- Aminoàcids no essencials: 10 ml
- Hepes pH 7,4: 30 ml
- Solució de penicil·lina-estreptomina (PS): 1 ml
- Neomicina: 1 ml
- Afegir aigua destil·lada estèril fins 1000 ml

Medi manteniment amb 2,5% de sèrum boví fetal. Amb aquest medi es mantenen les línies MRC-5 i A-549. Es realitzava amb un volum final de 1 litre.

- Medi Basal Essencial (BME) d'Eagle (10x): 100 ml
- SBF: 25 ml
- L-glutamina (200 mM): 10 ml
- Hepes pH 7,4: 30 ml
- Solució de penicil·lina-estreptomina (PS): 1 ml
- Neomicina: 1 ml
- Afegir aigua destil·lada estèril fins 1000 ml

Medi manteniment amb 1,25% de sèrum boví fetal. Amb aquest medi es mantenen les línies RD i HEP-2. Es realitzava amb un volum final de 1 litre.

- BME d'Eagle (10x): 100 ml
- SBF: 12,5 ml
- L-glutamina (200 mM): 10 ml
- Hepes pH 7,4: 30 ml
- Solució de penicil·lina-estreptomycina (PS): 1 ml
- Neomicina: 1 ml
- Afegir aigua destil·lada estèril fins 1000 ml

Medi manteniment sense sèrum i amb tripsina (MMT). Aquest medi s'utilitza per les línies LLC-MK2 i MCDK. En el moment de la seva utilització se l'hi afegeix tripsina-TPCK (cada 100mL de MMT, s'afegeix 0,4 ml de tripsina-TPCK).

- MEM d'Eagle (10x): 100 ml
- L-glutamina (200 mM): 10 ml
- Hepes pH 7,4: 30 ml
- Solució de penicil·lina-estreptomycina (PS): 1 ml
- Neomicina: 1 ml
- Afegir aigua destil·lada estèril fins 1000 ml

ANNEX II




Procediment coloració de Harris-Shorr modificada:

El procediment segueix els següents passos:

1. Buidar el medi de cultiu de tub de Leighton i traspasar-lo a un tub de rosca estèril.
2. Rentar el tub 3 vegades amb sèrum fisiològic.
3. Afegir 7-8 ml de fixador de Bouin perquè cobreixi tot el portaobjectes.
4. Incubar a temperatura ambient durant 1 hora i 30 minuts.
5. Abocar el fixador de Bouin i afegir 7-8 ml d'alcohol de 70°.
6. Amb una pipeta de vidre amb la punta de ganxo s'acompanya el portaobjectes fins a l'emboadura del tub. Amb unes pinces s'extreu el portaobjectes del tub de Leighton i es passa consecutivament pels següents reactius:
 - alcohol de 70° (si està en fixador de Bouin) (10-20 segons)
 - alcohol de 50° (si està en alcohol de 70°) (10-20 segons)
 - aigua corrent (30-60 segons)
 - hematoxilina de *Harris* (6-8 segons)
 - aigua destil·lada (30-60 segons canviant l'aigua una vegada)
 - alcohol amoniacal (60 segons)
7. Seguim amb la deshidratació:
 - alcohol de 70° (10-20 segons)
 - alcohol de 80° (10-20 segons)
 - alcohol de 95° (10-20 segons)
 - alcohol absolut (10-20 segons)
 - toluè (10-20 segons)
 - xilè (10-20 segons)

8. Deixar assecar completament i muntar sobre un portaobjectes amb medi de muntatge. La monocapa cel·lular ha d'estar en contacte amb el medi de muntatge, així que cal fixar-se a l'hora de muntar-la.
9. Observar a microscopi òptic a 40X.

Procediment operatiu del sistema *NucliSENS easyMAG*:

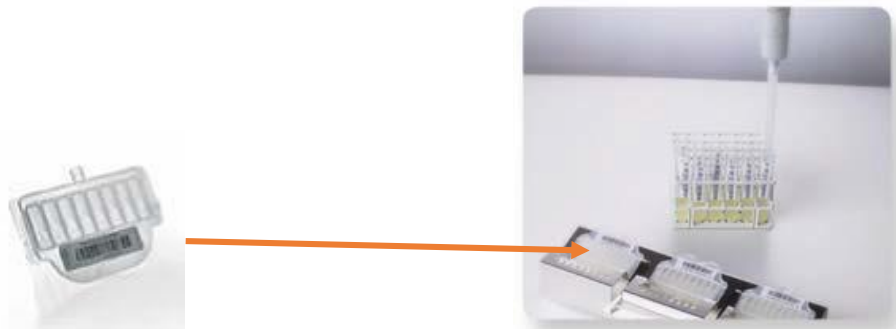
1. Encendre la plataforma *NucliSENS easyMAG* amb l'interruptor situat al lateral posterior dret.
2. Encendre l'ordinador. No encendre l'ordinador fins que l'indicador de la plataforma *NucliSENS easyMAG* es posi de color verd, per que no es faria bé la connexió. Apareix una pantalla que ens demana l'usuari i la contrasenya.
3. Introducció de les dades de les mostres: En el menú principal prémer la icona  i a continuació la icona .
4. Introduir :
 - Identificació de la mostra (nº laboratori)
 - Volum de la mostra (normalment 500 µl)
 - Volum d'el·luït (normalment 60 µl).
 - Lisis (normalment mostra sense lisar)
5. Aquestes dades s'han de comprovar cada vegada que s'introdueixen mostres per que l'ordinador té com a paràmetres establerts 1000 µl de mostra i 25 µl d'el·luït. Per a confirmar cada petició prémer ENTER o la icona .
6. Càrrega de les puntes d'extracció en el *NucliSENS easyMAG*: Carregar ara les puntes d'extracció comprovant que el botó de la pantalla es posa de color verd Per això:



- Agafar les puntes per la llengüeta amb les puntes mirant cap avall.
- Introduir els laterals en el capçal d'aspiració una mica inclinats.
- Continuar empenyent suaument fent una lleugera pressió cap a baix.
- Les puntes s'haurien de moure cap a baix i després horitzontalment cap enrere fins encaixar a la seva posició.

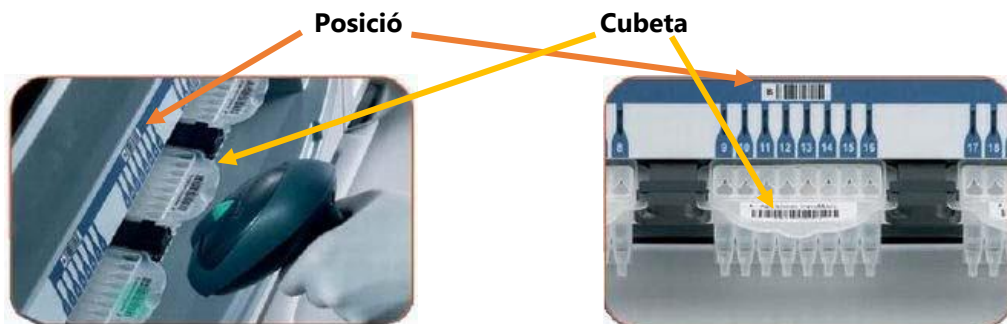
7. Càrrega de les mostres en les cubetes:

- Situar les cubetes de plàstic en el suport metàl·lic Aquestes cubetes tenen capacitat per 8 mostres.
- Dispensar la mostra (500µL) en la posició corresponent




- Carregar les cubetes en la plataforma *NucliSENS easyMAG* en les posicions que els hi correspongui

8. Escanejat de les pipetes i cubetes: Escanejar els codi de barres de cada posició i a continuació el codi de barres de la cubeta. SEMPRE S'HA DE LLEGIR EN AQUEST ORDRE. Aquest procés s'ha de fer posició a posició.



9. Extracció:



- Prémer la icona  per a iniciar l'extracció; aquest procés dura 40 min. Durant aquest procés NO ES POT OBRIR LA COBERTA de la plataforma
- Recollir els extractes en tubs eppendorf prèviament retolat amb el n° d'identificació de la mostra. S'ha de tenir cura de no transferir cap partícula de sílice, ja que interfereixen en procediments posteriors.

ANNEX III

Benefits and Drawbacks of Molecular Techniques for Diagnosis of Viral Respiratory Infections. Experience With Two Multiplex PCR Assays

Laura García-Arroyo,¹ Núria Prim,¹ Neus Martí,¹ Maria Carme Roig,¹ Ferran Navarro,^{1,2} and Núria Rabella^{1,2*}

¹Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

²Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Molecular techniques have represented a major step forward in the diagnosis of viral respiratory infections. They are considered highly sensitive and specific compared to conventional techniques. In this study two nucleic acid amplification tests (NAATs) were compared to conventional methods (immunofluorescence and viral culture). The aim of this work was to discuss the clinical interpretation of the results obtained by NAATs on the basis of the two-decade experience of our group and the literature. Eighty nasopharyngeal aspirates were collected from children under six years attended for acute respiratory illness at the pediatric emergency room of a third level Hospital. Both NAATs tested (Seeplex[®] and Clart[®]) showed an overall higher performance regarding sensitivity (76% and 90%, respectively). Compared to Seeplex[®], the Clart[®] system tripled the number of multiple detections (8 by Seeplex[®] vs. 25 by Clart[®]). In some specimens both NAATs detected different viruses. Given these discrepancies and the fact that detection of viral nucleic acids is not necessarily related to the current clinical syndrome, the interpretation of molecular results may not always be so straightforward. The pros and cons of NAATs should always be taken into account when giving a result. *J. Med. Virol.* © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: multiplex PCR; respiratory virus; viral isolation; immunofluorescence

INTRODUCTION

Respiratory tract infections are the most frequent cause of illness in children, and most of them are of

viral etiology [van de Pol et al., 2007; Mahony, 2008; Raymond et al., 2009; Vallieres and Renaud, 2013]. The most common respiratory viruses are *Influenza A virus* (FLUAV), *Influenza B virus* (FLUBV), *Human parainfluenzavirus 1–4* (PIV-1-4), *Human respiratory syncytial virus* (RSV), *Human metapneumovirus* (hMPV), *Enteroviruses* (EV), *Rhinoviruses* (RV), *Human coronaviruses* (HCoV), *Human bocaviruses* (HBoV), and *Human adenoviruses* (AdV). As infections caused by respiratory viruses show similar clinical manifestations, microbiological studies must be performed to identify the etiology [Caliendo, 2011; Pagarolas and Sune, 2014].

Diagnosis of viral respiratory infections is traditionally performed using conventional methods based on viral culture (VC), or antigen detection such as immunofluorescence assays (IF). VC remains the gold-standard but it requires trained personnel, results may take a few days, and not all viruses can multiply in culture. IF techniques are quick and they allow quality control of samples but they need big expertise for interpretation. Additionally, they are not available for all viruses and lack sensitivity for others [Ginocchio and McAdam, 2011].

Nucleic acid amplification tests (NAATs) have become an alternative that offers high sensitivity and specificity when compared to conventional methods [Elnifro et al., 2000; Mahony, 2008; Ginocchio and McAdam, 2011]. Numerous tests have been developed using multiplex PCR to detect several viruses, including those that are not detected either by VC or by immunoassays. Although PCR-based techniques were

*Correspondence to: Núria Rabella, Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/ Sant Quintí, 89, 08041 Barcelona, Spain.

E-mail: nrabella@santpau.cat

Accepted 11 June 2015

DOI 10.1002/jmv.24298

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

initially limited by the few types of viruses that could be detected in a single test [Liolios et al., 2001; Coiras et al., 2004; Bellau-Pujol et al., 2005; Freymuth et al., 2006], numerous multiplex PCR tests have been developed, allowing more than 10 viruses to be detected in a single assay. Amplicon detection can be performed by hybridization using microarrays [Henrickson et al., 2007; Raymond et al., 2009; Cannon et al., 2010; Renois et al., 2010; Frobert et al., 2011; Culebras et al., 2013; Pillet et al., 2013] or semiconductor-based DNA microspheres [Mahony et al., 2007]. Several respiratory virus panels (RVP) have been commercialized, such as xTAG[®] RVP from Luminex[®] [Mahony et al., 2007; Pabbaraju et al., 2008; Gadsby et al., 2010; Balada-Llasat et al., 2011; Kim et al., 2013; Pillet et al., 2013], Multicode PLx RVP from Eragen [Balada-Llasat et al., 2011], and Resplex[®] II from Qiagen [Li et al., 2007; Balada-Llasat et al., 2011; Pillet et al., 2013]. Other NAATs are the multiplex ligation-dependent probe amplification system (MLPA) [Reijmans et al., 2008; Bruijnesteijn van Coppenraet et al., 2010; Pillet et al., 2013] and the dual priming oligonucleotide (DPO) system [Roh et al., 2008; Bruijnesteijn van Coppenraet et al., 2010; Zhang et al., 2012; Cho et al., 2013; Kim et al., 2013; Pillet et al., 2013]. PCR-based systems generate a diagnostic result within only one working day, but implementation in a laboratory routine may not be cost-effective.

This study assessed two multiplex PCR-based techniques commercially available, namely Clart[®] and Seeplex[®]. Both NAATs have been studied previously [Roh et al., 2008; Bruijnesteijn van Coppenraet et al., 2010; Renois et al., 2010; Frobert et al., 2011; Zhang et al., 2012; Cho et al., 2013; Culebras et al., 2013; Kim et al., 2013; Pillet et al., 2013] and, in the present work, they were compared with each other and also with two conventional methods for the diagnosis of viral respiratory infections. The aim of this work was to discuss the clinical interpretation of the results obtained by NAATs on the basis of our two-decade experience on conventional methods. The benefits and pitfalls of molecular techniques are also discussed.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Eighty nasopharyngeal aspirates were collected from children under six years attended for acute respiratory illness at the pediatric emergency room of a third level Hospital, from October to November 2008 and from February to March 2009. Consecutive specimens, with more than 25 cells/field by microscopic observation and sufficient residual volume (300 µL), were selected. These specimens were processed within the same working day or stored at +4°C during the weekends (maximum 72 hr). Epidemiological data were collected.

J. Med. Virol. DOI 10.1002/jmv

Viral Isolation and Antigen Detection

Samples were assessed using D3 DFA Metapneumovirus Identification Kit (Diagnostics Hybrids, Athens, OH), RSV Direct IF (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France), and Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification IFA kit (Millipore, Light Diagnostics, Temecula, CA) to detect AdV, FLUAV, FLUBV, PIV-1,2,3 and RSV according to the manufacturer's instructions. For viral isolation, these samples were cultured using six cell lines: MRC5, A549, HEP2, MDCK, LLCMK2, and RD (Vircell S.L Santa Fe, Granada, Spain). All cell cultures were examined daily for cytopathic effect during two weeks. Definitive identification was assessed by IF.

Nucleic Acid Detection

Nucleic acid was extracted from 200 µL of clinical samples using EZ1 Virus Mini Kit v2.0 and Bio Robot EZ-1 (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. The extracts were stored at -80°C until use. Molecular viral detection was performed using two NAATs: Seeplex[®] RV12 ACE Detection Kit (Seegene, Seoul, South Korea) and Clart[®] Pneumovir Kit (Genomica, Madrid, Spain), following the manufacturer's instructions.

The Seeplex[®] method is based on the DPO system and amplicon detection is performed by fully automated capillary electrophoresis separation (MultiNA, ShimadzuBiotech, Kyoto, Japan). This method provides results in about six hours. The Clart[®] system is based on microarray technology and analysis of the resulting hybridization pattern is performed using optical equipment (Clondiag Chip Technologies, Jena, Germany). This method provides results in about 9 hr. Both assays detect FLUAV, FLUBV, AdV, hMPV, HCoV-229E, PIV-1, PIV-2, PIV-3, RSVa, RSVb, and RV. Seeplex[®] also detects HCoV-NL63 and HCoV-OC43, and differentiates between species of RV (A and B). Clart[®] also detects HBoV, *Influenza C virus* (FLUCV), EV, PIV-4 A/B, and differentiates between hMPV_a and hMPV_b. Both assays included an internal control to detect amplification inhibition. Both NAATs gave qualitative results only.

Data Analysis

Epidemiological data, such as age, sex, date of sample collection and clinical diagnosis, were collected. Statistical analyses were performed using the Vassar Stats website (<http://vassarstats.net/>).

In this work a result was considered clinically relevant or true positive when a respiratory virus was detected by IF and/or VC regardless of NAATs results or by both NAATs (criterion of positivity).

RESULTS

Overall Viral Detection

The range of viruses detected differed depending on the virus and the method used (Table I). Of 80

samples included in this study, viral detection was obtained in 37, 40, and 62 samples by IF/VC, Seeplex[®] and Clart[®], respectively. Either NAAT yielded a positive result in 40 samples that were negative by IF/VC. Only three samples (4%) were negative by all the techniques assessed (Table I).

Seeplex[®] and Clart[®] detected 11 and 57 viruses more than IF/VC, respectively. RVs were the viruses most frequently detected by PCR although only two were recovered by IF/VC (Table I). Multiple detection was obtained in 30 samples by NAATs while IF/VC did not achieve multiple recovery in any case. Inhibition was observed in 19 samples, 10 by Seeplex[®] (12.5%) and 11 by Clart[®] (14%); two of these samples were inhibited by both methods.

Comparison of Results Obtained By IF/VC and NAATs

According to the established criterion of positivity, 46 (57.5%) samples were considered positive for a respiratory virus; 36 by IF/VC regardless of NAAT results and 10 by two NAATs only. Viral detection was coincident between IF/VC and both NAATs in 20 samples out of 36. Coincident results were found between IF/VC and only one NAAT in 12 samples (one by Seeplex[®] and 11 by Clart[®]). Three samples had a positive viral detection by IF/VC but were negative by NAATs. Another positive sample was inhibited. In three positive samples by IF/VC, additional viruses were detected by both Seeplex[®] and Clart[®]. RV were detected in all samples positive only by both NAATs (n=10), one of them having an additional virus (AdV). Overall, 50 significant viruses were detected. Since EVs were only detected by one NAAT, they were not included in further calculations. Considering the remaining significant viruses, the relative sensitivity of IF/VC, Seeplex[®] and Clart[®] was

70% (32/46), 76% (35/46), and 89% (41/46), respectively (Table II).

Multiple Viral Detection

NAATs achieved a high rate of multiple virus detection (37.5%; 30/80), corresponding to 10% (8/80) by Seeplex[®] and 31% (25/80) by Clart[®]. Regarding viruses identified only by one technique, Clart[®] detected HBoVs in 16 samples and 13 of them (81%) were multiple detections. Seeplex[®] detected HCoV-OC43 in five samples corresponding to multiple detections in three cases (60%). Following the criterion of positivity previously established, only four samples were considered to have real multiple infections (8.7%; 4/46) (Table III).

Clinical Analysis

Regarding clinical and demographic analysis, no relevant data were obtained. From the total number of samples assessed, 39 and 41 specimens belonged to patients with upper and lower respiratory tract infections (URTI and LRTI), respectively. The viral distribution did not follow a definite pattern although RSV and AdV were predominantly detected in patients with LRTI and URTI, respectively. No statistically significant association was found between viruses detected and each clinical group.

DISCUSSION

The main finding in the present study was that both NAATs used to detect respiratory viruses yielded different results. As expected, NAATs detected more viruses than the conventional techniques. The question remains, however, as to whether this extra sensitivity provides more reliable information about the etiology of the infection.

TABLE I. Total of Viruses Detected By Each Technique Considering All 80 Samples Analysed

Virus	IF/VC	Seeplex [®]	Clart [®]
RSV	11 ^a	7	12
AdV	13 ^b	14	13
EV	4	ND	10
hMPV	4	1	7
RV	2	17	27
PIV-3	2	4	4
FLUBV	0	0	3
HCoV-OC43	ND	5	ND
HBoV	ND	ND	16
PIV-4	ND	ND	1
FLUCV	ND	ND	1
<i>Human herpesvirus 5</i>	1	ND	ND
Total of virus detected	37	48	94
Total positive samples	37	40	62
Total negative samples	43	30	7
Total inhibited samples	ND	10	11
Total of samples with multiple viruses	0	8	25

ND, unable to be detected by the corresponding technique.

^aIF and VC were positive in seven cases, and only IF in four cases.

^bIF and VC were positive in one case, and only VC in 12 cases.

TABLE II. Total of Viruses Detected By Each Technique Considering the Criterion of Positivity

Viruses	Total	IF/VC	Seeplex [*]	Clart [*]
RSV	11	11	7	10
AdV	14	13	11	12
PIV-3	2	2	2	2
hMPV	4	4	1	3
RV	15	2	14	14
EV	4	4	ND	4
Multiple detection	4	0	2	4
Total of viruses detected	50	36	35	45
Sensitivity ^a	—	70%	76%	89%

ND, unable to be detected by the corresponding technique.
^aA total of 46 viruses were considered after exclusion of EV.

Clart[®] had the highest detection rate and results agreed with conventional results more often than those by Seeplex[®]. This could be due to the different range of viruses covered by each technique. Although both NAATs have been investigated before, the methods used as gold standard were different [Roh et al., 2008; Bruijnesteijn van Coppenraet et al., 2010; Frobert et al., 2011; Zhang et al., 2012; Cho et al., 2013; Culebras et al., 2013; Kim et al., 2013; Pillet et al., 2013]. An important drawback in comparing NAATs is therefore the lack of a real gold standard.

Both conventional and PCR-based methods yielded similar results for RSV and AdV. For RSV, IF was more sensitive than VC and equally sensitive to the molecular methods. For AdV, isolation in cell cultures is usually required because of the poor sensitivity of IF and the number of AdV isolates coincided with those detected by molecular methods. These findings coincided with the experience of our group over the last two decades and have been reported by other authors [Dunn et al., 2004; Mahony, 2008; Doan et al., 2012; Cho et al., 2013].

Molecular techniques have been the key to diagnosing a large range of new viruses incapable of multiplying in VC, such as HCoV and HBoV, and the new species of RV. Considering those viruses detected only by PCR, about 72% corresponded to RV, hMPV, HCoV-OC43, PIV-4, FLUCV, and HBoV. As in previous studies, both NAATs largely increased the number of RV detected [Freythuth et al., 2006; Li et al., 2007; Mahony et al., 2007; Bruijnesteijn van Coppenraet et al., 2010; Cho et al., 2013].

NAATs do not always give a result. Inhibition of the amplification reaction is a drawback, mainly because of the specimen itself or the extraction protocol. Both NAATs tested yielded inhibited results. The fact that most inhibited samples differed between the two techniques, despite the extract being the same, suggests that the methods were probably the main cause of PCR inhibition.

The failure of NAATs to give a result may also be because of the lack of a specific target. This is not only because the target is not included in the reaction, as in

TABLE III. All Samples With Multiple Viral Detection. Real Multiple Infections According to the Criterion of Positivity Are Shown in Bold

No	IF/VC	Seeplex [*]	Clart [*]
1	RSV	RSV	RSV + HBoV
2	NEG	RV + HCoV-OC43	RV
8	NEG	RV	RV + HBoV + PIV-3
10	NEG	RV	RV + HBoV
13	NEG	Inhibited sample	HBoV + EV + PIV-4
15	PIV-3	PIV-3 + RV	PIV-3 + RV
17	NEG	PIV-3 + RV	Inhibited sample
18	EV	RV	RV + EV
20	AdV	AdV	AdV + RV
21	RSV	RSV	RSV + HBoV
22	RSV	RSV	RSV + HBoV
23	EV	RV	RV + EV
26	PIV-3	PIV-3	PIV-3 + HBoV
27	NEG	AdV + RV	AdV + RV + RSV
29	NEG	NEG	AdV + RV
30	RSV	NEG	RSV + HBoV
36	EV	NEG	EV + RV + HBoV
37	RSV	NEG	RSV + EV + RV + HBoV
38	RSV	NEG	RSV + EV + RV
43	AdV	AdV	AdV + HBoV
47	AdV	AdV	AdV + FLUCV
51	AdV	AdV + RV	AdV
52	AdV	AdV + HCoV-OC43	AdV
55	hMPV	hMPV + HCoV-OC43	hMPV + RV
60	AdV	AdV	AdV + HBoV
63	AdV	AdV + RV	AdV
65	AdV	AdV	AdV + hMPV
67	NEG	Inhibited sample	EV + FLUBV
69	NEG	NEG	hMPV + HBoV
79	EV	NEG	EV + hMPV

the case of *Human herpesvirus 5*, but also because of the variability of the respiratory viruses. Therefore laboratories, especially those that rely only on NAATs, need to constantly review the viruses included in the assays they use [Ogilvie, 2001].

NAATs have created a new scenario in the diagnosis of viral respiratory infections: the high yield of multiple viral detections [Kuyppers et al., 2006; Madhi and Klugman, 2006; Leland and Ginocchio, 2007]. Compared to Seeplex[®], the Clart[®] system tripled the number of multiple detections; differences in their design, particularly concerning the primers and the amplification conditions, may contribute to this disparity. The high rate of multiple detection, which may be explained because of the pediatric population, is in agreement with other authors [Roh et al., 2008; Kim et al., 2009; Bruijnesteijn van Coppenraet et al., 2010; Frobert et al., 2011; Zhang et al., 2012].

So an important remaining question is the clinical relevance of the results obtained by NAATs. Covering a broad range of etiological agents, these quick techniques may be especially useful in immunosuppressed or critically ill patients although their clinical impact is not yet well established [Garbino et al., 2009; Schnell et al., 2012]. However, as NAATs detect viral nucleic acids regardless of the presence of viral antigens or infective viruses [Pagarolas and Sune,

2014], a positive result can reflect either a present infection or a past infection [Elnifro et al., 2000; Mahony, 2008; Ginocchio and McAdam, 2011; Jansen et al., 2011]. Although the viral load may be useful to predict the correlation of a virus and an infectious process it is not well-established for respiratory viral infections [Kuypers et al., 2006; Debiaggi et al., 2012].

The prevalence of specific viruses based on NAATs differs between symptomatic and asymptomatic children [Debiaggi et al., 2012; Buller, 2013]. Some viruses, such as RSV, are usually associated with clinical illness and should be considered as the etiological agent in a patient with respiratory symptoms. In contrast, viruses such as RV, HCoV, and HBoV seem to be frequently found in asymptomatic children [Debiaggi et al., 2012; Meriluoto et al., 2012] although more studies on this issue are required.

The management of patients requires reporting results within a clinically relevant time-scale; microbiology laboratories should take this into consideration when choosing a diagnostic test. NAATs are faster than culture, which requires two days minimum; both NAATs tested had a turn around time of six and nine hours. However, most NAATs are not faster than IF or immunochromatography. Rapid antigen detection tests of certain respiratory viruses provide a result with very high specificity within 15–30 min [Mandell et al., 2007]. In the epidemic situation, the use of these techniques as the first step to detect viruses such as influenza virus or RSV may accelerate results and bring simplicity to the laboratory. Only the negative results would require further analysis [Buller, 2013]. Another important point is that NAATs and antigen detection techniques only detect the specific viruses under investigation; other viruses that may be related to the clinical process will not be detected.

The combination of several methods in the diagnosis of viral respiratory infections is still a great option. However, not all laboratories have the facilities or the personnel required to perform a wide range of techniques, such as antigen detection tests, virus isolation and molecular tests. NAATs are particularly useful in detecting new viruses and in giving a quick result. However, the interpretation of a molecular test is not always straightforward. The clinical virologist must consider the pros and cons of the technique used and the clinical impact of the result.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. Adela Retana for clinical data review, and Margarita del Cuerpo, and Oscar Cordon for their technical assistance. Kits for molecular detection of viruses were kindly provided by Genomica S.A.U. and Izasa-Werfen Group.

REFERENCES

- Balada-Llasat JM, LaRue H, Kelly C, Rigali L, Pancholi P. 2011. Evaluation of commercial ResPlex II v2.0, MultiCode-PLx, and xTAG respiratory viral panels for the diagnosis of respiratory viral infections in adults. *J Clin Virol* 50:42–45.
- Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, Pozzetto B, Ginevra C, Freymuth F. 2005. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods* 126:53–63.
- Bruijnesteijn van Coppenraet IE, Swanink CM, van Zwet AA, Nijhuis RH, Schirm J, Wallinga JA, Ruijs GJ. 2010. Comparison of two commercial molecular assays for simultaneous detection of respiratory viruses in clinical samples using two automatic electrophoresis detection systems. *J Virol Methods* 169:188–192.
- Buller RS. 2013. Molecular detection of respiratory viruses. *Clin Lab Med* 33:439–460.
- Caliendo AM. 2011. Multiplex PCR and emerging technologies for the detection of respiratory pathogens. *Clin Infect Dis* 52:S326–S330.
- Cannon GA, Carr MJ, Yandle Z, Schaffer K, Kidney R, Hosny G, Doyle A, Ryan J, Gunson R, Collins T, Carman WF, Connell J, Hall WW. 2010. A low density oligonucleotide microarray for the detection of viral and atypical bacterial respiratory pathogens. *J Virol Methods* 163:17–24.
- Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Perez-Brena P. 2004. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* 72:484–495.
- Culebras E, Betriu C, Vazquez-Cid E, Lopez-Varela E, Rueda S, Picazo JJ. 2013. Detection and genotyping of human respiratory viruses in clinical specimens from children with acute respiratory tract infections. *Rev Esp Quimioter* 26:47–50.
- Cho CH, Chulten B, Lee CK, Nam MH, Yoon SY, Lim CS, Cho Y, Kim YK. 2013. Evaluation of a novel real-time RT-PCR using TOCE technology compared with culture and Seplex RV15 for simultaneous detection of respiratory viruses. *J Clin Virol* 57:338–342.
- Debiaggi M, Canducci F, Ceresola ER, Clementi M. 2012. The role of infections and coinfections with newly identified and emerging respiratory viruses in children. *Virol J* 9:247.
- Doan Q, Enarson P, Kisson N, Klassen TP, Johnson DW. 2012. Rapid viral diagnosis for acute febrile respiratory illness in children in the Emergency Department. *Cochrane Database Syst Rev* 5:CD006452.
- Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, Carroll KC. 2004. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J Clin Microbiol* 42:79–82.
- Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. 2000. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 13:559–570.
- Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, Gouarin S, Petitjean J, Eckart P, Brouard J. 2006. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol* 78:1498–1504.
- Frobert E, Escuret V, Javouhey E, Casalegno JS, Bouscambert-Duchamp M, Moulinier C, Gillet Y, Lina B, Floret D, Morfin F. 2011. Respiratory viruses in children admitted to hospital intensive care units: Evaluating the CLARITY(R) Pneumovir DNA array. *J Med Virol* 83:150–155.
- Gadsby NJ, Hardie A, Claas EC, Templeton KE. 2010. Comparison of the Luminex Respiratory Virus Panel fast assay with in-house real-time PCR for respiratory viral infection diagnosis. *J Clin Microbiol* 48:2213–2216.
- Garbino J, Socal PM, Aubert JD, Rochat T, Meylan P, Thomas Y, Tapparel C, Bridevaux PO, Kaiser L. 2009. Respiratory viruses in bronchoalveolar lavage: A hospital-based cohort study in adults. *Thorax* 64:399–404.
- Ginocchio CC, McAdam AJ. 2011. Current best practices for respiratory virus testing. *J Clin Microbiol* 49:S44–S48.
- Henrickson KJ, Kraft AJ, Canter D, Shaw J. 2007. Comparison of electronic microarray to enzyme hybridization assay for multiplex reverse-transcriptase PCR detection of common respiratory viruses in children. *Clin Microbiol News* 29:113–119.

- Jansen RR, Wieringa J, Koekkoek SM, Visser CE, Pajkrt D, Molenkamp R, de Jong MD, Schinkel J. 2011. Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: Toward defining clinically relevant cutoff values. *J Clin Microbiol* 49:2631–2636.
- Kim HK, Oh SH, Yun KA, Sung H, Kim MN. 2013. Comparison of Anyplex II RV16 with the xTAG respiratory viral panel and Seeplex RV15 for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 51:1137–1141.
- Kim SR, Ki CS, Lee NY. 2009. Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *J Virol Methods* 156:111–116.
- Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, Huang ML, Cent A, Corey L, Morrow R. 2006. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *J Clin Microbiol* 44:2382–2388.
- Leland DS, Ginocchio CC. 2007. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev* 20:49–78.
- Li H, McCormac MA, Estes RW, Sefers SE, Dare RK, Chappell JD, Erdman DD, Wright PF, Tang YW. 2007. Simultaneous detection and high-throughput identification of a panel of RNA viruses causing respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 45:2105–2109.
- Liolios L, Jenney A, Spelman D, Kotsimbos T, Catton M, Wesselingh S. 2001. Comparison of a multiplex reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay with conventional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens. *J Clin Microbiol* 39:2779–2783.
- Madhi SA, Klugman KP. 2006. Acute Respiratory Infections. In: *Africa, Diseases and mortality in Sub-Saharan Africa*, editor. 2nd edition. ed. Washington (DC).
- Mahony J, Chong S, Merante F, Yaghoobian S, Sinha T, Lisle C, Janeczko R. 2007. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *J Clin Microbiol* 45:2965–2970.
- Mahony JB. 2008. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* 21:716–747.
- Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM, Jr., Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG. 2007. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 44:S27–S72.
- Meriluoto M, Hedman L, Tanner L, Simell V, Mäkinen M, Simell S, Mykkanen J, Korpelainen J, Ruuskanen O, Ilonen J, Knip M, Simell O, Hedman K, Soderlund-Venermo M. 2012. Association of human bocavirus 1 infection with respiratory disease in childhood follow-up study, Finland. *Emerg Infect Dis* 18:264–271.
- Ogilvie M. 2001. Molecular techniques should not now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Rev Med Virol* 11:351–354.
- Pabbaraju K, Tokaryk KL, Wong S, Fox JD. 2008. Comparison of the Luminox xTAG respiratory viral panel with in-house nucleic acid amplification tests for diagnosis of respiratory virus infections. *J Clin Microbiol* 46:3056–3062.
- Pagarolas AA, Sune TP. 2014. Microbiological diagnosis of viral respiratory infections in the adult patient. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 32:51–56.
- Pillet S, Lardeux M, Dina J, Grattard F, Verhoeven P, Le Goff J, Vabret A, Pozzetto B. 2013. Comparative evaluation of six commercialized multiplex PCR kits for the diagnosis of respiratory infections. *PLoS ONE* 8:e72174.
- Raymond F, Carboneau J, Boucher N, Robitaille L, Boisvert S, Wu WK, De Serres G, Boivin G, Corbeil J. 2009. Comparison of automated microarray detection with real-time PCR assays for detection of respiratory viruses in specimens obtained from children. *J Clin Microbiol* 47:743–750.
- Reijmans M, Dingemans G, Klaassen CH, Meis JF, Keijnders J, Mulders B, Eadie K, van Leeuwen W, van Belkum A, Horrevorts AM, Simons G. 2008. RespiFinder: A new multiparameter test to differentially identify fifteen respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 46:1232–1240.
- Renois F, Talmud D, Huguenin A, Moutte L, Strady C, Cousson J, Leveque N, Andreoletti L. 2010. Rapid detection of respiratory tract viral infections and coinfections in patients with influenza-like illnesses by use of reverse transcription-PCR DNA microarray systems. *J Clin Microbiol* 48:3836–3842.
- Roh KH, Kim J, Nam MH, Yoon S, Lee CK, Lee K, Yoo Y, Kim MJ, Cho Y. 2008. Comparison of the Seeplex reverse transcription PCR assay with the R-mix viral culture and immunofluorescence techniques for detection of eight respiratory viruses. *Ann Clin Lab Sci* 38:41–46.
- Schnell D, Legoff J, Mariotte E, Seguin A, Canet E, Lemiale V, Darmon M, Schlemmer B, Simon F, Azoulay E. 2012. Molecular detection of respiratory viruses in immunocompromised ICU patients: Incidence and meaning. *Respir Med* 106:1184–1191.
- Vallieres E, Renaud C. 2013. Clinical and economical impact of multiplex respiratory virus assays. *Diagn Microbiol Infect Dis* 76:255–261.
- van de Pol AC, van Loon AM, Wolfs TF, Jansen NJ, Nijhuis M, Breteler EK, Schuurman R, Rossen JW. 2007. Increased detection of respiratory syncytial virus, influenza viruses, parainfluenza viruses, and adenoviruses with real-time PCR in samples from patients with respiratory symptoms. *J Clin Microbiol* 45:2260–2262.
- Zhang G, Hu Y, Wang H, Zhang L, Bao Y, Zhou X. 2012. High incidence of multiple viral infections identified in upper respiratory tract infected children under three years of age in Shanghai, China. *PLoS ONE* 7:e44568.