

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

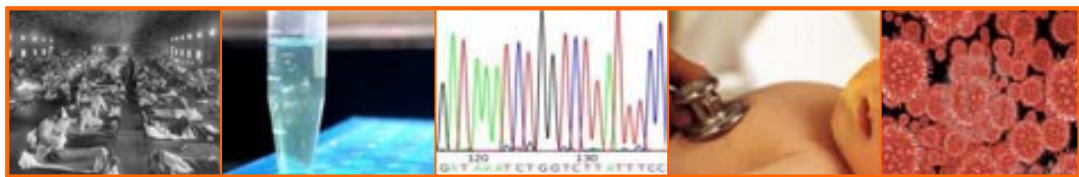
Facultad de Biociències

Departamento de Genètica i Microbiologia



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**NUEVOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA
DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS
EMERGENTES EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA**



Loreto Fuenzalida Inostroza

2012

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Biociències

NUEVOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS EMERGENTES EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA

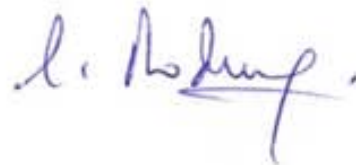
Memoria presentada por Loreto Fuenzalida Inostroza
para optar al grado de Doctor por la Universitat
Autònoma de Barcelona.

Con la aprobación de los Directores de la Tesis

Dr. Vicente Ausina Ruiz



Dr. Carlos Rodrigo Gonzalo-De-Liria



Bellaterra, Julio 2012

A mis padres y a Francisco

*Queda prohibido no sonreír a los problemas,
no luchar por lo que quieres,
abandonarlo todo por miedo,
no convertir en realidad tus sueños.
Queda prohibido no buscar la felicidad,
no vivir tu vida con una actitud positiva,
no pensar en que podemos ser mejores,
sentir que sin ti este mundo sería igual.*

Pablo Neruda

Sólo si nos detenemos a pensar en las pequeñas cosas llegaremos a comprender las grandes

José Saramago

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| SUMMARY | 5 |
| LISTADO DE ABREVIATURAS | 9 |
| ARTÍCULOS EN LOS QUE SE BASA ESTA TESIS | 11 |
| ARTICULOS COMPLEMENTARIOS QUE NO FORMAN PARTE DE ESTA TESIS ... | 12 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1.2. CUADROS CLINICOS ASOCIADOS A INFECCIÓN RESPIRATORIA VÍRICA | 14 |
| 1.2.1. Infecciones de las vías respiratorias altas | 15 |
| 1.2.1.1. Infección respiratoria de vías altas | 15 |
| 1.2.1.2. Faringoamigdalitis | 15 |
| 1.2.1.3. Laringitis..... | 15 |
| 1.2.2. Infecciones de vías respiratorias bajas..... | 16 |
| 1.2.2.1. Bronquiolitis..... | 16 |
| 1.2.2.2. Episodios de sibilancias recurrentes..... | 16 |
| 1.2.2.3. Neumonía..... | 17 |
| 1.2.2.4. Crisis asmática | 17 |
| 1.3. VIRUS CLÁSICOS | 17 |
| 1.3.1. Virus respiratorio sincitial (VRS) | 17 |
| 1.3.2. Virus parainfluenza (VPI)..... | 20 |
| 1.3.3. Virus influenza o virus de la gripe | 21 |
| 1.3.4. Adenovirus | 25 |
| 1.3.5. Coronavirus humano (HCoV) | 28 |
| 1.3.6. Rinovirus (RV)..... | 30 |
| 1.4. VIRUS EMERGENTES | 32 |
| 1.4.1. Metapneumovirus humano (HMPV) | 32 |
| 1.4.2. Bocavirus humano (HBoV) | 34 |
| 1.4.3 Virus influenza A H1N1 2009 | 36 |
| 1.4.4. Fases de una pandemia..... | 39 |
| 1.5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO..... | 40 |
| 1.5.1. Las muestras clínicas en el diagnóstico de la infección respiratoria | 41 |
| 1.5.2. Métodos de diagnóstico directo | 41 |
| 1.5.2.1. Aislamiento vírico en cultivo celular | 41 |
| 1.5.2.2. Técnicas de diagnóstico rápido por detección de antígenos..... | 43 |
| 1.5.2.2.1. Inmunofluorescencia (IF) | 43 |
| 1.5.2.2.2. Enzimoimmunoanálisis (EIA) | 44 |
| 1.5.2.2.3. Inmunocromatografía (IC)..... | 44 |
| 1.5.2.3. Detección de ácidos nucleicos..... | 45 |
| 1.5.2.3.1. Amplificación genómica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR y RT-PCR)..... | 46 |
| 1.5.2.3.2. PCR acoplada a enzimoimmunoanálisis..... | 46 |
| 1.5.2.3.3. Microarrays o biochips de DNA..... | 46 |
| 1.5.3. Métodos indirectos: técnicas serológicas | 47 |
| 1.6. Tratamiento antivírico..... | 49 |
| 2. JUSTIFICACION | 51 |
| 3. OBJETIVOS..... | 55 |
| 4. RESULTADOS..... | 57 |
| 4.1 Artículo 1..... | 57 |
| Usefulness of two new methods for diagnosing metapneumovirus infections in children | 57 |
| 4.2 Artículo 2..... | 65 |
| Human bocavirus 1 infection in hospitalized children: epidemiological and clinical characterization of a newly emerging respiratory virus..... | 65 |
| 4.3 Artículo 3..... | 77 |

| | |
|---|-----|
| Utility of the rapid antigen detection BinaxNOW Influenza A&B test for detection of novel influenza A (H1N1) virus..... | 77 |
| 4.4 Artículo 4..... | 83 |
| Validation of a polymerase chain reaction-oligochromatography test for detection of influenza A (H1N1) 2009 virus | 83 |
| 4.5 Artículo 5..... | 91 |
| Study of oseltamivir-resistant of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus by pyrosequencing..... | 91 |
| 4.6 Artículo 6..... | 99 |
| Evaluación de una nueva técnica molecular de detección simultánea de múltiples virus respiratorios..... | 99 |
| 5. DISCUSIÓN | 109 |
| 5.1 Estudio de la prevalencia de HMPV en niños menores de 5 años ingresados por infección respiratoria baja y sus características clínicas y epidemiológicas..... | 109 |
| 5.2 Estudio del papel de HBoV1 en niños menores de 5 años ingresados por infección respiratoria..... | 113 |
| 5.3 Evaluar la utilidad de las técnicas inmunológicas y moleculares en el manejo de los pacientes con Influenza A (H1N1) 2009. | 116 |
| 5.4 Uso de una técnica molecular de detección de múltiples virus en la infección respiratoria en niños. | 121 |
| 6. CONCLUSIONES | 125 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 129 |
| ANEXO..... | 139 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 143 |

RESUMEN

Las infecciones víricas agudas de las vías respiratorias son la principal causa de hospitalización de lactantes y niños pequeños en países desarrollados y una causa importante de muerte en países en vías de desarrollo. En la práctica clínica, a menudo en muchos pacientes no se identifica el virus causante de la infección debido a la falta de pruebas sensibles y/o la presencia de patógenos desconocidos. Dado los importantes efectos de las infecciones del tracto respiratorio en los niños, esta Tesis estudia nuevas pruebas de diagnóstico y su idoneidad para detectar virus respiratorios emergentes, en particular metapneumovirus humano (HMPV), bocavirus humano 1 (HBoV1) e influenza A (H1N1) 2009, así como entender su epidemiología en la población pediátrica. Esta tesis contribuye al conocimiento de nuevos virus respiratorios en niños, correlacionando los resultados de las nuevas técnicas con los hallazgos clínicos.

La tesis tiene seis objetivos principales que se han abordado en seis artículos diferentes. El primer objetivo fue evaluar la utilidad de dos métodos (RT-PCR y EIA) en el diagnóstico de HMPV. HMPV es un nuevo virus asociado a infección aguda de las vías bajas del tracto respiratorio (IRAB) en niños. El estudio indica que existe una buena correlación entre la RT-PCR y el EIA. Ambos métodos son útiles para el diagnóstico de infección por HMPV en niños. Nuestros resultados, de acuerdo con estudios anteriores, indican que el HMPV es una de las principales causas de IRAB en niños pequeños. La detección de HMPV en los laboratorios de microbiología, podría mejorar el diagnóstico etiológico de las infecciones respiratorias agudas en los niños.

El bocavirus humano 1 (HBoV1) ha sido recientemente detectado en niños con infección del tracto respiratorio. Debido a la frecuente codetección con otros virus y su detección en niños sanos, la relevancia clínica de este virus aún no ha sido esclarecida. El segundo objetivo de esta Tesis fue describir las características clínicas, epidemiológicas y moleculares de HBoV1 en niños hospitalizados por infección respiratoria y determinar su papel patogénico en estas infecciones. Según nuestros resultados, el HBoV1 fue el segundo virus más frecuente después del virus respiratorio sincitial (VRS), detectándose principalmente en los meses de invierno. Controlado por edad, sexo y presencia de otros virus, la detección de HBoV1 como único agente se asoció estadísticamente con infección respiratoria. Una alta carga vírica no fue estadísticamente asociada con la severidad de la enfermedad. El análisis filogenético confirmó la cocirculación de los dos genotipos, ST1 y ST2, descritos hasta el momento. De esta parte de la Tesis podemos concluir que el HBoV1 se encuentra con frecuencia en niños hospitalizados con infección grave del tracto respiratorio inferior. A pesar de la alta tasa de codetección, nuestros resultados sugieren que HBoV1 puede jugar un papel como agente etiológico de la infección respiratoria en niños.

El virus de la influenza es una infección estacional, que se asocia con una significativa morbilidad y mortalidad en niños y adultos durante los brotes o epidemias locales. La rápida detección de este virus es importante para la aplicación de estrategias preventivas y la iniciación de la terapia antivírica en pacientes con riesgo de complicaciones. La reciente aparición y propagación mundial del nuevo virus influenza A (H1N1) 2009 ha evidenciado la necesidad de evaluar pruebas de detección disponibles en el mercado. La RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) desarrollada por los CDC es el método de referencia debido a su elevada sensibilidad, capacidad de subtipo y rapidez en comparación al cultivo vírico. Sin embargo, la rRT-PCR es una técnica de elevada complejidad y requisitos técnicos, que no puede realizarse fácilmente en un entorno de atención primaria. Esta sección de la Tesis, relacionada con detección del virus influenza A, incluye tres objetivos: la evaluación de dos pruebas diferentes para el diagnóstico de la nueva influenza A y el estudio de resistencia a oseltamivir del virus pandémico en nuestra población.

Se tomaron muestras de aspirados nasofaríngeos durante el brote del nuevo virus pandémico y se utilizaron para comparar la utilidad de una prueba rápida de detección de antígeno diseñada para la identificación de influenza A estacional con la técnica de referencia rRT-PCR desarrollada por los CDC. La sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos de la prueba rápida son más altos en pacientes menores de 18 años de edad que en pacientes adultos y durante la fase aguda de la epidemia. Esta técnica de detección rápida podría ser una herramienta importante para el cuidado del paciente, ya que proporciona resultados en 30 minutos. Esto podría ser especialmente importante para los hospitales con limitaciones de tiempo y fondos para cubrir los gastos de la rRT-PCR. Sin embargo, esta prueba no puede distinguir el nuevo virus de los virus estacionales circulantes en la población.

En agosto de 2010, la pandemia se movió al período post-pandémico. Sin embargo, brotes localizados de distintas magnitudes continuaron, presentando en algunos casos una mayor tasa de severidad de la enfermedad. El objetivo de nuestro estudio fue evaluar un nuevo ensayo comercial basado en una PCR acoplada a detección mediante oligocromatografía en el diagnóstico del nuevo virus influenza. Según nuestros resultados, la nueva prueba es simple, rápida y ofrece una buena sensibilidad para la detección de influenza A (H1N1) 2009.

Por otra parte, los antivíricos juegan un papel fundamental en la prevención y tratamiento de la influenza. La mayor parte de los virus de la influenza pandémica son sensibles al oseltamivir; sin embargo, una única mutación (H275Y) en el gen de la neuraminidasa (NA) puede dar lugar a resistencia a oseltamivir. Este tipo de resistencia ya ha sido resgistrado en varios países. En esta parte de la tesis, se analizó el gen de la neuraminidasa de la gripe pandémica en 33 muestras de aspirados nasofaríngeos de pacientes con la nueva gripe confirmada. En nuestro

estudio, no se encontraron cepas resistentes oseltamivir, tanto en muestras de pacientes con y sin criterios clínicos de gravedad. El método de pirosecuenciación se encontró que era dependiente de la cantidad de RNA genómico en la muestra. Sin embargo, la pirosecuenciación es una técnica molecular simple y rápida que permite estudiar la presencia o ausencia de mutaciones. A pesar de no haber detectado cepas resistentes, es necesario continuar la vigilancia de la resistencia debido a la posibilidad de aparición de virus resistentes a oseltamivir en la población general.

La RT-PCR mutliplex para la detección de virus respiratorios se ha introducido recientemente, siendo más sensible que el cultivo vírico. El objetivo de esta última parte de la tesis fue estudiar una nueva técnica molecular basada en una PCR acoplada a un microarrays en fluido que emplean microesferas, para la detección de múltiples virus respiratorios. El ensayo es una herramienta sólida y reproducible, útil para el estudio y diagnóstico de las infecciones respiratorias víricas. Desde el punto de vista de coste-beneficio, esta nueva técnica sería, sin duda, de gran ayuda en poblaciones de riesgo.

Las nuevas técnicas moleculares e inmunológicas evaluadas en esta tesis se han encontrado útiles para la detección de nuevos virus respiratorios. En general, los ensayos de PCR son más sensibles que los métodos para la detección de antígenos. Por otra parte, la inclusión de estrategias de diagnóstico basadas en la PCR múltiple podría ser útiles para identificar el verdadero significado de las coinfecciones víricas. La incorporación progresiva de técnicas moleculares en laboratorios clínicos, permitirán un diagnóstico precoz y mejor control de la infección, previniendo la transmisión nosocomial, especialmente en pacientes con factores de riesgo. Sin embargo, es necesario disminuir su coste y equipamiento para que puedan ser utilizadas como técnicas de detección en centros asistenciales. Las nuevas técnicas estudiadas en esta Tesis amplían las posibilidades para el diagnóstico de virus que son indetectables por otros métodos o son difíciles de cultivar. La incorporación de la detección de virus emergente en los laboratorios de microbiología puede mejorar el diagnóstico etiológico de las infecciones de las vías respiratorias en los niños.

SUMMARY

Acute viral respiratory tract infections are the leading cause of hospitalization for infants and young children in developed countries. It is also a major cause of death in developing countries. In clinical practice, specific virus of respiratory tract infections (RTI) is often not identified due to the lack of sensitive tests and/or the presence of as-yet-unknown pathogens. Since the important effects of the RTIs in children, the Thesis assesses new diagnostic tests and their suitability to detect emerging viruses in RTIs, particularly human metapneumovirus (HMPV), human bocavirus 1 (HBoV1) and influenza A (H1N1) 2009, as well as to understand their epidemiology in pediatric population. This Thesis contributes to the knowledge of emerging respiratory viruses in children correlating the results with clinical findings.

The Thesis has six main objectives which have been addressed in six different articles. The first objective was to evaluate the usefulness of two methods (RT-PCR and EIA) to diagnose HMPV. HMPV is a new virus associated with acute RTI in children. Our results, in agreement with previous reports, indicate that HMPV is one of the leading causes of lower respiratory tract infections in young children. We found a good correlation between RT-PCR and EIA. Both methods are useful for the diagnosis of HMPV infection in children. HMPV detection in microbiology laboratories, can improve the aetiological diagnosis of acute respiratory infections in children.

Human bocavirus 1 (HBoV1) has recently been detected in children with RTI. Due to the frequent co-detection of other viruses and its detection in healthy children, the clinical relevance of this virus is not yet clear. The second objective was to describe the clinical, epidemiological and molecular characteristics of HBoV1 in hospitalized children and to determine its pathogenic role in RTI. HBoV1 was the second most frequent virus after respiratory syncytial virus (RSV), occurring in winter months. Controlled for age and gender, the detection of HBoV1 as a sole agent was statistically associated with RTI. A high viral load was not statistically associated with the severity of the disease. Phylogenetic analysis confirmed the co-circulation of both HBoV1 ST1 and ST2 genotypes described so far. HBoV1 was frequently found in children hospitalized with acute lower RTI. Despite the high rate of co-detection, our results suggest that HBoV1 may play a role as an etiologic agent of RTI in children.

Viral influenza is a seasonal infection associated with significant morbidity and mortality in both children and adults during local outbreaks or epidemics. The rapid detection of influenza viruses is important for the application of preventive strategies and the

initiation of antiviral therapy in patients with risk of complications. The recent appearance and worldwide spread of the novel influenza A (H1N1) 2009 virus has highlighted the need to evaluate commercially available rapid tests. Real-time RT-PCR developed by the CDC has become the selected method due to its increased sensitivity, ability to subtype, and its minor turnaround time than viral culture. However, rRT-PCR is a technique with high complexity and technical requirements and cannot be readily performed in a primary health care setting. This section, related with influenza A virus detection, includes three objectives: the evaluating of two different tests for diagnosis of novel influenza A and one assay for detection of oseltamivir resistance of the virus.

Nasopharyngeal aspirates collected during outbreaks of the novel influenza A (H1N1) 2009 were used to compare the accuracy of a rapid antigen-based test designed for seasonal influenza A detection, with the reference technique rRT-PCR developed by the CDC. Sensitivity, specificity and positive and negative predictive values of the rapid test are higher in patients less than 18 years old and during the acute stage of the epidemic than in adult patients. The assessed antigen-based test could be an important tool for patient care, because this test usually provides results within 30 min. This might be especially important for hospitals with time constraints and limited funds to cover the expense of rRT-PCR. However, this assay cannot distinguish the novel virus from the current circulating seasonal strains.

In August 2010, the pandemic moved into the post-pandemic period. However, localized outbreaks of various magnitudes continued with a higher rate of disease severity. The aim of our study was to assess a new commercial PCR–oligochromatographic assay in the diagnosis of novel influenza A. According to our results, the new test is simple, rapid, and provides a good sensitivity for detection of influenza A (H1N1) 2009.

Antivirals play a critical role in prevention and management of influenza. Most pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses are sensitive to oseltamivir, but a single point mutation (H275Y) in the neuraminidase (NA) gene of influenza A (H1N1) 2009 can lead to resistances and such viruses have been reported from several countries. We analyzed the neuraminidase gene of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in 33 samples of nasopharyngeal aspirates of patient with confirmed viral detection of pandemic influenza. We did not find oseltamivir-resistance strains from samples with or without clinical criteria of severity. The pyrosequencing method was found to be

dependent on the amount of genomic RNA in the sample. However, the pyrosequencing is a simple and rapid molecular technique that allows to study the presence or absence of mutations. However, it is necessary to continue surveillance of resistance because of the possibility of emergence of oseltamivir-resistant viruses in general population.

Multiplex RT-PCR assays for the detection of respiratory viruses have recently been introduced, and these assays are also more sensitive than culture. The last objective of this Thesis was to study a new multiplex PCR coupled with fluidic microarrays employing microspheres for detection of respiratory viruses. The assay is a solid and reproducible tool, useful for the study, diagnosis and management of viral respiratory infections. From the standpoint of cost-benefit, this new technique would undoubtedly be helpful in populations at risk.

In summary, the new molecular and immunological techniques evaluated in this Thesis have been found useful for detecting emerging respiratory viruses. In general, PCR assays are more sensitive than methods for the detection of antigens. Moreover, the inclusion of diagnostic strategies based on multiplex PCR could be helpful in identifying the real significance of viral coinfections. The gradual incorporation of molecular techniques in clinical laboratories, enable early diagnosis and prompt and better infection control, preventing nosocomial transmission, especially in patients with risk factors. However, it is necessary to decrease its cost and equipment that may be used as detection techniques in healthcare laboratories. New techniques studied here would expand the diagnostic possibilities for those viruses that are undetectable by other methods or are difficult to culture. Incorporating emerging virus detection in microbiology laboratories can improve the etiologic diagnosis of respiratory tract infections in children.

LISTADO DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| EIA | Enzimoimmunoanálisis |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent assay</i> |
| HBoV | Bocavirus humano |
| HCoV | Coronavirus humano |
| HMPV | Metapneumovirus humano |
| IC | Inmuncromatografía |
| IF | Inmunofluorescencia |
| IRA | Infección respiratoria aguda |
| IRAB | Infección respiratoria aguda baja |
| NA | Neuraminidasa |
| NPA | Aspirado nasofaríngeo |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| RT-PCR | Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa |
| RV | Rinovirus |
| SARS | Síndrome de distrés respiratorio agudo |
| VPI | Virus parainfluenza |
| VRS | Virus respiratorio sincitial |

ARTÍCULOS EN LOS QUE SE BASA ESTA TESIS

Artículo 1

Usefulness of two new methods for diagnosing metapneumovirus infections in children.

Loreto Fuenzalida, Jordi Fàbrega, Silvia Blanco, María del Mar Martínez, Cristina Prat, Miguel Pérez, Carmen Ramil, Jose Domínguez Vicente Ausina and Carlos Rodrigo.

Clinical Microbiology and Infection. 2010. 16: 1663-1668.

Artículo 2

Human bocavirus 1 infection in hospitalized children: molecular characterization and clinical associations of a newly emerging respiratory virus.

Loreto Fuenzalida, Jordi Fàbrega, Silvia Blanco, Elisa Martró, Cristina Prat, M. Mar Martínez-Colls, Meissiner Gomes-Fernandes, Jose Domínguez, Carlos Rodrigo and Vicente Ausina.

The pediatric Infectious Disease Journal. Submitted.

Artículo 3

Utility of the rapid antigen detection BinaxNOW Influenza A&B test for detection of novel influenza A (H1N1) virus.

Loreto Fuenzalida, Silvia Blanco, Cristina Prat, Marta Vivancos, María Jesús Domínguez, José María Mòdol, Carlos Rodrigo and Vicente Ausina.

Clinical Microbiology and Infection. 2010. 16:1574-1576.

Artículo 4

Validation of a polymerase chain reaction-oligochromatography test for detection of influenza A (H1N1) 2009 virus.

Loreto Fuenzalida, Cristina Prat, Silvia Blanco, Albert Bas, MJ Domínguez, Ángeles Hernández, Carlos Rodrigo and Vicente Ausina.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2012. 72:144-9.

Artículo 5

Study of oseltamivir-resistant of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus by pyrosequencing

Loreto Fuenzalida, Silvia Blanco, Cristina Prat, Jose Domínguez, Carlos Rodrigo and Vicente Ausina.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. Submitted.

Artículo 6

Evaluación de una nueva técnica molecular para la detección simultánea de múltiples virus respiratorios.

Loreto Fuenzalida, Silvia Blanco, Jordi Fabrega, Cristina Prat, Miguel Perez, Jose Dominguez, Carlos Rodrigo and Vicente Ausina.

Scientific technical report, 2009.

ARTICULOS COMPLEMENTARIOS QUE NO FORMAN PARTE DE ESTA TESIS

Anexo

Comparison of 2 molecular assays and a serologic test in diagnosing *Mycoplasma pneumoniae* infection in paediatrics patients.

Blanco S, **Fuenzalida L**, Bas A, Prat C, Ramírez A, Matas L, Rodrigo C, Ausina V.

Diagn Microbiol Infect Dis. 2011 Dec;71(4):463-6. Epub 2011 Oct 15.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) constituyen uno de los síndromes infecciosos más frecuentes del ser humano, representando una importante causa de morbimortalidad en pediatría. Los niños pueden presentar entre seis y ocho infecciones respiratorias al año, muchas de las cuales, sobre todo las que ocurren en lactantes, afectan a las vías respiratorias inferiores [1, 2]. Las infecciones de etiología vírica afectan a niños de todas las edades, si bien predominan por debajo de los cinco años y son especialmente prevalentes en menores de dos años. En este último grupo, estas infecciones suponen una de las causas más frecuentes de hospitalización, originando numerosas consultas médicas tanto a nivel de atención primaria ambulatoria como de los servicios de urgencias hospitalarios.

Diferentes estudios han calculado tasas de hospitalización por infecciones de las vías respiratorias inferiores. Un estudio realizado en Alemania calcula unos costes globales por infecciones de las vías respiratorias inferiores a 213 millones de euros anuales y en Estados Unidos se calcula un coste sólo por hospitalización por bronquiolitis en niños menores de 1 año de 700 millones de dólares anuales [3]. En España, un estudio de la Comunidad Valenciana calculó un coste por hospitalización únicamente debida a infecciones por el virus respiratorio sincitial (VRS) de 3.618.000 euros anuales en dicha comunidad [4]. La elevada tasa de contagio que presentan estos virus provoca verdaderos problemas logísticos para su ubicación en la mayoría de las unidades de hospitalización, con el intento de disminuir la infección nosocomial, sobretodo en las unidades de neonatos.

Numerosos virus tienen capacidad de infectar y replicarse en el epitelio respiratorio; a través de los años, se han ido incorporando diferentes tecnologías para identificarlos [5]. Así, en una primera etapa, entre los años 1960 y 1980, los estudios de etiología vírica de las IRA se realizaron en base al aislamiento en cultivo celular. Este método permitía estudiar pocos pacientes e identificar sólo algunos virus respiratorios, que además debían estar en óptimas condiciones de viabilidad. El descubrimiento de nuevos métodos de producción de anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas permitió, entre los años 1980 y 2000, el desarrollo de métodos rápidos para la detección de antígenos, como la inmunofluorescencia (IF), el enzimoimmunoanálisis (EIA) y la inmunocromatografía (IC). Su versatilidad, especificidad y sencillez permitieron la realización de estudios con gran número de pacientes y la detección de los siete virus más frecuentemente responsables de infecciones respiratorias en niños:

VRS, adenovirus, virus influenza A y B y virus parainfluenza (VPI) 1, 2 y 3, denominados “virus respiratorios clásicos”.

En 1981, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó la utilización de las técnicas rápidas de diagnóstico vírico para estudiar la etiología de la IRA de vías inferiores. Esta recomendación se basó en su efectividad para prevenir la diseminación de las infecciones víricas en los hospitales, promover un empleo más racional de los antibióticos e instaurar medidas precoces de salud pública, según el agente de mayor circulación en el momento del estudio. Prácticamente, todo lo que conocemos sobre IRA hasta hoy procede de los datos aportados por estas técnicas [6].

Más recientemente, el despliegue de la ciencia en el área de la biología molecular y la utilización de sus herramientas en la detección de virus respiratorios permitió identificar agentes que no se habían detectado previamente; el número de virus respiratorios se incrementó con la identificación de metapneumovirus humano (HMPV) [7], rinovirus (RV) [8, 9] y enterovirus [10] estos dos últimos con una diversidad antigénica extraordinaria. Además, nuevos agentes dentro de familias víricas conocidas, como los coronavirus (HCoV) HKU-1,10 NL- 6311 y el agente responsable del síndrome de dificultad respiratoria aguda grave (SARS) HCoV-SARS [11-13], el bocavirus (HBoV) [14] y el reciente virus de la influenza A (H1N1) 2009 [15], causante de la primera pandemia del siglo XXI, se sumaron a la lista de virus respiratorios que deben ser evaluados. Por estudios realizados en muestras de suero conservadas en bancos, sabemos que la circulación de la mayoría de estos agentes en la población general ha venido ocurriendo al menos en los últimos cincuenta años [16]. Por ello, la denominación de “nuevos virus respiratorios” obedece a la reciente disponibilidad de técnicas para su detección y no a que realmente se trate de virus emergentes, con la excepción del HCoV-SARS y el virus influenza A H1N1 (2009). No obstante, si bien es inexacta, dicha terminología ha sido consagrada por la práctica cotidiana y la adoptaremos también en esta tesis.

1.2. CUADROS CLINICOS ASOCIADOS A INFECCIÓN RESPIRATORIA VÍRICA

En este apartado de la tesis se describimos los principales cuadros clínicos asociados a la infección respiratoria vírica. Las manifestaciones clínicas de las infecciones de las vías respiratorias son muy variadas, con un espectro que incluye desde infecciones respiratorias leves que pueden ser atendidas de forma ambulatoria, a formas más

graves que precisan hospitalización de duración variable, incluso en Unidades de Cuidados Intensivos, y que provocan la muerte en un número no despreciable de estos pacientes. A continuación se define brevemente cada cuadro clínico y los principales virus que suelen ocasionar estas patologías. Podemos distinguir dos grupos: infecciones de las vías respiratorias altas e infecciones de las vías respiratorias inferiores.

1.2.1. Infecciones de las vías respiratorias altas

1.2.1.1. Infección respiratoria de vías altas

Las infecciones respiratorias de vías altas producen rinorrea y/o tos sin sibilancias, ni disnea o crepitantes, acompañado o no de fiebre. El grupo de los RV son los agentes causales más frecuentes de las infecciones respiratorias de vías altas, causando en torno al 50% de los episodios (llegando incluso al 80% en los picos epidémicos). Los segundos agentes en frecuencia son los HCoV OC43 y 229E (15-20% de los casos), seguidos por el resto de los virus respiratorios en porcentajes menos importantes.

1.2.1.2. Faringoamigdalitis

Las faringoamigdalitis son de etiología vírica en un importante porcentaje de casos. Es la causa más común de dolor de garganta. La faringitis vírica se sospecha cuando los cultivos de exudado faríngeo y las técnicas de detección de antígeno no revelan una causa bacteriana para los síntomas. Estas enfermedades son extremadamente comunes y pueden ser causadas por diversos virus entre ellos adenovirus, RV y VPI.

1.2.1.3. Laringitis

Produce la obstrucción de la vía aérea superior acompañada de estridor, con o sin fiebre. El VPI1 es responsable de epidemias de laringitis en niños de 2 a 5 años. El VPI2 es numéricamente mucho menos importante en niños, pero también se asocia clínicamente con este cuadro [17]. Aunque estos virus son los más frecuentes, cualquier otro virus respiratorio puede ser detectado en pequeños porcentajes.

1.2.2. Infecciones de vías respiratorias bajas

1.2.2.1. Bronquiolitis

Son infecciones agudas de etiología vírica que afectan a las vías aéreas inferiores y que tras un período catarral cursan fundamentalmente con obstrucción e inflamación de los bronquiolos terminales distales. Clínicamente se caracterizan por ser el primer episodio de taquipnea y disnea espiratoria (respiración sibilante) en los 24 primeros meses de vida a menudo con saturación de O₂ menor a 95% y pulsioximetría e hiperinsuflación en la radiografía de tórax en ausencia de sibilancias [18]. Los síntomas asociados son congestión nasal, tos y fiebre en grado variable seguidos de dificultad respiratoria, aleteo nasal, tiraje y dificultad para la alimentación por vía oral. Solo el 1-2% de las bronquiolitis presentan suficiente gravedad como para requerir ingreso hospitalario. Un porcentaje no despreciable (hasta un 10%) de los lactantes ingresados por bronquiolitis desarrollan apnea. En algunos casos la apnea es una de las primeras manifestaciones de la enfermedad, constituyendo la prematuridad un factor de riesgo. La bronquiolitis es la infección vírica asociada a sibilancias más frecuente en la infancia. El VRS causa aproximadamente el 60-70% de todas ellas, seguido por RV, HBoV, adenovirus y HMPV.

1.2.2.2. Episodios de sibilancias recurrentes

Corresponde a una infección respiratoria con sibilancias, habiendo presentado algún episodio similar previo, en niños menores de 2 años. Estos episodios han recibido distintas denominaciones, como bronquitis disneizante del lactante, bronquitis espástica, bronquitis obstructiva, etc. Actualmente el término más utilizado y aceptado es el de episodio de sibilancias asociado a infección vírica. El término asma del lactante hace referencia a la presencia de al menos 3 episodios de sibilancias y/o tos en un marco clínico en el que el diagnóstico de asma es el más probable y se han excluido otros diagnósticos menos frecuentes [19]. Estos episodios, similares a las bronquiolitis en su presentación clínica, han sido objeto de numerosos estudios longitudinales con respecto a su evolución a largo plazo. La etiología, al igual que en las bronquiolitis, es vírica y los virus implicados son en primer lugar VRS (40%) seguidos muy de cerca por el grupo de los RV (30%), adenovirus, HBoV y HMPV y con menor participación el resto de los virus (gripe, VPI y HCoV) [20, 21].

1.2.2.3. Neumonía

Ocurre cuando hay infiltrado focal con consolidación en la radiografía de tórax en ausencia de sibilancias. La bronquiolitis o episodios de sibilancias recurrentes se acompañan a menudo de infiltrados radiológicos y/o atelectasias que forman parte del propio cuadro clínico vírico. En este apartado hablaremos de las neumonías sin sibilancias. Es sabido que la etiología vírica está presente entre un 30 y un 50% de las neumonías de forma aislada o en coinfección con bacterias, siendo más frecuente la asociación con virus en los niños más pequeños (< 3 años) [22]. Los virus implicados son prácticamente todos los virus respiratorios siendo más frecuentes VRS, adenovirus, RV y HBoV. Sin embargo, el principal problema en las neumonías reside en discriminar entre etiología vírica y bacteriana. Numerosos estudios se han llevado a cabo para intentar despejar este problema sin haberse llegado a unos criterios o parámetros únicos [23].

1.2.2.4. Crisis asmática

Corresponde a episodios de sibilancias espiratorias, acompañadas o no de tos, dificultad respiratoria y/o dolor torácico en un marco clínico en el que el diagnóstico de asma es probable y se han excluido otros diagnósticos menos frecuentes. Las crisis asmáticas pueden acompañarse o no de fiebre. En los últimos años, el empleo de técnicas basadas en la amplificación genómica ha permitido conocer que la proporción de exacerbaciones asmáticas asociadas a virus es mucho mayor de lo que se pensaba, llegando al 63% en la serie de Khetsuriani [24], al 80% en la serie de Johnston [25] o incluso al espectacular 95% en el estudio de Allander et al [21]. Los virus más frecuentemente implicados son el grupo de los RV (50% según las series) seguidos de adenovirus, HBoV [26], VRS y con menor frecuencia otros virus como gripe, VPI y HCoV.

1.3. VIRUS CLÁSICOS

1.3.1. Virus respiratorio sincitial (VRS)

Es un virus que pertenece a género *Pneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae*. El VRS recibe su nombre de su tendencia a formar sincitios en los cultivos de los tejidos.

La morfología de los viriones coincide con la de otros paramyxovirus: son esféricos, filamentosos o pleiomórficos y poseen una envoltura procedente de la membrana plasmática de la célula infectada. En su estructura se distingue una nucleocápside, formada por el RNA genómico, que ha sido completamente secuenciado y está compuesto por 10 genes, cada uno de los cuales codifica una proteína. Ocho de las diez proteínas son estructurales. Las glicoproteínas F (proteína de fusión) y G (proteína de anclaje) son los determinantes antigénicos mayores del virus, contra las que se dirigen los anticuerpos neutralizantes. La proteína G interviene en la adhesión del virus al receptor celular, mientras que la proteína F es la responsable de la penetración vírica y de la formación de sincitios. La proteína hidrofóbica pequeña (SH), la proteína de la matriz (M) y la proteína M2 están relacionadas con la envoltura vírica. Por otro lado, las nucleoproteínas N y L y la fosfoproteína P, están presentes en la nucleocápside. Por último, las proteínas NS1 y NS2 son proteínas no estructurales, que se encuentran en las células infectadas, pero no en los viriones [27] (Figura 1).

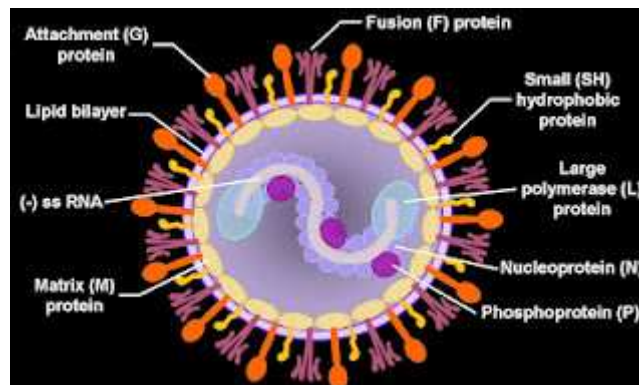


Figura 1. Representación esquemática de la estructura del VRS. De: www.kuleuven.be

Atendiendo a variaciones antigénicas y genéticas los diferentes aislados de VRS pueden diferenciarse en dos grupos denominados VRS-A y VRS-B. Además existe una considerable diversidad antigénica, con diversos linajes dentro de ambos grupos. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que los grupos A y B pueden detectarse en una comunidad durante la misma epidemia, aunque uno de ellos sea el predominante. Se ha observado un patrón característico de alternancia de ambos grupos, con un predominio del grupo A durante dos temporadas consecutivas, seguida por una epidemia anual del grupo B. También se ha descrito la circulación simultánea de varios genotipos. Los más frecuentes son el GA5 del grupo A y el GB13 del grupo

B. Aunque ha sido motivo de controversia durante años, parece que no existen diferencias significativas en cuanto a gravedad entre los distintos grupos y/o genotipos del VRS [28].

La distribución mensual de las infecciones por ambos grupos es similar, produciendo brotes epidémicos entre noviembre y abril en el hemisferio norte cada año. En España alcanzan su máxima frecuencia en diciembre y enero. En los países tropicales las epidemias tienen lugar en la época de las lluvias.

Manifestaciones clínicas

El VRS es la principal causa de IRA baja en niños de corta edad. En los países de nuestro entorno, en los que la epidemiología de este virus es relativamente homogénea, el VRS es el responsable del 42-45% de las hospitalizaciones por esta causa en niños menores de 2 años. En estos pacientes, particularmente en neonatos, con los pulmones aún inmaduros, el riesgo de bronquiolitis o neumonía asociados a la primoinfección con VRS es elevado. Los ancianos y adultos inmunodeprimidos [29] también se reconocen como pacientes en los que se observan complicaciones debidas a infección por VRS, en muchas ocasiones de adquisición nosocomial. Estudios serológicos demuestran que casi todos los niños han estado expuestos a VRS durante los primeros 3 años de vida [30]. Sin embargo, las reinfecciones son relativamente frecuente, incluso en una misma temporada, dado que la inmunidad frente a este virus no es totalmente eficaz. Las infecciones repetidas a partir de los 2 años de edad suelen tener un curso más benigno, manifestándose en la mayor parte de las ocasiones como una enfermedad de las vías respiratorias altas o como traqueobronquitis.

La bronquiolitis es sin duda la manifestación más conocida de la infección por VRS debido a su enorme impacto en los lactantes. Se estima que la tasa de hospitalización por bronquiolitis asociada a VRS en Europa, ronda los 30/1.000 niños menores de un año, con una tasa de mortalidad de 2 por cada 100.000 nacidos vivos [31]. En general, tras un breve periodo prodrómico con síntomas respiratorios de vías altas, aparecen bruscamente sibilancias, disnea, dificultad respiratoria, taquipnea y evidencia radiológica de hiperinsuflación pulmonar. En la mayoría de los casos, los síntomas se resuelven en menos de una semana, aunque los niños más pequeños pueden precisar hospitalización de duración variable. En algunas series más de la mitad de los niños con bronquiolitis por VRS presentan simultáneamente otitis media aguda [32].

Especial mención merece la asociación epidemiológica entre bronquiolitis vírica y el desarrollo posterior de sibilancias recurrentes y/o asma. Esta posible relación ha sido postulada fundamentalmente para el VRS. Sin embargo, aunque se han publicado numerosos estudios relacionando las infecciones por VRS y el desarrollo posterior de asma, la metodología empleada es tan diversa que es muy difícil extraer conclusiones claras. A pesar de todo, hay dos estudios prospectivos clásicos, que han podido documentar que el antecedente de bronquiolitis por VRS es un factor de riesgo indiscutible para el desarrollo de sibilancias recurrentes y asma diagnosticado por un médico [33, 34]. Se han propuesto dos posibles explicaciones para esta asociación. La primera de ellas es que el VRS afecta de alguna manera los sistemas respiratorio e inmunológico inmaduros del lactante, predisponiéndole a infecciones respiratorias recurrentes con secuelas pulmonares e inmunológicas. La segunda hipótesis es que algunos lactantes podrían tener una función pulmonar previamente disminuida o bien, una susceptibilidad genética o inmunológica para el desarrollo de síntomas respiratorios recurrentes. Es posible que el verdadero mecanismo sea una combinación de ambas teorías [35].

1.3.2. Virus parainfluenza (VPI)

Los VPI son virus con genoma RNA no segmentado, que pertenecen a los géneros *Paramyxovirus* (VPI tipo 1 y tipo 3) y *Rubulavirus* (VPI tipos 2 y 4) de la familia *Paramyxoviridae*. La cubierta vírica contiene dos glicoproteínas: la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y las proteínas de fusión (F), contra las que se dirige fundamentalmente la respuesta inmune. Las proteínas HN son responsable de la adhesión del virus a la célula diana, mientras que la proteína F favorece la fusión entre la cubierta del virus y la membrana celular [36]. En cuanto al resto de proteínas, también se reconocen en los virus parainfluenza las tres proteínas que forman el complejo de la nucleocápside (N, P y L), y la proteína matriz M. El número de proteínas no estructurales es variable dependiendo del tipo de VPI, pero codifican al menos una proteína de este tipo.

Se han identificado 4 tipos serológicos: VPI 1 a 4 (con dos subtipos 4A y 4B), aunque VPI 1 y 3 por un lado, y VPI 2 y 4 por otro, están genéticamente más relacionados entre sí que con el resto de los VPI.

Los patrones estacionales de los VPI son bien conocidos. Los VPI 1 tienden a producir epidemias muy definidas, en los otoños de años alternos. Los brotes de infecciones

por VPI 2, aunque más erráticos, suelen ocurrir en los meses de invierno, después de las infecciones por el tipo 1. Las infecciones por el VPI 3 son las más frecuentes, suelen aparecer anualmente y se detectan durante todo el año con un cierto predominio en los meses de primavera y verano. La circulación del VPI 4, debido a las dificultades que plantea su diagnóstico, está menos caracterizada, aunque diciembre y enero suelen ser los meses en los que se detecta con más frecuencia [37-39].

Manifestaciones clínicas

El espectro de cuadros respiratorios en los que están implicados los VPI es muy similar a aquellos descritos para VRS. Sin embargo, el número de pacientes que requieren hospitalización es significativamente menor. VPI-3 infecta más frecuentemente a niños menores de 2 años de edad, en la mayoría de los casos ocasionando cuadros respiratorios de vías altas, no obstante, otras manifestaciones que pueden observarse en pacientes de hasta seis meses de edad son bronquiolitis y neumonía, aunque con menor frecuencia que aquellas debidas a infección por VRS. Las técnicas de diagnóstico molecular, cada vez más utilizadas en los laboratorios de microbiología clínica, también están concediendo a VPI-4, un virus difícilmente cultivable [40], un papel más destacado en las infecciones de vías respiratorias bajas de niños menores de dos años de edad, tanto por la frecuencia como por la gravedad de las mismas. En niños mayores, con una edad comprendida entre 2 y 6 años, la laringotraqueobronquitis aguda es la manifestación más característica de la infección por virus parainfluenza, particularmente VPI-1. Las manifestaciones clínicas observadas en niños mayores de seis años y adultos se limitan exclusivamente a las vías altas. En ancianos las infecciones respiratorias por VPI son bastante menos graves que las causadas por VRS o los virus de la gripe.

Dado que las infecciones por VPI no confieren inmunidad completa, son frecuentes las reinfecciones a lo largo de toda la vida. Estas reinfecciones, que suelen ser leves, son la fuente principal de infecciones graves en lactantes y en pacientes con patología subyacente [40].

1.3.3. Virus influenza o virus de la gripe

Los virus influenza, o virus de la gripe, son virus RNA, de simetría helicoidal con envoltura, pleiomórficos, pertenecientes a la familia *Orthomyxoviridae*. Estos virus se clasifican en tres tipos diferentes, A, B y C. Los del tipo A afectan a gran variedad de

aves y mamíferos, entre ellos el ser humano. En contraste, sólo hay un subtipo conocido de influenza B, que principalmente afecta a humanos, por lo que el potencial pandémico del virus de influenza B es muy bajo, a pesar de que puede causar enfermedades respiratorias severas. Los virus de influenza C causan enfermedad respiratoria leve en los seres humanos y algunos animales y ha sido el tipo menos estudiado [41]. El virus presenta una envoltura lipídica de donde sobresalen las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), que contienen los principales determinantes antigénicos (Figura 2). Una tercera proteína de membrana, la proteína matriz M2, forma el canal iónico transmembrana. Este conjunto o envoltura vírica está recubierto por dentro por una capa formada por la proteína matriz M1, que encierra las ribonucleoproteínas que contienen el genoma vírico y el complejo de la polimerasa (PB1, PB2 y PA) y que están estructuradas por la nucleoproteína (NP).

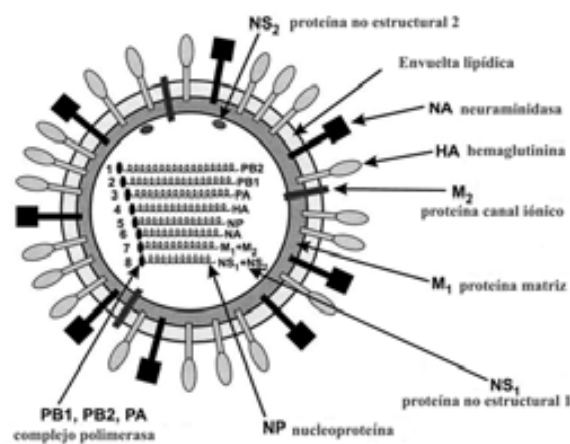


Figura 2. Representación esquemática de la estructura del virus de la gripe. De: M.T. Cuevas et al. Gripe pandémica H1N1 (2009) experiencia de la red de laboratorios de gripe del sistema de vigilancia de la gripe en España (SVGE). *Rev Esp Salud Pública* 2010; 84: 481-495.

Los virus de la gripe evolucionan constantemente utilizando diferentes mecanismos. La falta de capacidad correctora de la polimerasa vírica ocasiona gran número de mutaciones puntuales durante la replicación del genoma, lo que da lugar al fenómeno de deriva antigénica (*antigenic drift*). La alta tasa de mutación a la que están sometidas las proteínas HA y NA obliga cada año a revisar los virus que forman parte de las vacunas. Esto le permite evadir el sistema inmune del huésped y convierte a todas las personas en susceptibles a estas infecciones durante toda la vida.

Otros mecanismos de evolución, que sólo ocurre en el tipo A, se deben al hecho de poseer un genoma segmentado que facilita el intercambio genético o la recombinación

genética, originando el llamado salto antigénico (*antigenic shift*). Hasta ahora se han descrito 16 subtipos de HA (H1-H16) y 9 subtipos de NA (N1-N9). La plasticidad de estos virus, que les permite incorporar pequeños y grandes cambios, es la base de su evolución constante y de su naturaleza de agente zoonótico con capacidad para adaptarse a nuevos hospedadores y llegar a adquirir capacidades pandémicas para el ser humano. Este tema siempre ha preocupado a los expertos y a las autoridades sanitarias, máxime a raíz de los casos humanos por gripe aviar detectados en los últimos años.

Desde el punto de vista de la salud pública su importancia reside tanto en la elevada mortalidad que origina en las poblaciones, como en la mortalidad que puede ocasionar, tanto de forma directa como por agravamiento de otras enfermedades de base, sobre todo de naturaleza crónica cardiorespiratoria en grupos denominados de riesgo. Por último, origina importantes costes sociales y sanitarios, derivados del absentismo laboral que provoca y merced a los gastos que ocasiona su asistencia.

La variación antigénica y el consiguiente ambiente epidemiológico creado sigue un patrón uniforme que hace que cada nueva variante reemplace a la anterior, de manera que la cocirculación de diferentes subtipos al mismo tiempo sólo ocurre en cortos períodos de tiempo. Las características virológicas comentadas convierten a los virus influenza en únicos en cuanto a su capacidad para producir epidemias anuales recurrentes y pandemias que pueden afectar a todos los grupos de edad. El tamaño de la epidemia o pandemia y su impacto relativo, será consecuencia de la interrelación entre la variación antigénica del virus, el estado inmunitario protector de la población y la virulencia del virus.

Históricamente, la aparición de nuevos subtipos del virus de la influenza en la población humana se ha asociado a epidemias en todo el mundo (o pandemias). En los últimos 100 años (Figura 3), el ejemplo más devastador de un nuevo subtipo de virus emergente en la población humana fue el virus de la gripe de 1918. Este virus H1N1 se estima que ha sido responsable de 50 a 100 millones de muertes en un período muy corto de tiempo. Variantes de la gripe H1N1 circularon durante 39 años antes de ser reemplazados por un virus H2N2 en 1957. El virus H2N2 fue predominante durante sólo 11 años, hasta 1968, cuando fue reemplazado por el virus H3N2. Curiosamente, en 1977, un virus H1N1 reapareció y coincidió con el virus estacional H3N2 hasta el año 2009. En abril de 2009, un nuevo virus pandémico H1N1 emergió en México y procedió a difundir en todo el mundo, convirtiéndose en la

primera pandemia del siglo XXI. El virus de la influenza A (H1N1) 2009 por ser un virus emergente de gran relevancia, será expuesto en el apartado correspondiente. Además, una vez conocida la existencia de este nuevo virus, nuestro grupo realizó la evaluación de técnicas de detección de dicho virus, estudios que son incluidos en esta Tesis.

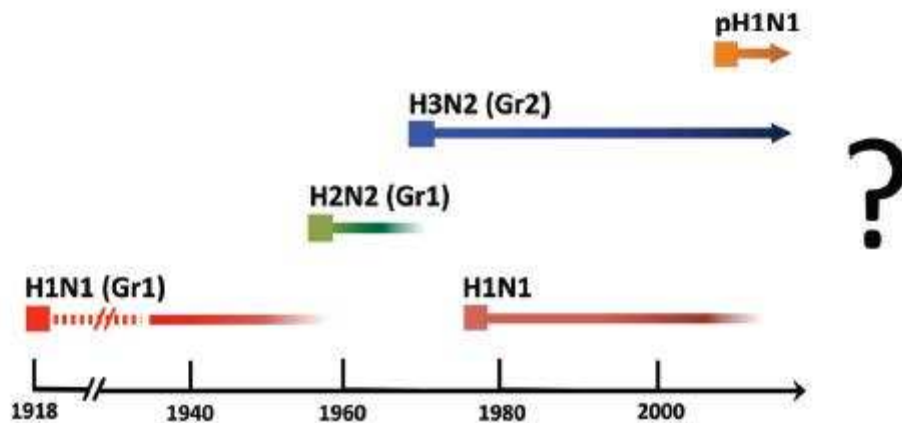


Figura 3. Virus influenza A que han circulado en la población humana en los últimos años. De: Palese P and Wang TT. Why do influenza virus subtypes die out? A hypothesis. *MBio*. 2011 Aug 30;2(5).

El reservorio fundamental de todos los subtipos de virus influenza A conocidos son las aves acuáticas y la capacidad de estos virus para saltar la barrera de las especies es lo que hace que esta enfermedad no pueda considerarse como erradicable. El virus influenza B por el contrario, no tiene el potencial para producir pandemias porque no hay un reservorio animal del virus [42]. Una sola persona infectada puede transmitir el virus a un gran número de individuos susceptibles y extender rápidamente la infección, ya que el período de incubación es corto, de 1 a 4 días.

La duración media de las epidemias en invierno suele ser de unos dos meses y durante las mismas, las tasas de ataque en los niños son más elevadas que en ningún otro grupo de edad, pudiendo superar el 40% en los de edad escolar. El corto ciclo de replicación y la prolongada excreción del virus en los niños pequeños hacen que los escolares infectados jueguen un papel fundamental en la introducción del virus en sus hogares. Sin embargo, con la creciente asistencia a guarderías, los lactantes y niños preescolares pueden convertirse en una fuente aún más importante de transmisión del virus en la comunidad. En este sentido, hay evidencias suficientes para afirmar que la vacunación antigripal es eficaz en interrumpir la transmisión familiar y comunitaria del

virus de la gripe [43]. También han sido publicados brotes de infección por influenza A en unidades de cuidados intensivos neonatales [44].

Manifestaciones clínicas

La presentación clínica de la gripe en niños pequeños es bastante inespecífica, acompañándose de fiebre con mayor frecuencia que otras infecciones víricas y siendo éste a veces el único síntoma, sobre todo en lactantes menores de 6 meses, en los que puede simular una sepsis bacteriana. Otros síntomas habituales en niños pequeños son tos no productiva, rinitis y malestar general, pudiendo asociarse irritabilidad, rechazo del alimento, vómitos, letargia, dificultad respiratoria y apneas.

También puede presentarse como una infección respiratoria de vías altas afebril en los menores de 2 años de edad con tos, bronquitis o bronquiolitis (indistinguibles del cuadro clínico ocasionado por el virus respiratorio sincitial o los VPI) y en otras ocasiones, puede debutar como una convulsión febril. Todos estos síntomas son inespecíficos y pueden ser atribuidos a otras enfermedades si no se realiza un diagnóstico definitivo de infección por virus influenza, lo que a menudo infraestima la importancia de la gripe en los lactantes [45]. La infección por virus influenza en adultos y adolescentes se presenta habitualmente con un inicio brusco de fiebre elevada y escalofríos, cefalea, mialgias, odinofagia, tos seca y malestar general. La fiebre puede durar de 1 a 5 días.

Las complicaciones de las infecciones por virus influenza incluyen la otitis media aguda, que se puede observar en un 25% de los casos, la agudización de la patología de base del niño, como es el caso del asma, de la displasia broncopulmonar o de la fibrosis quística. También es frecuente la neumonía vírica o bacteriana secundaria, siendo *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus* los gérmenes más frecuentemente identificados [46-48]. Otras complicaciones menos frecuentes son la encefalitis, el síndrome de Reye, el síndrome de Guillain-Barré, la mielitis transversa y la miositis, entre otras.

1.3.4. Adenovirus

Los adenovirus fueron aislados por primera vez en 1953 por Rowe y colaboradores [49], quienes observaron una degeneración de tejidos adenoides extirpados quirúrgicamente y mantenidos en medio de cultivo varias semanas. En los siguientes

años se consiguieron aislar diferentes serotipos de adenovirus procedentes de este tipo de tejidos y además de secreciones pulmonares de adultos jóvenes con cuadros respiratorios y secreciones oculares en casos de conjuntivitis.

Taxonómicamente se clasificaron en la familia *Adenoviridae*, que incluye dos géneros: *Mastadenovirus* y *Aviadenovirus*, agrupando el primero a los virus causantes de infecciones en mamíferos, y el segundo, a aquellos que causan infección en aves. Se han descrito 51 serotipos distintos en humanos, agrupados en seis subgéneros (de A a F). Recientemente, estudios de epidemiología molecular han permitido clasificar muchos de estos serotipos en distintos genotipos, designados como a, b, c, etc. Estos virus poseen DNA como material genético, protegido por una nucleocápside formada por 252 subunidades llamadas capsómeros. De éstos parten unas prolongaciones o fibras, en cuyo extremo se sitúan las glicoproteínas responsables de la adhesión a las células endoteliales de los tejidos [50]. La diferente composición genética de estas fibras tiene un importante papel en el tropismo de los adenovirus por los distintos tejidos (Figura 4).

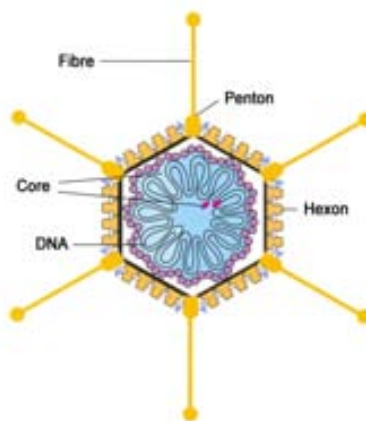


Figura 4. Representación esquemática de la estructura del adenovirus. De: www.biomarker.korea.ac.kr

Las infecciones pueden ser endémicas a lo largo de todo el año o aparecer en forma de epidemias. Las epidemias de infección respiratoria por adenovirus son frecuentes durante el invierno, la primavera y el comienzo del verano. Suelen ser prolongadas, con una duración de 1 a 3 años, a diferencia de las epidemias por otros virus respiratorios que suelen estar bien definidas en el tiempo y tener una duración de varios meses [51].

Manifestaciones clínicas

Los adenovirus humanos están asociados a un amplio rango de cuadros clínicos y crece su protagonismo como agentes causales en casos de neumonía grave, cistitis hemorrágicas, hepatitis o infección diseminada grave en pacientes inmunodeprimidos. Las IRA causadas por adenovirus podemos encontrarlas en todo el mundo, pudiendo ser un sólo serotipo el causante de cuadros clínicos diferentes y viceversa, varios serotipos pueden estar asociados a la misma enfermedad. Se presentan en brotes epidémicos y en casos esporádicos. En la Tabla 1 se presentan las patologías respiratorias más frecuentes relacionadas con los serotipos habitualmente relacionados con dichas patologías y el grupo de edad más afectado.

Tabla 1. Cuadros respiratorios asociados con los adenovirus categorizados en función de los serotipos implicados y del grupo afectado.

| Enfermedad | Serotipo | Grupo afectado |
|---|-----------------|--------------------------------|
| Infección diseminada fatal | 3, 7, 21, 30 | Neonatos |
| Coriza, faringitis | 1, 2, 5 | Lactantes y escolares |
| Infección respiratoria de vías altas | 1, 2, 5 | Niños |
| Fiebre y faringoconjuntivitis | 3, 7 | Niños |
| Infección respiratoria aguda o neumonía | 3, 4, 7 | Adolescentes y adultos jóvenes |
| Queratoconjuntivitis | 8, 19, 37 | Adultos |
| Neumonía con diseminación | 35, 39 | Pacientes inmunodeprimidos |

De: Inmaculada Casas Flecha et al. 2008. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por virus respiratorios. En: Emilia Cercenado y Rafael Cantón (Eds.). Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Segunda edición. Pág: 2-22.

La infección primaria suele ocurrir en los primeros años de la vida y la mayoría de la población ha sido infectada por uno o más serotipos de adenovirus al final de la primera década. La incidencia de infección es máxima entre los 6 meses y los 5 años de edad. Los niños menores de 6 meses suelen estar protegidos por los anticuerpos maternos.

1.3.5. Coronavirus humano (HCoV)

Los coronavirus (género *Coronavirus*, familia *Coronaviridae*) son un grupo de virus envueltos, redondeados o pleomórficos. La envoltura presenta unas espículas características que constituyen uno de los elementos distintivos de la morfología del virión cuando se observan al microscopio electrónico, con aspecto de corona, de donde reciben su nombre (Figura 5).

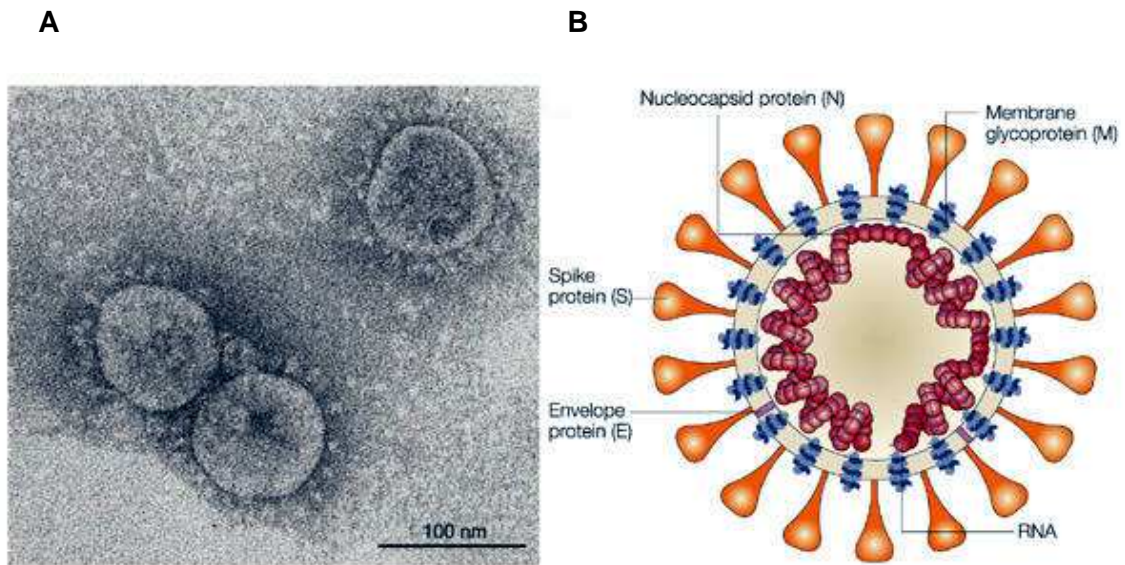


Figura 5. A) Micrografía electrónica con tinción negativa de coronavirus y B) Representación esquemática de la estructura del coronavirus. De: www.vetmed.vt

Además de la proteína de la espícula (S) responsable de la unión con el receptor celular y de la fusión de las membranas vírica y celular, en la envoltura de todos los coronavirus pueden distinguirse al menos dos proteínas más, denominadas M y E. En el interior del virión, la nucleocápside, con simetría helicoidal, está constituida por la proteína N formando un complejo con una única molécula de RNA de polaridad positiva. El genoma completo posee un tamaño próximo a 30.000 nucleótidos, lo que supone el genoma más grande de los virus RNA conocidos.

Los coronavirus son un grupo muy heterogéneo de virus que pueden infectar un número muy diverso de mamíferos, entre los que se encuentra el ser humano y también las aves. Se pueden diferenciar tres grupos de coronavirus atendiendo a las propiedades genéticas y antigénicas. Así, los grupos 1 y 2 están constituidos por coronavirus que infectan mamíferos, en tanto que el grupo 3 sólo está integrado por coronavirus de aves.

Desde mediados de los años sesenta del pasado siglo los HCoV, HCoV-229E y HCoV-OC43, se han asociado exclusivamente con el resfriado común y por tanto se consideraban patógenos respiratorios relativamente benignos. Sin embargo, esta concepción cambió drásticamente en abril de 2003, fecha en la que se identificó un nuevo HCoV como responsable del síndrome respiratorio agudo grave (HCoV-SARS). En sólo ocho meses se identificaron 8.096 casos confirmados de infección por HCoV-SARS en 26 países diferentes, observándose un total de 774 muertes (http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/index.html). Aunque el HCoV-SARS no circula actualmente entre seres humanos, la elevada morbilidad y mortalidad asociada con el brote de SARS ha reavivado el interés por esta familia de virus y ha permitido la identificación reciente de otros dos nuevos HCoV asociados con patología respiratoria en seres humanos. El HCoV-NL63, incluido en el grupo 1 de los HCoV y junto con HCoV-229E, fue aislado por primera vez a partir del aspirado nasofaríngeo (NPA) de un niño con bronquiolitis en Holanda. El HCoV-HKU1, perteneciente al grupo 2 junto con HCoV-OC43, fue identificado en muestras de NPA obtenidas de un adulto con una enfermedad pulmonar crónica en Hong Kong. Desde su descubrimiento, ambos virus se han asociado con casos de infección respiratoria en diferentes países, evidenciando una distribución universal de los mismos. Dependiendo de las series publicadas, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1 se detectan en el 1-10% de los pacientes con infección respiratoria aguda, siendo relativamente común la codetección junto con otros virus respiratorios. Los síntomas respiratorios asociados con la infección por cualquiera de estos dos nuevos HCoV son similares a los que ocasionan la infección por HCoV-NL63 y HCoV-HKU1, es decir, benignos en líneas generales, pero pueden presentarse complicaciones en pacientes ancianos o con patología respiratoria subyacente así como en niños de corta edad.

Los HCoV OC43 y 229E constituyen los agentes del resfriado común. Se ha descrito que su período de incubación es de 2 a 5 días y por lo general los síntomas desaparecen a la semana. Suelen asociarse con infecciones de vías respiratorias altas, con intensa rinorrea, aunque ocasionalmente se han asociado con neumonías en el recién nacido, en el niño mayor y en inmunodeprimidos.

La prevalencia y la morbilidad de las infecciones por HCoV-NL63 y HCoV-NKU1 no están bien caracterizadas. Probablemente, en pacientes sanos se asocian con infecciones respiratorias leves, de una forma similar a los HCoV clásicos. Sin embargo, en niños, ancianos e inmunodeprimidos, pueden causar cuadros clínicos graves e incluso mortales. Según datos preliminares, los niños menores de 12 meses

y los que tienen enfermedades crónicas, son los de mayor riesgo de infecciones severas por HCoV-NL63. El posible papel protector de los anticuerpos maternos no está totalmente aclarado, ya que se han detectado infecciones graves por este virus en niños menores de 2 meses.

Manifestaciones clínicas

En los niños hospitalizados por infección por HCoV-NL63, predomina el diagnóstico de bronquiolitis. En cambio, en un estudio prospectivo, llevado a cabo en Alemania, el 45% de los niños infectados por HCoV-NL63, no hospitalizados, presentaban laringotraqueobronquitis, observándose en ellos un riesgo 6,6 veces mayor de laringotraqueobronquitis que en el grupo control [52]. En este estudio, HCoV-NL63 fue incluso más frecuente que el virus parainfluenza en la etiología del crup. También se ha detectado HCoV-NL63 en niños con infecciones respiratorias de vías altas.

Con respecto a las infecciones por HCoV-HKU1, los primeros casos descritos en la literatura correspondían a ancianos con enfermedades cardiovasculares o pulmonares subyacentes, con alta mortalidad. En la mayoría de las series pediátricas una proporción importante de pacientes también tenían patología de base. Los síntomas respiratorios asociados con este virus incluyen rinitis, tos, fiebre y sibilancias. Los diagnósticos en los niños ingresados suelen ser infección respiratoria de vías altas, bronquiolitis, neumonía y crisis asmática, aunque algunos autores, que han detectado el virus en heces de niños con síntomas respiratorios y entéricos, sugieren que HCoV-NKU1 también se asocia con síntomas gastrointestinales. Un gran estudio llevado a cabo en Hong Kong ha demostrado una clara asociación entre infección por HCoV-NKU1 y convulsiones febriles.

1.3.6. Rinovirus (RV)

Los RV humanos constituyen un género incluido en una gran familia denominada *Picornaviridae*, en la que también están incluidos los enterovirus, hepatovirus, kobovirus y parechovirus, con capacidad para infectar al hombre. Tradicionalmente los RV se han diferenciado de los enterovirus, con los que guardan gran parecido, por su capacidad para resistir medios ácidos.

La familia de los picornavirus es la fuente más común de infecciones víricas humanas [53]. Denominados picornavirus por su pequeño tamaño (aproximadamente 30 nm) y

por su genoma ARN, están compuestos simplemente por una cápside y una única cadena de ARN. La cápside contiene 4 proteínas dispuestas en 60 unidades protoméricas, formando un icosaedro (Figura 6). La alta incidencia de la infección por RV está relacionada con la existencia de un gran número de serotipos, ya que se considera que este género está compuesto por más de 100 serotipos diferentes [54] que se agrupan en 2 especies definidas antigénicamente: HRV-A y HRV-B constituidas por 74 y 25 serotipos diferentes, respectivamente. El serotipo HRV87 ha sido genéticamente relacionado y clasificado como enterovirus. El conocimiento actual acerca del posible papel patogénico de los distintos serotipos es muy escaso.

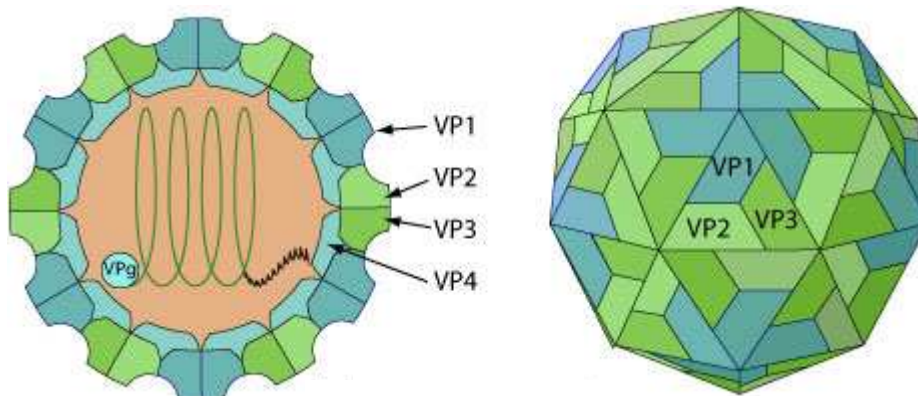


Figura 6. Representación esquemática de la estructura del rinovirus. De: © 2008 Swiss Institute of Bioinformatic.

Los RV, aproximadamente, son la causa de un tercio a la mitad de todas las infecciones agudas del tracto respiratorio. Las infecciones por RV son muy frecuentes en todo el mundo. Son más comunes en climas templados y durante los meses más fríos del año. La enorme diversidad genética de los distintos serotipos hace muy complejo el estudio de la epidemiología molecular de este virus.

Manifestaciones clínicas

Tras su identificación en cultivo celular en los años cincuenta, numerosos estudios han relacionado a los RV con el catarro común en niños mayores y adultos. El impacto real asociado a las infecciones por RV ha sido infraestimado, porque se pensaba que en personas sanas únicamente producía infecciones leves y autolimitadas. Sin embargo, desde los años noventa, gracias a la introducción de la PCR en el diagnóstico de las infecciones respiratorias, está cambiando la imagen previa del RV como virus con poca relevancia clínica. Parece por el contrario, que el RV es un virus frecuente que

puede infectar la vía aérea inferior de personas sanas, sin patología subyacente como asma o fibrosis quística.

Está claramente establecido que los RV son, en niños mayores y adultos, la causa más frecuente de catarro común, y ocasionan un cuadro clínico indistinguible del causado por otros virus respiratorios. La mayoría de los pacientes con una infección respiratoria de vías altas por RV muestran alteraciones radiológicas en los senos paranasales, que suelen resolverse sin antibióticos en unas semanas en la mayoría de los casos. Sin embargo, un porcentaje de estos pacientes termina desarrollando rinosinusitis bacterianas [55].

La otitis media es la complicación más frecuente de las infecciones por RV en los niños. Más del 40% de las nasofaringitis por RV se asocian con otitis en niños pequeños. Incluso se ha detectado RNA de RV en la secreción ótica procedente de niños sin RV en el NPA [56]. En los últimos años se han publicado varios estudios que relacionan al RV con infecciones de vías aéreas inferiores, bronquiolitis, neumonías y exacerbaciones de asma en lactantes y niños pequeños [57, 58]. Un estudio realizado en España en niños ingresados por infección respiratoria [59], indica que las manifestaciones clínicas asociadas con este virus son similares a las del VRS, siendo los diagnósticos más frecuentes episodios recurrentes de sibilancias y bronquiolitis.

1.4. VIRUS EMERGENTES

1.4.1. Metapneumovirus humano (HMPV)

El HMPV fue aislado en el año 2001 de secreciones respiratorias pertenecientes a niños holandeses con enfermedad del tracto respiratorio [7]. Este estudio logró demostrar la presencia del virus en muestras respiratorias congeladas desde el año 1958. El HMPV es un virus RNA envuelto que pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, género *Pneumovirus*, cuyo único representante hasta su descubrimiento era el metapneumovirus aviar, conocido como el virus de la rinotraqueitis del pavo.

Presenta varias semejanzas con el VRS, tanto desde el punto de vista clínico como estructural. El análisis filogenético de los genes de fusión (F) y adhesión (G) (Figura 7) revela que existen por lo menos dos grupos mayores de HMPV (A y B) cada uno de los cuales se subdivide en subtipos A1, A2, B1 y B2 [7, 60].

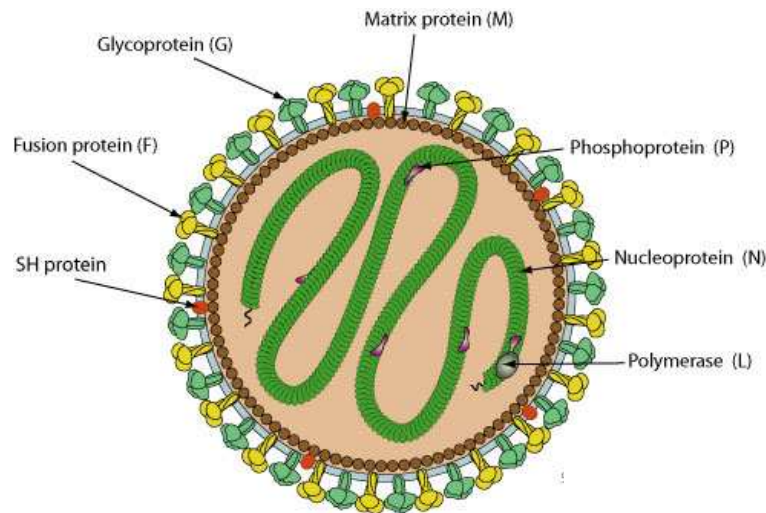


Figura 7. Micrografía electrónica con tinción negativa de metapneumovirus humano. De: © Viral Zone 2011 Swiss Institute of Bioinformatics.

Sin embargo, se necesitan nuevas investigaciones para determinar si estos genotipos representan diferentes grupos antigénicos. La identidad de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos entre los miembros de los dos grupos de HMPV es del 80% y 90% respectivamente, localizándose la mayor variabilidad en los genes G y SH.

A pesar de que se conoce la existencia del HMPV desde hace tan sólo unos años, se ha demostrado que no es un virus nuevo, sino que ha circulado durante décadas, como lo demuestra el hallazgo de una seroprevalencia del 100% en 72 muestras de suero obtenidas en el año 1958. Varias razones pueden explicar el hecho de que, a pesar de ello, no haya sido identificado hasta ahora. Por un lado, el virus tiene un crecimiento muy lento y escaso en las líneas estándar de cultivos celulares; por otro, requiere tripsina para su propagación *in vitro* y este reactante no suele ser añadido a los medios de cultivo habituales. Metapneumovirus tiene una distribución mundial, se ha detectado en África, América del Norte, América Latina, Asia, Europa y Oceanía. Circula con una mayor frecuencia en invierno y primavera. En general, HMPV se asocia etiológicamente a cuadros de infección respiratoria aguda no sólo en niños sino que también en ancianos y en pacientes inmunodeprimidos, presentándose en todos los continentes. Es responsable de un 4-12% de los cuadros respiratorios en los que no se detectan VRS, ADV, influenza ni PIV. Se detecta con mayor frecuencia en lactantes, y la positividad de los anticuerpos aumenta en forma proporcional a la edad. A los 5 años, el 100% de la población tiene serología positiva para HMPV. La inmunidad que genera es tipoespecífica, por lo que puede haber reinfecciones a lo

largo de la vida. Las reinfecciones suelen estar limitadas al tracto respiratorio superior en caso de niños sanos [61, 62]. Rara vez es detectado en pacientes sanos [63].

Manifestaciones clínicas

En general, los niños infectados por HMPV presentan un cuadro clínico semejante a la infección respiratoria del tracto inferior asociada al VRS. Puede causar desde una infección de severidad media hasta tos severa, bronquiolitis y neumonía, frecuentemente con fiebre alta, mialgia y vómitos. Los signos clínicos y síntomas de una infección por HMPV coinciden con las presentadas por otros virus respiratorios. Sin embargo, se ha reportado que los pacientes infectados por HMPV tienen fiebre más frecuentemente, mientras que pacientes infectados por VRS presentan más a menudo rinorrea [64]. Se asocia a otros virus como ADV, VRS, influenza y a *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella pertussis* y *Stenotrophomas maltophilia*. La asociación con VRS parece ser un factor de riesgo de gravedad, como se ha sugerido en algunas series. Muchos de los pacientes son hospitalizados y requieren ventilación asistida. Tiene una evolución de mayor gravedad en inmunodeprimidos, ancianos y recién nacidos, sin embargo se han descrito casos graves en pacientes sin antecedentes patológicos [65].

La asociación entre infección por HMPV y asma aún no ha sido firmemente establecida. Un estudio australiano realizado en niños con asma no encontró asociación entre HMPV y exacerbación del asma [66], mientras que otro estudio realizado en el mismo tipo de población encontró una asociación entre HMPV y el diagnóstico de asma aguda [61]. Sin embargo, un estudio retrospectivo realizado en España, encontró una fuerte asociación entre la infección por HMPV en la infancia y el diagnóstico posterior de asma [67]. Un reto importante para el estudio de los virus respiratorios y el asma es la dificultad para establecer firmemente el diagnóstico de asma durante la infancia, donde es común asociar infección vírica con sibilancias agudas. Sin embargo, los datos disponibles y la analogía con VRS sugieren que existe una asociación entre HMPV y la exacerbación asmática.

1.4.2. Bocavirus humano (HBoV)

El bocavirus humano (HBoV) fue descubierto el año 2005 por investigadores de la Universidad de Karolinska, Suecia, a partir de muestras respiratorias obtenidas de niños con infección del tracto respiratorio [14]. La técnica empleada para identificar

este nuevo patógeno estaba basada en la amplificación no específica de secuencias genómicas víricas que representa un poderoso método para identificar virus previamente no conocidos.

Es un virus DNA, que pertenece a la familia *Parvovirinae*, género *Bocavirus* (Figura 8). A este género pertenecen el bocavirus bovino y el virus canino diminuto. Su nombre deriva de la unión de las dos primeras letras de estos virus. Junto a parvovirus B19, género *Erythrovirus*, son los únicos virus de esta familia, que se asocian a enfermedad en humanos.

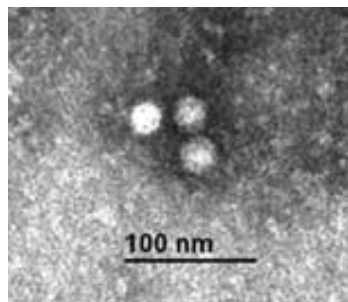


Figura 8. Micrografía electrónica con tinción negativa de bocavirus humano. De: Tina Uršič et al. Human bocavirus as the cause of a life-threatening infection. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49 (3): 1179-1181.

Hasta el momento, se han descrito 4 tipos de HBoV. El tipo 1 (HBoV1) se encuentra asociado a infección de tracto respiratorio, mientras que los tipos 2-4 son frecuentemente encontrados en heces [68-70] y excepcionalmente en muestras del tracto respiratorio [71, 72]. El HBoV1 presenta una escasa variación genética, lo que sugiere un linaje único, con dos genotipos ST1 y ST2, que pueden cocircular.

Parece, a la luz de los primeros estudios, que HBoV1 circula con un predominio claro en los meses de otoño y comienzos del invierno y que, son los niños de entre 6 meses y 2 años, los de mayor riesgo de sufrir infecciones por este virus [14, 73].

El HBoV1 ha sido encontrado en todo el mundo, principalmente en muestras respiratorias de los niños [73-75]. Sin embargo, también se ha detectado en el suero, heces y orinas [21, 76] lo que sugiere que HBoV1 puede causar una infección sistémica, como la mayoría de los parvovirus [21, 77]. El HBoV1 se detecta con frecuencia en niños menores de 2 años de edad con enfermedad de las vías respiratorias superiores o inferiores, a menudo en combinación con otros virus respiratorios [14, 42, 76]. De hecho, se ha detectado HBoV1 concurrente con otros

patógenos potenciales en el 33 -56% de los casos en que se estudiaron [73, 75, 78] y, a menudo, se pueden encontrar también en niños asintomáticos [79-81]. Por estos motivos existen dudas acerca de si HBoV1 juega un papel patogénico en estos procesos o si actúa, más bien, como un mero espectador.

Manifestaciones clínicas

Los dos primeros estudios en los que se comunicó la existencia de HBoV1, tienen un diseño retrospectivo en cuanto a la obtención de la información clínica, y aportan muy pocos datos a este respecto. No obstante, sí parece claro que la afectación clínica significativa es mucho más frecuente en los niños menores de 5 años y que los síntomas son fundamentalmente respiratorios, incluyendo rinorrea, fiebre, tos y sibilancias, habiéndose diagnosticado algunos niños de bronquiolitis y neumonía.

Se ha detectado en un 1,5 a 18,3% de las infecciones respiratorias agudas de vías inferiores (IRAB), siendo más frecuente en lactantes. Tiene un predominio estacional en invierno y primavera y su distribución es universal [75]. El HBoV1 está asociado a cuadros respiratorios de vías altas con tos, fiebre, conjuntivitis, coriza, faringitis, laringitis y otitis y también de vías respiratorias inferiores con neumonía, obstrucción bronquial, bronquiolitis, tos de tipo pertusoide y descompensación en pacientes asmáticos. Inicialmente se describieron manifestaciones gastrointestinales en 11-24% de los pacientes y en estudios recientes realizados en pacientes hospitalizados por diarrea se detectó en el 0,8% de los casos, lo que hablaría de un rol menor como agente etiológico de diarrea [81]. Destaca el porcentaje de coinfección con otros virus, 34,6 a 72 % en diversas series, lo que ha llevado a cuestionar su rol como patógeno respiratorio [74, 82-84]. Un estudio en pacientes con enfermedad de Kawasaki demostró la presencia de HBoV1 en un 31% en muestras de suero, deposiciones y líquido cefalorraquídeo, relacionándolo a esta patología [84].

1.4.3 Virus influenza A H1N1 2009

El brote de influenza A (H1N1) 2009 fue primero detectado en México en marzo de 2009 y rápidamente se extendió por todo el mundo [85], causando la primera pandemia del siglo XXI con cerca de 18.000 muertes en todo el mundo (http://www.who.int/csr/don/2010_04_23a/en/index.html). En agosto del año 2010, la Organización Mundial de la Salud (OMS) anunció que la nueva influenza A se

encontraba en estado post pandémico (http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/).

La estructura del nuevo virus pandémico (H1N1) 2009 se describe según el esquema reproducido en la Figura 7. Todos los segmentos del genoma tienen su origen en las aves desde las que durante diferentes años pasaron a los cerdos, excepto en el caso del segmento PB1 que tuvo un paso intermedio por el ser humano.

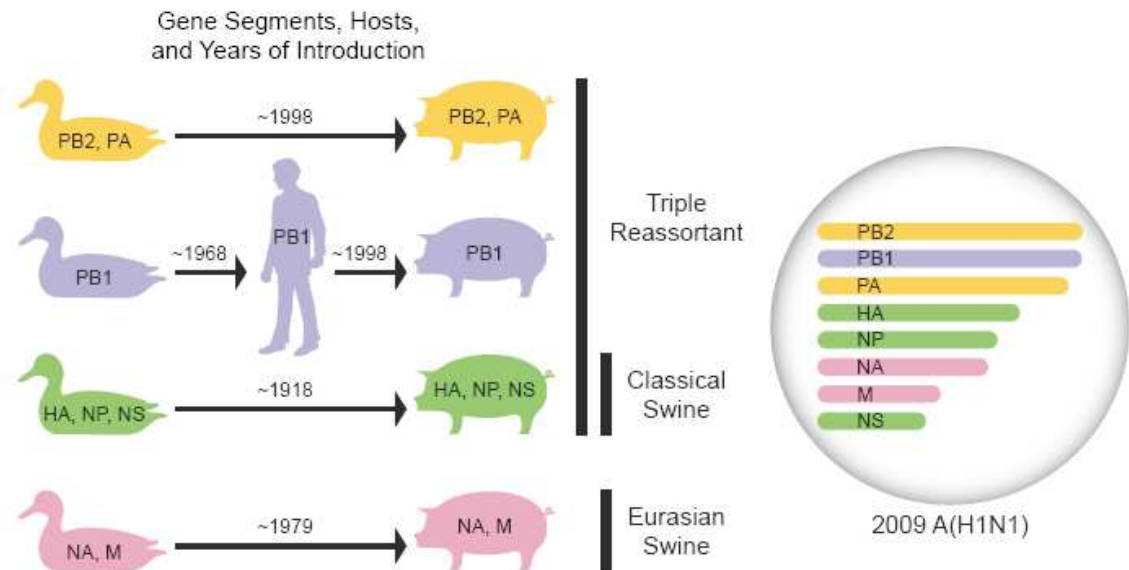


Figura 9. Segmentos genéticos, hospedador y año de introducción. De: Garten RJ et al. *Science* 2009; 325:197-201.

Hacia 1918 se produjeron infecciones de cerdos por virus aviáres que poseían los genes HA, NP y NS, que desde entonces se han mantenido en los virus del linaje porcino clásico o americano. En Estados Unidos, hacia finales de la década de los 90, se identificó un triple reagrupamiento génico (*triple reassortant*) y que produjo algunos casos humanos [86]. Los nuevos virus detectados en California incorporan seis genes del virus con triple agrupamiento, mientras los genes NA y M corresponden al linaje porcino Euroasiático, que fue originado también por virus aviáres que hacia 1979 infectaron rebaños de cerdos en Europa.

Un estudio de evolución del nuevo virus (H1N1) 2009 basado en el análisis del genoma vírico completo de 290 aislados [87], indica que el virus se ha diversificado en al menos 7 clados o grupos en los 4 primeros meses de circulación. Se corresponden con modelos definidos que, excepto en el clado 4, estarían dispersos en distintos países y continentes, pudiendo cocircular en tiempo y espacio con aparente buena

transmisibilidad en el hombre. En los distintos genes, en cada clado se identifica una serie de cambios de aminoácidos, aunque ninguno de estos cambios se localiza en los sitios antigénicos de la subunidad HA1 de la HA, ni en posiciones asociadas con funciones importantes, como podrían ser el sitio de unión al receptor celular (que define el tropismo del virus por diferentes tejidos u hospedadores), o también las regiones dianas de los distintos antivíricos.

La base genética de la resistencia a los adamantanos está asociada con ciertas sustituciones de aminoácidos en el dominio transmembrana de la proteína de matriz (M2) en las posiciones 26, 27, 30, 31 o 34 [88]. Además, oseltamivir y zanamivir se unen al sitio activo de la enzima neuraminidasa (NA) en la superficie del virión. Se ha demostrado que sustituciones en las posiciones 119, 275 o 295 en la NA del virus de la influenza producen una reducción de la susceptibilidad a oseltamivir [89] y también sustituciones en las posiciones 119 y 152 se han relacionado con la resistencia a zanamivir [89, 90]. Los virus que llevan una mutación H275Y presentan alteraciones estructurales que debilitan la unión de oseltamivir a la NA [91]. La influenza pandémica A (H1N1) 2009 cuenta con la sustitución de S31N [92] y los estudios sobre la sensibilidad a los antivíricos han demostrado que la mayoría de los virus son resistentes a los adamantanos, y sensibles a oseltamivir y zanamivir [93]. Sin embargo, se han reportado más de 300 casos de influenza pandémica A (H1N1) virus de 2009 con la sustitución H275Y en el mundo (http://www.who.int/csr/disease/influenza/2010_11_08_GIP_surveillance/en/index.html).

Por otra parte, el estudio de la aparición y de la evolución de las resistencias a agentes antivíricos presenta el máximo interés en los inicios de una pandemia ya que, en ausencia de nuevas vacunas, constituyen el único instrumento de control específico.

Manifestaciones clínicas

Las características clínicas de los casos infectados por la pandemia de 2009 la gripe A (H1N1) es similar a los signos y síntomas de la gripe estacional e incluyen fiebre, tos, cefalea, odinofagia, rinorrea, escalofríos y mialgias [94]. Además, se ha sugerido que los pacientes infectados por el virus pandémico son más propensos a tener síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos y diarrea. Aproximadamente uno de cada 10 pacientes infectados con la influenza pandémica 2009 A (H1N1) requirió hospitalización. La gran mayoría de los pacientes que han sido hospitalizados tienen una enfermedad subyacente, como asma, diabetes, patología cardio-pulmonar,

enfermedades neurológicas y embarazo [95]. Además, la obesidad también ha sido señalada como un factor de riesgo de enfermedad grave [96]. Entre los pacientes hospitalizados en los Estados Unidos, el 25% fueron ingresados en unidades de cuidados intensivos (UCI) y murió el 7%. La hipoxia es la causa más frecuente de ingreso en la UCI, y la radiografía de tórax suele mostrar cambios compatibles con el síndrome de distrés respiratorio agudo [94]. Leucopenia, anemia y trombocitopenia acompañan a los signos y síntomas descritos anteriormente, en un 20-30% de los pacientes.

Las complicaciones que se observan en pacientes infectados por la pandemia han sido similares a los de la gripe estacional y han incluido neumonía bacteriana, encefalopatía, pericarditis, miocarditis y rabdomiolisis. Las personas con alto riesgo de desarrollar complicaciones, como la muerte, son los menores de 2 años o mayores de 65, mujeres embarazadas, menores de 19 que están recibiendo terapia a largo plazo con aspirina y personas con enfermedades subyacentes (<http://www.cdc.gov/h1n1flu/risks.htm>). Las neumonías bacterianas causadas por bacterias que frecuentan parte de la flora del tracto respiratorio superior, tales como el *Streptococcus pneumoniae*, fueron una causa importante de mortalidad durante la pandemia de gripe de 1918 [97]. Durante el brote actual, un estudio realizado por los CDC mostró que el 29% de los pacientes que fallecieron tenían evidencia de sobreinfección bacteriana por *S. pneumoniae* como el patógeno predominante [98]. Este hallazgo sugiere que la administración de la vacuna contra el neumococo y el tratamiento temprano con antibióticos puede ser importante en la reducción de la mortalidad de la gripe [99].

1.4.4. Fases de una pandemia

Las relaciones de los virus gripales con el humano han sido esquematizadas por la OMS en diferentes Fases que abarcan desde brotes estacionales hasta las pandemias (<http://www.who.int/influenza/preparedness/pandemic/h5n1phase/en/index.html>). Un esquema de estas Fases se presenta en la Figura 8.



Figura 8. Fases de una pandemia según lo descrito por la OMS. De: www.bbc.co.uk

Las Fases 1-3 recogen los estadios en los que no se han detectado en el hombre infecciones por virus animales o sólo se han detectado esporádicamente, o bien los virus no han alcanzado la transmisión eficaz al ser humano. En la Fase 4 se detecta transmisión persona-persona dando lugar a brotes a nivel comunitario. En la Fase 5 los virus ya se han propagado al menos en dos países de una misma región de la OMS. En la Fase 6 se considera que existe una situación de pandemia cuando se detectan brotes en un tercer país perteneciente a una región diferente de la OMS. La fase 6 se prolonga en 2 períodos, el posterior al *pico máximo*, reconoce la actividad decreciente, pero todavía no se puede descartar que aparezca otra onda pandémica. En el periodo *post-pandémico* la actividad gripal ha vuelto ya a los niveles estacionales habituales. Durante las fases 1 a 3 es necesario desarrollar la capacidad y planificación para prepararse ante las fases siguientes. En las fases 4 a 6 habrá que llevar a cabo las medidas de respuesta y mitigación. En los períodos posteriores a la fase 6 es importante mantener la vigilancia y realizar una fase de recuperación y de evaluación de la pandemia.

1.5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

A continuación se describen las principales técnicas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico de la infección por virus respiratorios y algunos aspectos prácticos.

1.5.1. Las muestras clínicas en el diagnóstico de la infección respiratoria

Las muestras adecuadas para el diagnóstico de las infecciones respiratorias víricas son: frotis nasal, lavado nasal, frotis faríngeo y NPA. Las muestras deben ser obtenidas preferiblemente en los tres primeros días después del inicio de los síntomas, dado que posteriormente la cantidad de virus presente en las secreciones del tracto respiratorio superior disminuye significativamente y dificulta su detección, incluso con las técnicas más sensibles.

Es recomendable que los hisopos utilizados sean de poliéster o cualquier otro material sintético, nunca de algodón o alginato de calcio, que pueden contener sustancias que inhiban la amplificación genómica. También deben evitarse los hisopos con vástagos de madera. Si la situación clínica del paciente lo requiere, son útiles las muestras invasivas como el lavado broncoalveolar, aspirado bronquial, aspirado traqueal e incluso material obtenido por biopsias.

Para asegurar una buena calidad en la fase preanalítica, hay que mantener un estricto protocolo de transporte y almacenamiento de las muestras. En el momento de la recogida de la muestra por parte del personal médico, de enfermería o técnico, es preciso identificar la muestra con el nombre del paciente, origen y fecha de la toma. Debido a la labilidad de los virus implicados en la infección respiratoria, el transporte de las muestras al laboratorio debe realizarse de forma inmediata tras la toma o, en su defecto, deben ser refrigeradas a 4 °C hasta un máximo de 48 h. Una vez que la muestra llega al laboratorio, esta debe ser alicuotada y si el procesamiento no va a efectuarse inmediatamente, se deberá almacenar preferiblemente a -80°C para realizar las técnicas de detección molecular.

1.5.2. Métodos de diagnóstico directo

1.5.2.1. Aislamiento vírico en cultivo celular

El diagnóstico de las infecciones víricas respiratorias se ha basado tradicionalmente en la técnica del cultivo celular a partir de secreciones nasofaríngeas. La elección de las líneas celulares que se emplearán, se realiza en función de su sensibilidad para recuperar los diferentes virus en los que se centre el interés del investigador. El crecimiento vírico se detecta por la aparición de un efecto citopático (EC) en la monocapa celular tras diferentes días post-inoculación, dependiendo del virus

presente en la muestra. En la Tabla 2 se muestran las principales líneas celulares utilizadas para la detección de virus respiratorios.

Tabla 2. Líneas celulares principalmente utilizadas para el aislamiento de diferentes virus respiratorios

| Virus | Línea celular |
|------------------------|----------------------|
| Gripe | MDCK |
| Parainfluenza | LLC-MK2, Hep-2 |
| Rinovirus | MRC-F |
| Adenovirus | Hep-2, A-549 |
| Coronavirus | |
| HCoV-OC43 | - |
| HCoV-229E | MRC-5 |
| HCoV-NL63 | LLC-MK2 |
| HCoV-SARS | Vero E6 |
| Metapneumovirus | LLC-MK2, Hep-2 |
| Bocavirus | - |

MDCK: Riñón canino Madin Darby; LLC-MK2: Riñón de mono rhesus; MRC-5: Fibroblastos de pulmón embrionario humano; Hep-2: Carcinoma epidermoide de laringe humana; Vero E6: Riñón de mono verde africano; A-549: Carcinoma de pulmón embrionario humano. Modificada de: M^a Luisa García-García. Infecciones respiratorias por virus emergentes. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid,

En el caso de los virus de la gripe, uno de los métodos más útiles para cultivarlos en el laboratorio y obtenerlos en cultivo puro, es la técnica del embrión de pollo. Sin embargo, el cultivo como método de diagnóstico primario es lento, necesitando un mínimo de 5-7 días, y su sensibilidad puede verse afectada por la labilidad de algunos virus, puesto que la integridad de éstos y su carga son factores limitantes para el buen desarrollo de este método diagnóstico. Por otro lado, existen virus no cultivables por no conocerse la línea celular adecuada. En el caso de HBoV recientemente se describió que la línea HTEpC (células del epitelio traqueal humano) permite el cultivo del virus [100]. Sin embargo, en la actualidad aún no se ha implementado este tipo de cultivo para la detección rutinaria de HBoV en el laboratorio. Además, hay que considerar que algunos virus tienen un crecimiento que no produce un efecto citopático evidente (ej. HCoV, RV, VPI). De modo que, aunque el aislamiento vírico es el *gold standard* para el diagnóstico vírico, su coste y la infraestructura necesaria limitan su aplicación en la mayoría de los laboratorios de microbiología. El empleo de

técnicas inmunológicas para la detección precoz e identificación de los virus crecidos en cultivo celular (técnica de shell-vial), ofrece un diagnóstico más rápido y sensible (75-92%) [101, 102].

1.5.2.2. Técnicas de diagnóstico rápido por detección de antígenos

Las técnicas rápidas de diagnóstico para el estudio de las infecciones respiratorias agudas, fueron propuestas por la OMS a partir de 1981 por considerarlas precisas y esenciales para el cuidado inmediato del paciente. De esta manera se posibilita la introducción de medidas profilácticas en salud pública, la prevención de la diseminación de los virus en los hospitales y el control en la administración de antibióticos. Entre las técnicas rápidas se incluyen la Inmunofluorescencia (IF), la Inmunocromatografía (IC) y el Enzimoimmunoanálisis (EIA). Todas se basan en la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a distintos antígenos víricos, pudiendo detectarse el virus en un corto periodo de tiempo, incluyendo además determinados virus no viables presentes en la muestra. El principal problema es su baja sensibilidad y especificidad y el número limitado de anticuerpos monoclonales que no cubre a todos los virus implicados en los procesos respiratorios.

1.5.2.2.1. Inmunofluorescencia (IF)

Permite la detección del virus mediante anticuerpos monoclonales específicos frente a diferentes antígenos víricos. Si los anticuerpos monoclonales van unidos a un fluoróforo, se habla de Inmunofluorescencia directa (IFD). Si se utilizan anticuerpos secundarios unidos a un marcador fluorescente capaces de reconocer los diferentes anticuerpos monoclonales se habla de Inmunofluorescencia indirecta (IFI). En ambos casos, esta técnica permite obtener resultados en el día, aunque se requiere un microscopio de fluorescencia y personal entrenado en la observación de este tipo de preparaciones. Hasta hace unos años esta técnica era utilizada esencialmente para el virus de la gripe y el VRS. Sin embargo, actualmente existen anticuerpos monoclonales comercializados frente a la mayoría de los virus respiratorios conocidos [103].

Para poder analizar una muestra por IF, ésta debe contener un número aceptable de células, para lo que es preciso adiestrar convenientemente al personal encargado de su obtención. El lavado nasofaríngeo es superior al simple aspirado, mientras que los

frotis faríngeos realizados con una torunda de algodón y remitidos en un medio de transporte semisólido, no son buenas muestras para la realización de esta técnica.

1.5.2.2. Enzimoimmunoanálisis (EIA)

Esta técnica utiliza antígenos o anticuerpos unidos a enzimas sin que ninguno de ellos vea alteradas sus propiedades inmunológicas ni enzimáticas. La actividad del sistema enzimático acoplado al anticuerpo se modifica en función de la reacción frente al antígeno. La variación de esta función enzimática tiene una lectura colorimétrica. Debido a la sensibilidad, alta especificidad, simplicidad y estabilidad de los reactivos utilizados, se han desarrollado numerosas metodologías que permiten detectar antígenos en fluidos biológicos [104, 105]. Los EIA comerciales se basan en la fijación del anticuerpo a una fase sólida, generalmente placas de microtitulación, y los anticuerpos utilizados para cada virus varían según el fabricante. En la actualidad algunos de estos métodos están perfectamente automatizados, por lo que no se requiere personal tan especializado como para la IF. Hay variantes técnicas, según la firma comercial: EIA de captura, en *sandwich*, competitivo, determinantes de la aidez, etc.

1.5.2.3. Inmunocromatografía (IC)

La IC permite visualizar la reacción antígeno-anticuerpo por la acumulación del oro coloidal en zonas específicas de una membrana, en la que se fijan previamente anticuerpos de captura. Esta técnica se ha desarrollado fundamentalmente para el virus de la gripe [106] y VRS [107], aunque también se han realizado estudios para otros virus respiratorios como adenovirus [108, 109] y HMPV [110, 111]. Sus principales ventajas son la rapidez y la sencillez. Al igual que los resultados obtenidos mediante EIA, los obtenidos por IC varían mucho en sensibilidad según el método comercial utilizado y el tipo de muestra analizada.

En la Tabla 3 se muestran algunas de las técnicas comerciales para el diagnóstico rápido de virus respiratorios.

Tabla 3. Técnicas comerciales para el diagnóstico de virus respiratorios

| Nombre comercial | Virus | Técnica utilizada |
|--|---|--------------------------|
| Binax NOW Influenza A&B | Influenza A y B | IC |
| D³ Ultra 8™ DFA respiratory virus screening & identification | VRS, influenza A y B, VPI 1-3, adenovirus, HMPV | IFI |
| Human metapneumovirus EIA | HMPV | EIA |
| Directigen FLU A/B | Influenza A y B | EIA |
| Adenovirus respiratorio Letitest | Adenovirus | IC |

IC: Inmunocromatografía; EIA: Enzimoimmunoensayo; IFI: Inmunofluorescencia indirecta. VRS: virus respiratorio sincitial; VPI: virus parainfluenza; HMPV: metapneumovirus humano. Modificada de: M^a Luisa García-García. Infecciones respiratorias por virus emergentes. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

1.5.2.3. Detección de ácidos nucleicos

Estos métodos están basados en la búsqueda y el reconocimiento del genoma vírico en la muestra clínica o en el cultivo celular. Aunque el uso de estas técnicas se está incrementando rápidamente y ha transformado el diagnóstico de determinadas infecciones víricas (hepatitis B, C y VIH), el papel de estos métodos en la rutina diagnóstica de la infección respiratoria vírica, es aún escaso y de reciente incorporación. Si bien el cultivo ha sido considerado el método de referencia en el diagnóstico de las viriasis respiratorias, las técnicas de detección de ácidos nucleicos han supuesto una excelente alternativa en los laboratorios en los que el cultivo celular no está disponible. Suponen una ventaja respecto al cultivo en cuanto a mayor sensibilidad, rapidez y a que no es necesaria la presencia de virus viables en la muestra clínica. Es más, en el caso de algunos virus como VPI 4, RV, HMPV, HBoV o algunos HCoV, en los que el cultivo es difícil o no se ha conseguido por el momento, la detección de material genómico constituye el método de elección para su diagnóstico. Hasta el momento la mayoría de las técnicas de detección de ácidos nucleicos empleados en los laboratorios de virología utilizan métodos “caseros”, que suponen un gran esfuerzo en su diseño y optimización. Pese a ello, probablemente estas técnicas

de biología molecular son el futuro en cuanto al diagnóstico rutinario de las infecciones respiratorias víricas, sobre todo cuando aumente la disponibilidad de equipos comerciales bien evaluados, normalizados y totalmente automatizados.

1.5.2.3.1. Amplificación genómica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR y RT-PCR)

Este método permite amplificar exponencialmente secuencias específicas de DNA genómico o de cDNA, gracias a la acción enzimática de la DNA polimerasa. El procesamiento de una muestra para la amplificación de ácidos nucleicos viene determinado por una serie de etapas: extracción de los ácidos nucleicos, retrotranscripción en el caso de virus RNA, amplificación y detección del producto final. La diferencia fundamental entre la PCR convencional y la, cada vez más empleada, PCR a tiempo real lo constituye la fase de detección, ya que se realiza al mismo tiempo que la amplificación, mientras que en la PCR convencional la detección se realiza después de que el proceso de amplificación ha finalizado completamente. La PCR a tiempo real permite la cuantificación de las moléculas diana de manera inmediata [112-114]. Por otro lado, la existencia de un elevado número de virus involucrados en la patología respiratoria, no siendo infrecuente la detección de infecciones múltiples, ha hecho necesario el diseño de métodos de PCR múltiple en los que simultáneamente se puedan identificar diferentes virus [112, 115].

1.5.2.3.2. PCR acoplada a enzimoanálisis

Consiste en una amplificación cuyos productos se detectan mediante sondas específicas asociadas a medio líquido [116] o medio sólido [114]. En el caso de la detección en medio sólido, esta metodología se ha probado tanto para virus [114, 117] como para bacterias [118], permitiendo un análisis visual y directo, a través de una técnica simple que ofrece resultados precisos en tan solo unos minutos.

1.5.2.3.3. Microarrays o biochips de DNA

Son sistemas de detección de productos de amplificación mediante sondas que se encuentran inmovilizadas en una superficie [119, 120]. Esta tecnología permite detectar una gran cantidad de virus en una misma determinación. La aportación más novedosa al diagnóstico de la infección respiratoria está llegando de la mano de los

denominados *chips* de DNA en fase líquida. En estos sistemas las sondas se encuentran impresas sobre microesferas en suspensión, mejorándose la accesibilidad de las sondas nucleotídicas e incrementado la sensibilidad de la técnica [121, 122]. Sin embargo, estas tecnologías sólo están disponibles en laboratorios especializados.

1.5.3. Métodos indirectos: técnicas serológicas

El diagnóstico serológico de los virus respiratorios necesita generalmente de la extracción de dos muestras de suero, la primera en la fase aguda de la enfermedad y la segunda en la fase de convalecencia. Esto representa una de las mayores dificultades del diagnóstico serológico, ya que muchos de los virus respiratorios además de ser muy prevalentes producen reinfecciones, por lo que el paciente presenta una inmunización previa frente a un determinado virus, que será aumentada por la reinfección. Por tanto, no se podrá demostrar en muchos casos una verdadera seroconversión, ni un aumento de título significativo. Su mayor utilidad son los estudios seroepidemiológicos. En la Tabla 4 se indican las características de cada una de las técnicas serológicas.

Tabla 4. Características de las técnicas utilizadas en los estudios seroepidemiológicos de la infección respiratoria vírica.

| | Ventajas | Desventajas |
|--|--|--|
| Fijación del complemento | <ul style="list-style-type: none"> • Permite demostrar la circulación de virus de diferentes tipos | <ul style="list-style-type: none"> • Baja sensibilidad • Laborioso • Difícilmente reproducible |
| Inhibición de la hemaglutinación | <ul style="list-style-type: none"> • Establece la presencia de anticuerpos frente a diferentes tipos e incluso subtipos de virus | <ul style="list-style-type: none"> • Falsos positivos • Realización e interpretación compleja • Escasa reproducibilidad entre laboratorios • Poco sensible |
| Inmunofluorescencia indirecta y ELISA | <ul style="list-style-type: none"> • Técnicas relativamente sencillas y rápidas | <ul style="list-style-type: none"> • Numerosas reacciones cruzadas entre virus relacionados por los que su aplicación es muy limitada |
| Neutralización | <ul style="list-style-type: none"> • Los títulos de los anticuerpos neutralizantes son fiables y representan el estado real de protección | <ul style="list-style-type: none"> • Solo aplicable a virus respiratorios capaces de crecer en cultivos celulares |

Modificada de: M^a Luisa García-García. Infecciones respiratorias por virus emergentes. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

-

1.6. Tratamiento antivírico

A pesar de los múltiples estudios y trabajos de investigación realizados sobre las infecciones de las vías respiratorias, el tratamiento se ha modificado poco a lo largo de los años, y no existen tratamientos de eficacia demostrada. Sólo se han desarrollado tres grupos de antivíricos para dos tipos de virus respiratorios: virus de la influenza y VRS. Los inhibidores de la NA (oseltamivir, zanamivir y peramivir) y los inhibidores de la proteína M2 (amantadina y rimantadina) para los virus influenza; y la ribavirina para VRS.

Los antivíricos anti-influenza actúan en tres momentos de la replicación del virus de la influenza: bloqueando la NA, inhibiendo la NA y compitiendo con la actividad de la polimerasa vírica. Los adamantanos inhiben la replicación vírica bloqueando la acción de la proteína M2. Esta es una proteína de membrana requerida para la liberación de la nucleocápside después de la fusión vírica con la membrana del endosoma. Los inhibidores de la neuraminidasa son análogos del ácido siálico que inhiben específicamente a la NA del virus de la influenza A y B por interactuar competitiva y reversiblemente con el sitio específico de actividad de la enzima, impidiendo de esta manera la liberación de los virus preformados.

Las cepas de gripe A y B son sensibles a oseltamivir, con raras excepciones, desde su disponibilidad en el año 1999. Recientes revisiones y opiniones de expertos han identificado estudios que informan tasas de prevalencia e incidencia de resistencia a los antivíricos en los pacientes tratados con oseltamivir [4, 5]. Hasta hace poco, la prevalencia de resistencia a los antivíricos ha sido relativamente baja [6, 7]. Sin embargo, en la temporada de influenza 2008-2009, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) reportó un incremento importante a nivel mundial en la prevalencia de resistencia al oseltamivir en los virus de influenza A (H1N1) 2009 debido a la mutación H275Y NA (<http://www.cdc.gov/H1N1flu/recommendations.htm>). Inicialmente, el nuevo virus de la influenza pandémica H1N1 era sensible a los inhibidores de la neuraminidasa, oseltamivir y zanamivir, pero resistente a la amantadina [3]. Sin embargo, alrededor del 1% de las cepas de una prueba realizada en el 2009 durante la pandemia por el virus H1N1 resultaron ser resistentes al oseltamivir, debido a la misma mutación. Hasta la fecha el virus influenza A y B, incluyendo todos los tipos de virus A/H1N1, siguen siendo sensibles al zanamivir. Además, en una reciente revisión sólo se encuentra un caso documentado de resistencia a zanamivir [4, 8].

La ribavirina es un análogo de la guanosina que después de su fosforilación intracelular en trifosfato por acción de las enzimas intracelulares inhibe la actividad de la polimerasa del virus RNA, lo que lleva a una inhibición competitiva con el trifosfato de guanosina dependiente del RNA mensajero vírico.

Sin embargo, el uso de ribavirina continúa siendo controvertido por el escaso beneficio clínico obtenido con su uso, su elevado coste, las dificultades técnicas para su administración y el efecto tóxico potencial para el personal sanitario. Aunque fue recomendado durante la década de los 80, en la actualidad la Asociación Americana de Pediatría no recomienda su uso [3]. El palivizumab (anticuerpo IgG monoclonal humanizado frente al VRS, que ha demostrado gran eficacia en la prevención) no está indicado en el tratamiento de la enfermedad por VRS una vez establecida. Aunque se han descrito algunas experiencias de su uso en pacientes infectados, sobre todo en inmunodeprimidos y trasplantados; por el momento no se dispone de ensayos clínicos que aporten una evidencia clara para su uso en estos pacientes [123, 124].

Por lo tanto, en muchos casos la estrategia terapéutica carece de suficiente evidencia científica. De hecho, la única actuación terapéutica demostrada como eficaz es asegurar la correcta oxigenación e hidratación del paciente, administrando oxígeno suplementario en los niños con hipoxemia y garantizando una adecuada hidratación, si es necesario por vía parenteral [3, 125, 126]. Se han ensayado diferentes tratamientos, algunos sintomáticos (broncodilatadores, adrenalina inhalada, glucocorticoides, antileucotrienos) y otros etiológicos (ribavirina o diferentes antibióticos). Todos ellos han tenido resultados contradictorios, sin poderse identificar en ningún momento cual es la población diana susceptible de presentar beneficio con alguno de estos tratamientos, de tal manera que actualmente no se consideran indicados ninguno de ellos [3]. Por otra parte, aunque existe algún trabajo que intenta diferenciar las características epidemiológicas y clínicas de los diferentes virus causantes de las infecciones de las vías respiratorias inferiores, no existen trabajos que valoren la eficacia de estos tratamientos según los diferentes agentes etiológicos.

2. JUSTIFICACION

Las infecciones de las vías respiratorias representan una importante causa de morbimortalidad en Pediatría. De acuerdo a la localización de la infección, se pueden diferenciar dos grandes grupos de infecciones del tracto respiratorio: infecciones de vías respiratorias superiores e infecciones de vías respiratorias inferiores. Por su gran prevalencia, las infecciones agudas de las vías respiratorias bajas (IRAB) generan una gran demanda asistencial, tanto en atención primaria como en los servicios de urgencia hospitalarios, así como un importante número de ingresos en lactantes y niños pequeños y una elevada tasa de infección nosocomial. Las IRAB junto con las gastroenteritis, lideran la principal causa de hospitalización en niños pequeños en países desarrollados y es una causa importante de muerte en países en desarrollo. Las IRAB son la causa de 4,3 millones de muertes anualmente en el mundo en niños menores de 5 años, representando el 30% del total de defunciones anuales de niños de este grupo de edad.

Las infecciones respiratorias bajas son causadas principalmente por virus, dentro de las cuales encontramos la bronquiolitis, bronqueoalveolitis, sibilancias recurrentes y neumonía. El agente etiológico más importante en estas infecciones VRS. Un estudio de la Comunidad Valenciana calculó un coste por hospitalización únicamente debida a infecciones respiratorias por VRS de 3.618.000 euros anuales. Sin embargo, otros virus como son los virus influenza, adenovirus, RV y HCoV están también frecuentemente implicados como causantes de IRAB. La mayoría de estos estudios encuentran una mayor incidencia en niños menores de 5 años. Estos agentes explican entre el 50-60% de los episodios de LRTI, quedando el porcentaje restante sin etiología demostrada. Esto puede ser debido a una insuficiente sensibilidad de las técnicas utilizadas o a presencia de virus no estudiados. El reciente desarrollo en las técnicas de detección molecular ha permitido la identificación de nuevos virus respiratorios. Dos de estos nuevos virus, metapneumovirus humano (HMPV) y bocavirus (HBoV) representarían una parte importante de las infecciones respiratorias no diagnosticadas. La mejora en las técnicas moleculares ha conducido a un mayor reconocimiento de estos virus. Sin embargo, el papel de los nuevos virus aún no ha sido aclarado. Es por esto que son necesarios más estudios epidemiológicos para establecer la importancia y presentación de algunos de los patógenos recientemente identificados.

A pesar de que los virus son responsables de una gran proporción de IRAB en niños, a menudo, se prescriben antibacterianos en enfermedades víricas. Además, las infecciones víricas causan la mayoría de los episodios febriles en infantes menores de 3 meses de edad. Sin embargo, debido a la imposibilidad de identificar con exactitud los niños que tienen infección bacteriana grave, la mayoría de los niños con cuadros febriles son hospitalizados y reciben antibióticos.

El HMPV, descrito en el año 2001, es un virus estrechamente relacionado con VRS. Las infecciones por HMPV ocurren en todas las edades; sin embargo los niños pequeños y adultos mayores son los grupos más frecuentemente afectados. El HBoV1 ha sido identificado recientemente en el año 2005. La detección de influenza, RSV, y probablemente HMPV correlacionan con infección de las vías respiratorias bajas. Sin embargo, en el caso de HBoV se requieren más estudios para determinar si este virus es causante de dichas infecciones. Su frecuencia de detección se situaría por debajo del VRS, tan común como RV, y más frecuente que HMPV, VPI, adenovirus y HCoV. Estos mismos estudios detectan una tasa de coinfección con el resto de virus respiratorios muy elevada.

De esta forma, esta Tesis se ha centrado en el estudio nuevas técnicas de detección de virus respiratorios emergentes con la intención de ampliar el conocimiento de la etiología, manifestaciones clínicas y epidemiología de dichos virus en infección respiratoria en niños. Para el caso de HMPV, se evaluaron nuevos métodos de diagnóstico, comparando una técnica inmunológica de detección de antígeno con una de detección molecular. En el caso de HBoV1, se evaluó la prevalencia y carga vírica del virus para determinar cuándo un aislado está asociado con una enfermedad grave. Además, se estudió la filogenia de los HBoV1 encontrados para compararla con las cepas que circulan en otros países. En ambos casos (HMPV y HBoV1), se evaluó la presencia de estos nuevos virus en muestras de pacientes sanos.

Así mismo, el influenza A H1N1 (2009) también es un virus emergente, que surgió en abril de 2009 en México, extendiéndose rápidamente al resto del mundo. En Junio del mismo año, la Organización Mundial de la Salud (OMS) decretó esta cepa como un virus pandémico, siendo la primera pandemia en 40 años. Durante el periodo pandémico, se confirmaron alrededor de 700.000 casos en España y más de 300 defunciones. Debido al gran impacto a nivel mundial de este virus y a que un diagnóstico rápido de los virus influenza es importante para la prevención y control de las epidemias de influenza y para la iniciación oportuna del tratamiento antivírico, se

evaluó una técnica de detección de antígeno utilizada de rutina en el laboratorio para detección de virus Influenza A (H1N1) 2009, así como una nueva técnica de detección molecular. Los antiviricos juegan un papel fundamental en la prevención y manejo de los virus influenza. La mayor parte de los virus de la influenza A (H1N1) 2009 son sensibles a oseltamivir y resistentes a adamantano. Sin embargo, una única mutación (H275Y) en el gen de la neuraminidasa (NA) puede producir resistencia a oseltamivir como ya ha sido reportado en algunos países. De esta manera, este apartado de la Tesis se completa con el estudio mediante pirosecuenciación de la presencia de cepas resistentes a oseltamivir.

Para finalizar, se evalúa una nueva técnica molecular para la detección de múltiples virus respiratorios en forma simultánea. La detección rápida y sensible de los virus respiratorios es esencial para el diagnóstico precoz y preciso de las infecciones respiratorias. Sin embargo, los métodos convencionales tienen numerosas limitaciones: el cultivo vírico es lento y requiere mano de obra intensiva, y las técnicas de IF directa e IC, aunque son rápidas, tienen baja sensibilidad para la detección de la mayoría de los virus. Las estrategias de detección múltiple basadas en la PCR son adecuadas para el diagnóstico de las infecciones respiratorias, particularmente cuando se considera el hecho de que virus recientemente descubiertos han demostrado ser difíciles de detectar por los métodos tradicionales. Numerosos estudios han encontrado la presencia de más de un virus en las infecciones del tracto respiratorio, muchos de ellos correspondientes a virus emergentes que no están considerados en las técnicas convencionales utilizadas en el laboratorio. Por esta razón, estas técnicas pueden ser útiles para explicar el posible papel de las coinfecciones en las infecciones víricas.

La elevada heterogeneidad epidemiológica y clínica en infecciones de tan elevada importancia en pediatría permite creer que un mejor conocimiento etiológico de las mismas podría comportar un mejor tratamiento clínico, minimizando así la morbimortalidad asociada y los costes generados por estas infecciones. La rápida y correcta identificación de estos nuevos virus, tienen el potencial de reducir el uso de antibióticos y mejorar el uso selectivo de estos. Además, la rápida identificación de una infección vírica puede ayudar a controlar la transmisión nosocomial y a la mejora en el manejo clínico de los pacientes.

3. OBJETIVOS

1. Evaluar nuevas técnicas para la detección de HMPV en niños menores de 5 años ingresados por infección respiratoria baja.

1.1. Evaluar dos nuevas técnicas para la detección de HMPV en muestras de aspirados nasofaríngeos.

1.2. Estudiar la prevalencia, y las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes infectados por HMPV.

2. Estudiar el papel de HBoV1 en niños menores de 5 años ingresados por infección respiratoria.

2.1. Establecer la prevalencia, características clínicas y epidemiológicas de la infección por HBoV1 en un grupo de estudio y en niños sanos.

2.2. Cuantificar la carga vírica de los niños infectados por HBoV1 y estudiar su asociación con la gravedad del paciente.

2.3. Estudiar la filogenia de las muestras positivas.

3. Evaluar la utilidad de las técnicas inmunológicas y moleculares en el manejo de los pacientes con Influenza A (H1N1) 2009.

3.1. Estudiar la utilidad de una técnica rápida de detección de antígeno para la detección de Influenza A (H1N1) 2009 en población pediátrica y adulta.

3.2. Evaluar una nueva técnica molecular para la detección de influenza A (H1N1) 2009 en población pediátrica y las diferencias respecto a población adulta.

3.3. Estudiar la presencia de cepas de influenza A (H1N1) 2009 resistentes a oseltamivir mediante pirosecuenciación.

4. Evaluar la utilidad de una nueva técnica molecular de detección simultánea de múltiples virus en infección respiratoria.

4.1. Estudiar la presencia de virus emergentes no incluidos en las técnicas convencionales (picornavirus y coronavirus) y la sensibilidad de la nueva técnica para la detección de virus clásicos.

4.2. Estudiar la presencia de las coinfecciones en población pediátrica y su posible papel en las infecciones respiratorias.

4. RESULTADOS

4.1 Artículo 1

Usefulness of two new methods for diagnosing metapneumovirus infections in children

Loreto Fuenzalida, Jordi Fàbrega, Silvia Blanco, María del Mar Martínez, Cristina Prat, Miguel Pérez, Carmen Ramil, Jose Domínguez, Vicente Ausina and Carlos Rodrigo.

Clinical Microbiology and Infection. 2010. 16: 1663-1668

El HMPV es un patógeno emergente que ha sido asociado con síntomas que van desde leves infecciones del tracto respiratorio, hasta neumonía grave, exacerbación del asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Las manifestaciones clínicas son muy similares a las presentadas por el VRS, lo que dificulta su identificación clínica [7]

El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad de una técnica de RT-PCR a tiempo real y un enzimoimmunoanálisis (EIA) para la detección de HMPV en muestras clínicas de niños. El estudio comprendió un total de 184 muestras de aspirado nasofaríngeo (NPA) de 173 niños menores de 5 años hospitalizados por infección respiratoria aguda entre octubre de 2006 y octubre de 2007. Además, las muestras fueron estudiadas por las pruebas convencionales (ICT/IF) utilizadas para la detección de los virus respiratorios clásicos.

El VRS se detectó en el 27% de las muestras, seguido por influenza A (6%), VPI3 (2,2%), adenovirus (2%), VPI1 (1,1%), VPI2 (1,1%), y el virus influenza B (0,5%). La RT-PCR en tiempo real detectó 13 muestras positivas para HMPV (8%), mientras que con el EIA se detectaron 17 (9,3%). Ambas técnicas mostraron una buena correlación (94%). El HMPV se presentó sólo en un 15% acompañado por otro virus. El principal diagnóstico asociado a HMPV fue bronquiolitis y se presentó principalmente en los meses de invierno, coincidiendo con VRS. Las técnicas evaluadas son métodos adecuados para el diagnóstico de infección por HMPV en niños. La incorporación de la detección de HMPV en los laboratorios microbiológicos puede mejorar el diagnóstico etiológico de las infecciones respiratorias agudas en niños.

Usefulness of two new methods for diagnosing metapneumovirus infections in children

L. Fuenzalida¹, J. Fabrega², S. Blanco^{1,3}, M. del Mar Martínez², C. Prat^{1,3}, M. Pérez¹, C. Ramil¹, J. Domínguez^{1,3}, V. Ausina^{1,3} and C. Rodrigo²

1) Microbiology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Department de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, 2) Paediatric Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain and 3) CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Abstract

Human metapneumovirus (hMPV) is associated with acute respiratory tract infections, mainly in paediatric patients. The aim of this study was to evaluate the usefulness of two new commercial techniques available for the detection of hMPV in clinical samples from children: an enzyme immunoassay, hMPV EIA (Biotrin International Ltd), and a molecular assay, real-time RT-PCR (Pro hMPV Real Time Assay Kit; Prodesse). A total of 184 nasopharyngeal aspirate specimens from 173 children aged less than 5 years who were hospitalized with acute wheezing were analysed. Respiratory syncytial virus was detected in 27% of the samples, followed by influenza A virus (6%), parainfluenza virus (PIV)3 (2.2%), adenovirus (2%), PIV1 (1.1%), PIV2 (1.1%), and influenza B virus (0.5%). The presence of hMPV was tested in all samples, using the real-time RT-PCR and EIA. Real-time RT-PCR detected 13 hMPV-positive samples (8%), and EIA detected 17 (9.3%). When the EIA results were compared with those of real-time RT-PCR for the detection of hMPV, a good correlation was found (94%). A relatively low co-infection rate (15%) was observed in our patients. RT-PCR and EIA provide robust methods for the diagnosis of hMPV infection in children.

Keywords: Diagnosis, enzyme immunoassay, human metapneumovirus, real-time RT-PCR, respiratory tract infection

Original Submission: 21 October 2009; **Revised Submission:** 26 January 2010; **Accepted:** 28 January 2010

Editor: E. Gould

Article published online: 11 February 2010

Clin Microbiol Infect 2010; **16**: 1663–1668

10.1111/j.1469-0691.2010.03192.x

Corresponding author: L. Fuenzalida, Servei de Microbiologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain
E-mail: loretoffi@gmail.com

Introduction

Human metapneumovirus (hMPV) is an RNA virus that was isolated in 2001 from children with respiratory tract infections [1]. Two major lineages of hMPV have been identified, A and B, with sublineages A1 and A2, and B1 and B2 [2–5]. After the initial report, this virus has been identified as a respiratory virus worldwide [4,6–9].

Its clinical manifestations resemble those of respiratory syncytial virus (RSV), and it is therefore difficult to clinically distinguish one virus from another. hMPV is a significant cause of acute respiratory disease in children. The most frequent diagnoses in hospitalized children are bronchiolitis and pneumonia, which occasionally require treatment in inten-

sive-care units [10,11]. hMPV is also a cause of acute respiratory disease in adults, particularly the elderly and those with comorbid conditions such as chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and cancer [12].

Serological studies of stored serum specimens suggested that hMPV has been circulating in the human population for more than 50 years [1]. By the age of 5 years, more than 90% of children have serological evidence of hMPV infection [1,7,13].

Rapid and reliable methods for hMPV detection in clinical samples are essential for the implementation of appropriate care, and to obtain a better understanding of the pathology of hMPV and to determine its epidemiology.

Evaluation of several cell lines for culturing of hMPV has demonstrated poor applicability for timely detection of the pathogen in a clinical setting, because the cytopathic effect is slower and resembles that caused by RSV [14,15]. Immunofluorescence (IF) provides great sensitivity and specificity as compared with RT-PCR [16]. Although IF is a simple method, it has two disadvantages. First, experience is

required to read the samples; and second, the protocols are not correctly standardized.

The aim of this study was to evaluate two new techniques that are commercially available for the detection of hMPV in clinical samples from children: an enzyme immunoassay, hMPV EIA (Biotrin International Ltd, Dublin, Ireland), and a molecular assay, real-time RT-PCR (Pro hMPV Real Time Assay Kit; Prodesse Inc., Waukesha, WI, USA).

Materials and Methods

Patients and samples

From October 2006 to October 2007, a total of 184 nasopharyngeal aspirate specimens were collected from 173 children less than 5 years old who were hospitalized with acute wheezing. A single sample was taken from each patient in each episode. Aliquots of each sample were stored at -20°C until being tested. Clinical and epidemiological data of patients were recorded. Episodes in the same patient were only considered to be new if they occurred at least 10 days after the first one. Children with cystic fibrosis or any known immunodeficiency, as well as all those with a bacterial respiratory tract infection, were excluded. Disease severity was determined by the number of hospitalization days and the requirement for oxygen supplementation during the hospitalization.

Informed consent was obtained from the patients' parents. The Ethical Committees of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol approved the study protocol.

Virus detection

Diagnosis of respiratory virus infection other than by hMPV. An immunochromatographic assay (Binax Now, Portland, ME, USA) was used for RSV and influenza A and B virus detection, and an indirect IF method (Chemicon International, Temecula, CA, USA) was used to detect RSV, influenza A and B virus, parainfluenza virus (PIV)1–3, and adenovirus. The techniques were applied according to the manufacturers' recommendations.

hMPV real-time RT-PCR. RNA was extracted using the QIAamp Viral RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. RNA of hMPV was identified using the Pro hMPV Real Time Assay Kit. This assay is a one-step RT-PCR assay based on nucleic acid extraction, reverse transcription to generate cDNA from target RNA, and amplification and detection of target cDNA by using a specific primer set and probe for a conserved region encoding part of the hMPV nucleocapsid protein.

A single primer set and probe designed by the manufacturer, specific for a highly conserved region of the nucleocapsid gene in all four lineages of hMPV, was used.

In brief, reverse transcription and real-time RT-PCR were performed on extracted nucleic acids using a reaction mixture containing buffer, MgCl_2 , dNTPs, oligonucleotide primers, oligonucleotide probes labelled with fluorescent and quencher dyes, Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and murine leukaemia virus reverse transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). An internal RNA control was incorporated into every specimen before the nucleic acid extraction for verification of successful extraction, reverse transcription and PCR in each sample (the technique was performed once per sample). The internal control was a non-infectious RNA transcript that is distinguished from the viral targets of the assay by means of a unique probe-binding region. If this control is not amplified, the reaction is considered to be inhibited. RT-PCR was performed using the Smart Cycler II system (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA). For more details, the manufacturer should be consulted.

hMPV EIA. The Biotrin hMPV EIA is an antigen capture assay. Each EIA well is coated with a unique combination of monoclonal antibodies recognizing the fusion and matrix proteins of the virus.

The assay detects all four subgroups of hMPV. The EIA was performed according to the manufacturer's instructions. In short, 165 μL of sample was mixed with 55 μL of extraction buffer immediately before being added to duplicate wells.

After a wash step, the anti-hMPV monoclonal antibody-horseradish peroxidase conjugates were incubated on the plate. A substrate was then added. When the reaction stopped, the signal was measured at an absorbance of 450 nm. The cut-off for the assay was determined by adding the mean optical density of the assay negative control and adding a constant of 0.10. The cut-off value for each sample was measured by dividing the mean specimen cut-off by the negative control cut-off. According to the index obtained, the result was considered to be negative (<0.9), equivocal (≥ 0.9 to ≤ 1.1), or positive (>1.1).

Statistical analyses

Cohen's kappa (κ) index was used to determine the concordance between the two techniques. Criteria based on the interpretation of Landis and Koch [17] were used: kappa values below 0.4 indicate weak correlation, values of 0.4–0.6 good correlation, and values above 0.6 strong correlation. All analyses were performed using the Stata 8.0 program (Stata Corp., College Station, TX, USA).

TABLE 1. Comparison of real-time RT-PCR and Biotrin EIA results for human metapneumovirus detection in nasopharyngeal aspirates

| | | Real-time RT-PCR, n (%) | | |
|-----|----------|-------------------------|------------|------------|
| | | Positive | Negative | Total |
| EIA | Positive | 10 (6.1) | 7 (4.3) | 17 (10.4) |
| | Negative | 3 (1.9) | 142 (8.7) | 145 (89.6) |
| | Total | 13 (8.0) | 149 (92.0) | 162 (100) |

For continuous variables, tables of frequency based on likelihood ratio chi-square were used. The Mann–Whitney *U*-test was used to compare the length of hospitalization between groups; $p < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Comparison of results obtained with hMPV real-time RT-PCR and hMPV EIA

Valid results were obtained for 162 nasopharyngeal aspirates (88%) with the real-time RT-PCR technique. The 22 remaining real-time RT-PCR test samples (12%) were inhibited. Real-time RT-PCR detected 13 positive samples (8%). In turn, EIA detected 17 positive samples (9.3%), and only one sample (0.5%) was equivocal.

RSV was detected in a total of 50 cases (27%), followed by influenza A virus in 11 (6%), PIV3 in four (2.2%), adenovirus in three (2%), PIV1 in two (1.1%), PIV2 in two (1.1%), and influenza B virus in one (0.5%). No samples that were hMPV-positive by both techniques were positive for other viruses, including RSV. Only one real-time RT-PCR-positive sample was positive for RSV. Two EIA hMPV-positive/hMPV real-time RT-PCR-negative samples were co-infected with influenza A virus.

In order to evaluate the agreement between EIA and real-time RT-PCR results, the equivocal EIA results and those of inhibited real-time RT-PCR were not included in the calculations.

This resulted in 162 samples being used for the calculations. Ultimately, for samples that could be categorized using both methods, we found a concordance of 94% (152/162) ($\kappa = 0.633$ (standard error: 0.101)). Ten specimens (6%) (Table 1) were found to be positive with both assays. Discordant results between EIA and real-time RT-PCR were found in another ten specimens. Of these, three (2%) were real-time RT-PCR-positive but antigen-negative, and seven (4.3%) were antigen-positive but real-time RT-PCR-negative.

Correlation with clinical data

The spectrum of disease severity caused by hMPV is similar to that of RSV [1,18]. In our children, hMPV-infected children were older than RSV-infected children (9.2 ± 8.1 months vs. 6.3 ± 7.3 months), with statistically significant differences ($p 0.042$), but we found no other significant differences regarding the severity of symptoms, with similar levels of fever ($38.6 \pm 0.86^\circ\text{C}$ vs. $38.2 \pm 1.0^\circ\text{C}$), similar analytical values (leukocytosis, 12 350 vs. 11 900; C-reactive protein levels, 27 mg/L vs. 33.4 mg/L; and procalcitonin levels, 0.63 ng/mL vs. 0.52 ng/mL), and similar days of hospitalization and oxygen therapy (5 and 2 days in the two groups, respectively).

However, there are clear differences in their seasonal distribution. RSV cases were detected only between November and March, with 86% of cases occurring between November and January, whereas we detected cases of hMPV infection between September and May, without a clear predominance of any particular month (Fig. 1).

To analyse the results in terms of hMPV detection, and in order to avoid bias in the results, the patients with RSV

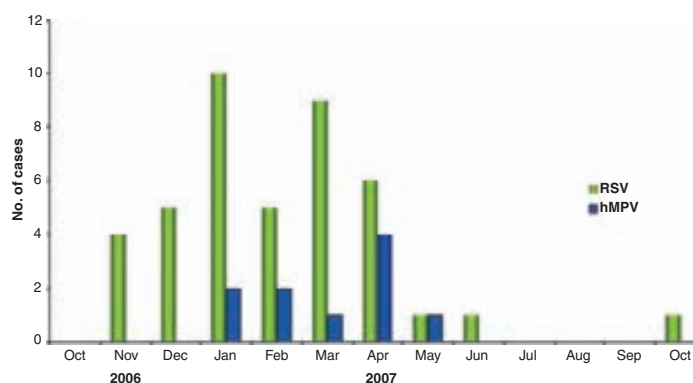


FIG. 1. Seasonality of human metapneumovirus (hMPV) and respiratory syncytial virus (RSV) infection from October 2006 to October 2007.

infection were excluded. If a true hMPV infection was considered to be an infection in which a sample was positive by both techniques (real-time RT-PCR and EIA), the children with hMPV infection required oxygenotherapy more frequently than children who were not infected with hMPV (p 0.001). In contrast, there was no difference between children with and without hMPV in terms of days of hospitalization (p 0.288).

If samples that were hMPV-positive only by real-time RT-PCR were considered, children with hMPV infection required oxygenotherapy more frequently than children who were not infected with hMPV (p 0.005). There was no difference in days of hospitalization (p 0.059). On the other hand, if samples that were hMPV-positive only by EIA were considered, there were no significant differences in oxygenotherapy (p 0.061) or in hospitalization days (p 0.356). There were also no significant differences (oxygenotherapy, p 0.115; days of hospitalization, p 0.106) between samples that were positive by at least one of the two techniques.

Discussion

Acute respiratory tract infections are important causes of morbidity and mortality in children. hMPV is an emerging pathogen that has been associated with symptoms ranging from mild upper respiratory tract infections to severe pneumonia, exacerbation of asthma, and chronic obstructive pulmonary disease [3,19–22].

hMPV was not isolated until recently, because of the difficulty in growing in traditional cell cultures, although it shows slow growth in the rhesus monkey kidney (LLC-MK2) cell line [14]. The hMPV assays described by van den Hoogen *et al.* have been used in several other studies [6,23]. In all these studies, RT-PCR was performed with detection by agarose gel electrophoresis followed by sequencing or hybridization to confirm an hMPV-positive sample. Currently, only a few studies have been performed using commercial assays.

We evaluated two new commercial assays for hMPV detection, a real-time RT-PCR and an EIA. hMPV was detected in 8% of the cases with the real-time RT-PCR, and in 9.3% of the cases with the EIA. The range of incidences observed in the present study (8–9.3%) is in accordance with the range of 5–10% observed among hospitalized infants with acute respiratory tract infections in Spain [24] and other countries [4,25,26].

A previous study in Catalonia [27] found an hMPV infection rate of 25%. However, in this study, the rate reflects only the first half of the year, corresponding to the peak

infection period, thus increasing the proportion of hMPV cases.

The comparison of hMPV EIA results with those of real-time RT-PCR in the detection of hMPV indicates a good correlation between the techniques (94%).

A previous evaluation of hMPV EIA [28] found that the sensitivity of hMPV EIA sensitivity was lower than that of an 'in-house' RT-PCR. However, the majority of hMPV EIA-negative and RT-PCR/cell culture-positive samples had been frozen for at least 4 years, and this may have led to antigen degradation and could potentially have affected antigen detection. In our study, three samples were hMPV real-time RT-PCR-positive but EIA-negative. It is possible that a low viral load in these samples might limit detection by EIA, as has been reported by Kukavica-Ibrulj *et al.* [28]. On the other hand, six samples were hMPV-positive only by EIA. It cannot be excluded that the RNA could have been degraded in frozen samples, thereby diminishing the yield. One of these hMPV EIA-positive samples had blood contamination. The manufacturer has indicated that the presence of blood in the sample may have led to false-positive results. The genotype of hMPV may change in consecutive respiratory tract virus seasons. Recently, Huck *et al.* [29] described a novel hMPV sublineage within the A2 group, which they divided into A2a and A2b. It is possible that hMPV EIA detects a higher proportion of these sublineages. On the other hand, PCR methods have inherently greater sensitivity than the analytical immune-based methods. As the manufacturer indicates, the limit of detection, expressed as a median tissue culture infective dose (TCID), of hMPV real-time RT-PCR is 10^1 – 10^2 TCID₅₀/mL, and that of hMPV EIA is 10^4 TCID₅₀/mL. For this reason, we cannot rule out the possibility that hMPV EIA-positive and real-time RT-PCR-negative samples are false positives. Interestingly, none of the patients with samples positive only by EIA required supplemental oxygen, as compared with the majority of children who were hMPV-positive by both techniques. Further investigations are required.

In our experience, hMPV was involved in severe respiratory infections that required oxygen treatment, although there were no deaths. Our results showed that oxygen treatment was necessary in 35% of all cases. This percentage is lower than that previously reported by Mullins *et al.* [30] (54%) and do Carmo *et al.* [26] (70%), who analysed a similar population. Given the low number of positive samples, the percentage of children with oxygen treatment might have been underestimated. However, children with hMPV-positive samples by both real-time RT-PCR and EIA required oxygenotherapy more frequently than children who were not infected with hMPV (p 0.005).

The detection of viruses in nasopharyngeal aspirates provides only indirect evidence of the aetiology of respiratory infection. Viral quantification and serial monitoring contribute to the management and diagnosis of viral infections. However, in our experience, in agreement with previous reports, hMPV is not frequently detected in samples from healthy children (unpublished data). The fact that hMPV is commonly found in association with respiratory illness, but not in asymptomatic children and adults, supports its role as a true pathogen [22,31].

Previous studies have suggested that dual infection with hMPV and other respiratory viruses is frequent [24,32]. Moreover, other studies have indicated that co-infection with RSV is more severe than hMPV or RSV infection alone [4,32]. However, a relatively low co-infection rate was found in our patients. Other respiratory viruses were detected in three (15%) hMPV-positive samples, and only one of these co-infections involved RSV.

Because the different methods used for detecting a wide range of respiratory viruses have various sensitivity rates, the exact contribution of each virus to respiratory tract disease remains difficult to assess. Nevertheless, our results, in agreement with previous reports, indicate that RSV is the most common virus, in that it causes lung and airway infections in infants and young children.

Moreover, hMPV infection was more common than adenovirus, influenza virus and PIV infections. This study, in agreement with previous studies [4,33], has demonstrated the prevalence of major respiratory viruses that cause infections in hospitalized children.

The main limitation of our study is the lack of a reference method (viral culture) for better analysis of the discordant results obtained with RT-PCR and EIA. Despite this limitation, our study provides relevant data related to the clinical utility of the tests evaluated for the detection of hMPV in clinical samples.

Molecular methods have been considered to be the reference standard methods for hMPV detection, in light of the slow replication of this virus in viral culture. However, culture-based methods require expensive laboratory equipment and carefully trained personnel.

The EIA technique is a more rapid, less expensive and highly specific method for detection of hMPV in clinical samples, and it can be used in microbiology laboratories without a molecular platform. The Biotrin hMPV EIA is a convenient alternative to PCR for the detection of hMPV with excellent specificity.

In our experience, real-time RT-PCR and EIA are a good alternative methods for the diagnosis of hMPV infection. Our results, in agreement with previous reports, indicate that

hMPV is one of the leading causes of lower respiratory tract infections in young children. The inclusion of new techniques for hMPV detection increased the percentage of diagnosis from 36% to 42%, allowing an aetiological diagnosis in 17% of the cases that are negative for other viruses.

With hMPV detection in microbiology laboratories, testing can improve the aetiological diagnosis of acute respiratory infections in children.

Acknowledgements

The authors would like to thank Inverness Medical Ibérica S.A.U. (Barcelona, Spain), for providing the hMPV EIA Biotrin kits required for the study. Loreto Fuenzalida is funded by a Presidente de la República de Chile (CONICYT) scholarship from the Chilean State.

Transparency Declaration

The authors report no conflicts of interest.

References

1. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7: 719–724.
2. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G et al. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology* 2003; 315: 1–9.
3. van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: S25–S32.
4. Foulongne V, Guyon G, Rodiere M, Segondy M. Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25: 354–359.
5. Matsuzaki Y, Itagaki T, Abiko C, Aoki Y, Suto A, Mizuta K. Clinical impact of human metapneumovirus genotypes and genotype-specific seroprevalence in Yamagata, Japan. *J Med Virol* 2008; 80: 1084–1089.
6. Boivin G, Abed Y, Pelletier G et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new parmyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 2002; 186: 1330–1334.
7. Ebihara T, Endo R, Kikuta H et al. Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan. *J Med Virol* 2003; 70: 281–283.
8. Galiano M, Videla C, Puch SS, Martinez A, Echavarría M, Carballal G. Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina. *J Med Virol* 2004; 72: 299–303.
9. Pavlin JA, Hickey AC, Ulbrandt N et al. Human metapneumovirus reinfection among children in Thailand determined by ELISA using purified soluble fusion protein. *J Infect Dis* 2008; 198: 836–842.
10. Ulloa-Gutierrez R, Skippen P, Synnes A et al. Life-threatening human metapneumovirus pneumonia requiring extracorporeal membrane oxygenation in a preterm infant. *Pediatrics* 2004; 114: e517–e519.
11. Schildgen O, Geikowski T, Glatzel T, Schuster J, Simon A. Frequency of human metapneumovirus in the upper respiratory tract of children

- with symptoms of an acute otitis media. *Eur J Pediatr* 2005; 164: 400–401.
12. Williams JV. Human metapneumovirus: an important cause of respiratory disease in children and adults. *Curr Infect Dis Rep* 2005; 7: 204–210.
13. Don M, Korppi M, Valent F, Vainionpää R, Canciani M. Human metapneumovirus pneumonia in children: results of an Italian study and mini-review. *Scand J Infect Dis* 2008; 40: 821–826.
14. Deffrasnes C, Cote S, Boivin G. Analysis of replication kinetics of the human metapneumovirus in different cell lines by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 488–490.
15. Reina J, Ferrer F, Alcoceba E, Mena A, de Gopegui ER, Figuerola J. Comparison of different cell lines and incubation times in the isolation by the shell vial culture of human metapneumovirus from pediatric respiratory samples. *J Clin Virol* 2007; 40: 46–49.
16. Percivalle E, Sarasini A, Visai L, Revello MG, Gerna G. Rapid detection of human metapneumovirus strains in nasopharyngeal aspirates and shell vial cultures by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3443–3446.
17. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33: 159–174.
18. Wilkesmann A, Schildgen O, Eis-Hubinger AM *et al.* Human metapneumovirus infections cause similar symptoms and clinical severity as respiratory syncytial virus infections. *Eur J Pediatr* 2006; 165: 467–475.
19. Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* 2003; 111: 1407–1410.
20. Kahn JS. Human metapneumovirus: a newly emerging respiratory pathogen. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 255–258.
21. van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L *et al.* Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 658–666.
22. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ *et al.* Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004; 350: 443–450.
23. Stockton J, Stephenson I, Fleming D, Zambon M. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 897–901.
24. Garcia-Garcia ML, Calvo C, Perez-Brena P, De Cea JM, Acosta B, Casas I. Prevalence and clinical characteristics of human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41: 863–871.
25. Deffrasnes C, Hamelin ME, Boivin G. Human metapneumovirus. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28: 213–221.
26. do Carmo Debur M, Bordignon J, Duarte dos Santos CN *et al.* Acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in southern Brazil. *J Clin Virol* 2007; 39: 59–62.
27. Camps M, Ricart S, Dimova V *et al.* Prevalence of human metapneumovirus among hospitalized children younger than 1 year in Catalonia, Spain. *J Med Virol* 2008; 80: 1452–1460.
28. Kukavica-Ibrulj I, Boivin G. Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal aspirates using an enzyme immunoassay. *J Clin Virol* 2009; 44: 88–90.
29. Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weigl J, Falcone V. Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 147–150.
30. Mullins JA, Erdman DD, Weinberg GA *et al.* Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 700–705.
31. Falsey AR, Criddle MC, Walsh EE. Detection of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus by reverse transcription polymerase chain reaction in adults with and without respiratory illness. *J Clin Virol* 2006; 35: 46–50.
32. Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 372–375.
33. Zhang HY, Li ZM, Zhang GL, Diao TT, Cao CX, Sun HQ. Respiratory viruses in hospitalized children with acute lower respiratory tract infections in Harbin, China. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62: 458–460.

4.2 Artículo 2

Human bocavirus 1 infection in hospitalized children: epidemiological and clinical characterization of a newly emerging respiratory virus.

Loreto Fuenzalida, Jordi Fàbrega, Silvia Blanco, Elisa Martró, Cristina Prat, M. Mar Martínez-Colls, Meissiner Gomes-Fernandes, Jose Domínguez, Carlos Rodrigo and Vicente Ausina.

The pediatric Infectious Disease Journal. Submitted.

El bocavirus humano tipo 1 (HBoV1) es un virus emergente, descubierto en el año 2005 en niños con infección del tracto respiratorio [14]. Debido a la frecuente detección codetección con otros virus y su presencia en niños sanos, la relevancia clínica de este virus aún no ha sido esclarecida.

El objetivo de este trabajo fue estudiar las características clínicas, epidemiológicas y moleculares de este nuevo virus respiratorio en niños hospitalizados y determinar su papel patogénico en las infecciones respiratorias. Se estudiaron un total de 270 muestras de NPA de niños menores de 5 años hospitalizados por RTI o sospecha de sepsis y 51 muestras de niños sanos. Se determinó la presencia de HBoV1 mediante PCR. En las muestras positivas para HBoV1 se determinó la carga vírica mediante PCR a tiempo real y se estudió la filogenia de los virus detectados mediante secuenciación.

El HBoV1 fue más frecuentemente detectado en niños hospitalizados que en niños sanos (24% vs 12%, $P=0.046$) y fue el segundo virus mas frecuente después del VRS, encontrándose principalmente en meses de invierno. HBoV1 fue detectado en un 56% junto a otros virus respiratorios. Sin embargo, ajustado por edad y sexo del paciente, la detección de HBoV1 como único agente etiológico fue asociado con infecciones respiratorias. No se encontró asociación entre una alta carga vírica y la gravedad del paciente. Los análisis filogenéticos confirmaron la circulación simultánea de los grupos ST1 y ST2 descubiertos hasta ahora. En conclusión, HBoV1 es frecuentemente encontrado en niños hospitalizados con infecciones agudas del tracto respiratorio inferior. A pesar de la elevada tasa de detección junto a otros virus, nuestros resultados sugieren que HBoV1 podría jugar un papel como agente etiológico de las infecciones respiratorias en niños.

Human bocavirus 1 infection in hospitalized children: epidemiological and clinical characterization of a newly emerging respiratory virus.

Loreto Fuenzalida^{*1}, Jordi Fàbrega², Silvia Blanco^{1,3}, Elisa Martró^{1,4}, Cristina Prat-Aymerich^{1,3}, M. Mar Martínez-Colls², Meissiner Gomes-Fernandes¹, Jose Domínguez^{1,3}, Carlos Rodrigo² and Vicente Ausina^{1,3}.

1 Servei de Microbiologia, 2 Servei de Pediatria, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona. Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain. 3 CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. 4 CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, Spain.

Background. Human bocavirus 1 (HBoV1) has recently been detected in children with respiratory tract infections (RTI). Due to the frequent co-detection of other viruses and its detection in healthy children, the clinical relevance of this virus is not yet clear. The aim of our study was to describe the clinical, epidemiological and molecular characteristics of HBoV1 in hospitalized children and to determine its pathogenic role in RTI.

Methods. A total of 270 samples of nasopharyngeal aspirates from children <5 years hospitalized for RTI or suspected sepsis with respiratory symptoms, and 51 samples from healthy children were studied. HBoV1 detection was performed using conventional PCR. Viral load quantification by real-time PCR and phylogenetic analysis of HBoV1 sequences were performed.

Results. HBoV1 was more frequently detected in hospitalized children than in healthy children (24% vs 12%, $P=0.046$). It was the second most frequent virus after respiratory syncytial virus, occurring in winter months. HBoV1 was detected in 56% of the cases together with other viruses. Controlled for age and gender, the detection of HBoV1 as a sole agent was associated with RTI. A high viral load was not associated with the severity of the disease. Phylogenetic analysis confirmed the co-circulation of both HBoV1 ST1 and ST2 genotypes described so far.

Conclusions. HBoV1 was frequently found in children hospitalized with acute lower RTI. Despite the high rate of co-detection, our results suggest that HBoV1 may play a role as an etiologic agent of RTI in children.

Keywords: Human bocavirus 1, Emerging viruses, Respiratory tract infection, Viral load, Children.

Respiratory tract infections are a major cause of human morbidity and are caused by broad spectrum of microbial agents. New viruses that potentially play a role in infectious respiratory illness are increasingly being recognized through sensitive methods of viral detection. Human bocavirus 1 (HBoV1) is a respiratory virus discovered in 2005¹ and classified in the *Parvoviridae* family, *Bocavirus* genus. Furthermore, 3 other bocavirus, HBoV2, 3, and 4, were recently detected in human samples. Contrary to HBoV1, HBoV2-4 seem to occur mainly in human stool²⁻⁶ but rarely also in the respiratory tract^{7, 8}. HBoV1 has been found

worldwide, mainly in respiratory specimens from children⁹⁻¹². Nevertheless, it has also been detected in serum, stool and urine samples¹³⁻¹⁵ suggesting that HBoV1 can cause a systemic infection, like most parvoviruses^{13, 16}.

HBoV infections are frequently detected in children less than 2-year-old with upper or lower respiratory tract illness, often in combination with other respiratory viruses 1, 14, 15. In fact, HBoV has been detected concurrently with other potential pathogens in 33%-56% of cases in which it was studied 10-12, 17 and may often be found also in asymptomatic children 18-20.

Thus, whether HBoV1 is a relevant respiratory pathogen or whether it is only an innocent bystander remains questionable.

In order to get a better understanding on the epidemiological pattern and clinical relevance of HBoV1 infection, we investigated the prevalence, co-detection with other respiratory viruses, viral load and phylogenetic classification of HBoV1 in respiratory specimens obtained from both symptomatic and asymptomatic children.

Material and methods

Patients and samples. From October 2006 to March 2008, a total of 270 nasopharyngeal aspirate (NPA) specimens were collected from 249 children less than 5 years who were hospitalized with RTI or clinical sepsis with some respiratory symptoms. Upper respiratory tract infections (URTI) were diagnosed when rhinitis, pharyngitis and/or otitis media were found without signs of low respiratory tract infections (LRTI). Patients with URTI were hospitalized when presenting high fever and/or seizures. LRTI was diagnosed in the presence of dyspnea, signs of lower airway obstruction (wheezing, retractions) and/or a positive chest X-ray (infiltrates, atelectasis and air trapping) and classified as bronchiolitis, bronchopneumonitis, pneumonia or recurrent wheezing. Clinical sepsis was diagnosed in the presence of signs of sepsis (fever and non-specific tachycardia or tachypnea). Clinical and demographic characteristics of each patient were recorded. Disease severity was determined by number of hospitalization and oxygen therapy days. Oxygen therapy was provided to achieve an oxygen saturation $\geq 92\%$. Children with bacterial RTI were excluded. A control group (n=51) was included prospectively and consisted of children less than 5 years admitted for elective surgery or a routine healthy-child visit who had no symptoms of RTI in the last 2

weeks. Informed consent was obtained from the patients' parents. The Ethical Committee of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol approved the study protocol.

Complementary microbiological studies.

Antigen detection was carried out as part of the daily laboratory routine and mainly performed within 24 h after sample collection. Immunochromatographic test (Binax Now, Portland, ME, USA) was used for respiratory syncytial virus (RSV) and influenza A and B detection. In negative samples, an indirect immunofluorescence method (Chemicon International, Temecula, USA) was used to detect RSV, influenza A and B, Parainfluenza (PIV) 1 to 3, and adenovirus. Human metapneumovirus (HMPV) was detected by real-time RT-PCR using the Pro HMPV real time Assay Kit (Prodesse Inc., Waukesha, WI, USA) as previously described²¹. Aliquots of each sample were stored at -80°C until testing by HBoV1 PCR.

Qualitative PCR detection of HBoV1. Nucleic acids were extracted from 200 μl of the NPA samples using the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. As shown, the viral RNA Mini kit can be used for the simultaneous extraction of RNA and DNA²². Nucleic acids were then eluted in 50 μl RNase-free water and stored at -80°C until use. Amplification of HBoV1 DNA by conventional qualitative PCR was performed with the NP-1 primers 188F and 542R described previously by Allander *et al.*¹.

Quantitative real-time HBoV1 PCR. In order to generate a standard curve, the 354 bp product obtained by conventional PCR of a random specimen was purified with QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany), cloned into the pCR2.1-TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and verified by

sequencing. The pCR2.1-HBoV1 plasmid was purified from transformed *Escherichia coli* as described by Sambrook and Russell²³, and quantified using NanoDrop[®] ND-1000 spectrophotometer. Serial 10-fold dilutions of the pCR2.1-HBoV1 plasmid were prepared to generate the standard curve.

For quantitative analysis, only HBoV1 positive samples by qualitative PCR from both symptomatic and asymptomatic children were analyzed by a real-time PCR assay. The real-time PCR assay was performed using previously reported primers BoV2391s and BoV2466a, and probe BoV2411s-TM²⁴. These primers amplified a fragment from the region of the NP-1 gene used for the qualitative PCR. For checking the quality of each DNA sample, quantitative detection of the RNase P human gene per ml of sample was also carried out using the TaqMan RNase P Detection Reagents Kit according to manufacturer's recommendations (Applied Biosystems, Carlsbad CA, USA). Quantitative PCR results were finally expressed as the number HBoV1 genomes per ml of NPA. The viral load of each sample was grouped in two categories: high ($>10^4$ copies/ml) and low ($<10^4$ copies/ml) viral load as described by Allander *et al.*¹³.

DNA Sequencing and phylogenetic analysis.

Kimura 2-parameter nucleotide substitution model. The robustness of the tree topology was assessed by bootstrap analysis with 1000 resamplings of the sequences and values above 70% were considered reliable. All phylogenetic analyses were performed with MEGA4 program²⁶ and the HBoV1 sequences obtained have been deposited in the EMBL Nucleotide Sequence Database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) (accession numbers HE586310-HE586320).

Statistical analysis. Chi-squared, Fisher's exact test, Spearman correlation and Mann-

Whitney *U*-test were carried out when appropriate. Probability (*P*) value <0.05 was regarded as statistically significant. Multivariate logistic regression was used to estimate the association between (i) RTI and HBoV1 infection, and (ii) HBoV1 viral load and oxygen therapy and hospitalization days. These analyses were controlled for differences in age, gender and the presence of other viruses among cases and controls. We reported the odds ratio (OR) with 95% confidence interval (95% CI) and the corresponding *P*-value. All analyses were performed using STATA 9.2 program (Stata Corp., College Station, Texas, USA).

RESULTS

Patient and viral screening

The median age in patient group was 5 months (range, 0.3 to 57 months) and 56% were male. URTI was detected in 31 (11.5%), LRTI in 210 (77.8%), sepsis in 29 (10.7%) cases. A viral pathogen was identified in 64% of the 270 hospitalized children (Table 1). RSV (36%) was the most frequently found virus. Sixty-six samples (24%) were positive for HBoV1. HBoV1 was the only virus detected in 29 samples (11% of all samples and 44% of the HBoV1-positive samples), whereas ≥ 1 additional viral agent was detected in the remaining 37 HBoV1-positive samples (1 virus in 95% and 2 viruses in 5% of cases). The viruses most frequently associated with HBoV1 were RSV (54%) and adenovirus (16%). In asymptomatic children the median age was 9 months (range, 0.8 to 57 months). A viral pathogen was detected in 9 cases (18%). HBoV1 was detected in 6 samples (12%) of asymptomatic children; in one of them, RSV was co-detected. HBoV1 was significantly more prevalent in the patient group than in the healthy control group ($P=0.046$).

Clinical and epidemiological characteristics for HBoV1-positive patients. The 66 HBoV1-positive hospitalized children had a median age

Table 1. Viral detection in nasopharyngeal aspirates from hospitalized children.

| Virus | No. (%) of positive cases | No. (%) of cases with the indicated as single virus infections |
|---------------------------|---------------------------|--|
| RSV | 98 (36) | 75 (28) |
| HBoV1 | 66 (24) | 29 (11) |
| HMPV | 21 (8) | 17 (6) |
| Influenza A and B viruses | 12 (4) | 7 (3) |
| Adenovirus | 9 (3) | 3 (1) |
| PIV type 1-3 | 6 (2) | 3 (1) |

of 11 months (range, 0.6 to 30 months), being more frequent in children older than 6 months ($P<0.001$). Ratio of boys to girls was 1.0 and the median duration of hospital stay was 4.3 days (range, 2 to 10 days). LRTI was the most frequent infection (77%), being bronchiolitis the leading diagnosis (55%). URTI was present only in 8% of cases. Clinical sepsis was uncommon (3%). Predominant symptoms were cough (88%), respiratory distress (76%) and temperature above 38°C (73%). Chest radiographs were performed for 47 HBoV1-infected children, and 35 of them (73%) showed abnormal findings (condensation in 40%).

The monthly distribution of HBoV1-positive samples is displayed in Figure 1. HBoV1 was detected from October to April first and October to March in the second period. The seasonal distribution of HBoV1-positive samples closely resembled the distribution of all respiratory viruses during two consecutive winters, with a maximum detection in December. Overall, 36 (71%) of the 51 specimens collected from asymptomatic children were obtained during months in which HBoV1 was detected in hospitalized children.

Comparison of clinical data of children with either HBoV1 or RSV single infections is presented in Table 2. Temperature above 38°C

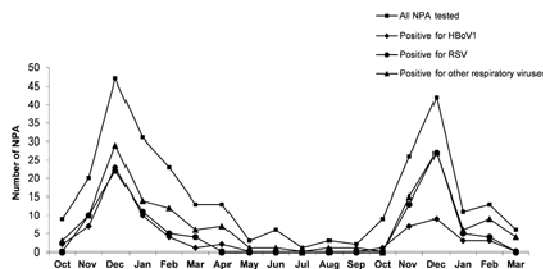


Figure 1. Monthly distribution of viral respiratory pathogens detected in two consecutive winters. NPA, nasopharyngeal aspirate; HBoV1, human bocavirus 1; RSV, respiratory syncytial virus.

was more frequent in the HBoV1 group than in the RSV group. However, cough was more frequent in the RSV than in the HBoV1 group ($P=0.037$). Bronchiolitis was the most common diagnosis in both groups, however, it was more frequent in the RSV than in the HBoV1 group ($P=0.007$). Children with RSV single infection had more hospitalization and oxygen therapy days than those with HBoV1 single infection ($P<0.007$ and $P=0.042$ respectively). Children with RSV single infection were significantly younger than those with HBoV1 ($P<0.001$). Age distribution of patients with HBoV1 and RSV infection are presented in Figure 2. In a multiple logistic regression analysis controlled by age, gender and presence of the other viruses, we found that HBoV1 alone was associated with RTI (OR: 9.17, 95% CI: 2.1-39.8, $P=0.003$).

Quantitative analysis of HBoV1 DNA.

Quantitative HBoV1 results were available for 51 HBoV1-positive specimens with enough DNA of hospitalized children. The median viral load was 2.0×10^4 copies/ml (range, 69 to 1.1×10^{11} copies/ml). In asymptomatic children, the median viral load was 2.4×10^3 copies/ml (range, 2.8×10^2 to 6.1×10^4 copies/ml). Thirty (59%) of 51 samples of hospitalized children showed high HBoV1 loads ($>10^4$ copies/ml) whereas only one (17%) of 6 asymptomatic children showed similar levels ($P=0.021$).

Table 2. Clinical data of children with single human bocavirus 1 (HBoV1) and respiratory syncytial virus (RSV) detection.

| Clinical feature | HBoV1 (n=29), n (%) | RSV (n=75), n (%) | P value |
|--|---------------------------|-------------------------|-------------------|
| Age (months), median (range) | 11 (1-39) | 3(0.3-32) | < 0.001 |
| Male, gender | 21 (72.4) | 49 (65.3) | 0.490 |
| Temperature >38°C | 20 (68.9) | 34 (45.3) | 0.031 |
| Diarrhea | 1 (3.4) | 4 (5.3) | > 0.999 |
| Cough | 24 (82.7) | 72 (96.0) | 0.037 |
| Respiratory distress | 21 (72.4) | 65 (86.6) | 0.085 |
| Diagnosis | | | |
| Pneumonia | 4 (13.7) | 0 (0) | 0.005 |
| Bronchiolitis | 18 (62.0) | 62 (82.6) | 0.007 |
| Bronchopneumonitis | 1 (3.4) | 5 (6.6) | > 0.999 |
| Acute wheezing | 4 (13.7) | 5 (6.6) | 0.261 |
| URTI | 1 (3.4) | 1 (1.3) | 0.467 |
| Sepsis | 1 (3.4) | 2 (2.6) | 0.999 |
| Days in hospital, median (range) | 3 (1-8) | 4 (1-17) | < 0.007 |
| Days of Oxygen therapy, median (range) | 0.5 (0-4) | 1.7(0-15) | 0.042 |
| Antibiotic therapy | 9 (31.0) | 12 (16.0) | 0.087 |
| Anomalous chest radiograph ^a | 15 (68.1) | 28 (66.6) | 0.092 |

Because it was found previously that a large number of HBoV1 DNA-positive children were coinfecting with other respiratory pathogens (56% of HBoV1-positive samples), viral loads in NPA samples of children with coinfections were

compared to viral loads of children without detectable coinfection. Median values between both groups were not significantly different (median with coinfection: 1.48×10^4 copies/ml; median without coinfection: 8.24×10^4 copies/ml; $P=0.223$). In order to examine possible indications for an association of viral load of hBoV with the disease severity, the viral loads in NPA samples were compared with respect to the number of hospitalization and oxygen therapy

days. No correlation was found between the viral load and oxygen therapy and hospitalization days ($P=0.339$). In turn, no correlation was found between the number of the recovered respiratory epithelial cells (as determined by the quantification of RNase P human gene) and viral load (Spearman's $\rho=0.242$, $P=0.069$). The number of recovered respiratory epithelial cells in HBoV1-negative samples (range, 10^4 - 10^6 cell/ml) was similar to HBoV1-positive samples (range, 10^4 - 10^7 cell/ml), indicating a good specimen quality.

Phylogenetic analysis of VP1/VP2 genes of HBoV1. The HBoV1 VP1/VP2 genes from 11 samples with enough DNA were amplified and sequenced. Phylogenetic analysis resulted in two clusters of sequences with a bootstrap value of 99% (Fig. 3). VP1/VP2 genes of HBoV1 strains detected were closely related with reference strains, ST1 and ST2, and also with previously published isolates from North America and France.

DISCUSSION

We detected the HBoV1 DNA in the nasopharynx of 24% of children less than 5 years who were hospitalized with RTI or clinical sepsis with some respiratory symptoms. This is the highest prevalence of HBoV1 infection detected both in Spain and in the studies published so far. Worldwide variations in the

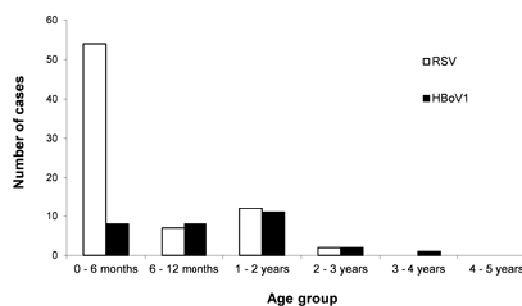


Figure 2. Age distribution of patients with HBoV1 and RSV infection. HBoV1, human bocavirus 1; RSV, respiratory syncytial virus.

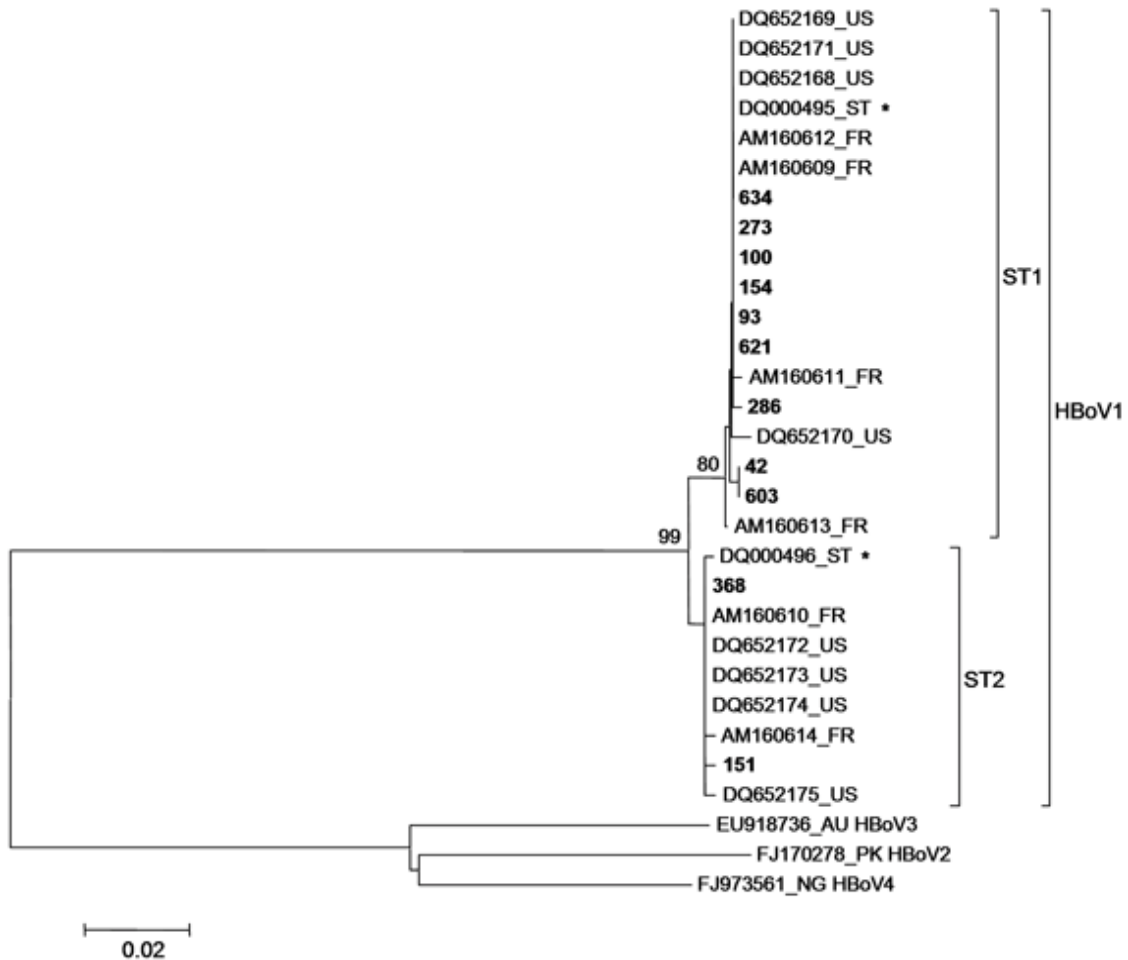


Figure 3. Unrooted phylogenetic tree of HBoV1 sequences of the VP1/VP2 genes. Samples with numbers in boldface were sequenced in this study. The remaining sequences are identified by the GenBank accession number and country of origin. The reference sequences for each genotype are indicated with an asterisk. The tree was obtained with the Neighbor-Joining method using the Kimura 2-parameter nucleotide substitution model. Those nodes with a bootstrap support value >70% are indicated. The scale represents the number of nucleotide substitutions per position.

prevalence of HBoV are reported to be 1.5%–19%^{13, 17, 27}. This variation may be due to differences in the characteristics of the study populations and collection time of respiratory specimens^{1, 11, 28}. One study in Spain included a broad selection of respiratory samples²⁹ and

three reports included patients less than 14 years³⁰⁻³². Moreover, some studies in other countries have included adults, outpatients^{9, 11} or only patients with acute wheezing¹³. In

addition, the results may be influenced by the sensitivity of the HBoV PCR assays used. Thus, it is difficult to compare patient populations in the HBoV studies.

Many studies have shown a comparably low HBoV1 prevalence among the youngest children below 6 months^{1, 10, 33, 34} suggesting some degree of protection from maternal antibodies. In this study, the median age of HBoV1-infected

children was 11 months, being in accordance to this hypothesis.

We used conventional PCR method for detection of HBoV1 and real-time PCR method for quantitative analysis. However, in a previous study the proportions of positive results obtained with the two methods were not significantly different²⁴. In contrast to the PCR methods used for HBoV1 and HMPV, the other respiratory viruses in our study were examined by ICT/IFA. In general, PCR assays are more sensitive than antigen detection methods³⁵. Therefore, prevalence of the respiratory viruses that were analysed by ICT/IFA could be higher than reported here. However, we obtained a good correlation when compared ICT and IF with the molecular technique xTAG RVP (Luminex Corporation, Austin, TX) for detection of RSV and a moderate correlation for adenovirus and influenza virus (data not shown). Although RSV was the most frequently identified virus, supporting its role as the main virus associated with RTI in young children³³, our data indicated that HBoV1 was the second most frequently detected which is in accordance with previous reports^{1, 10, 36}. Several respiratory pathogens such as coronaviruses, rhinoviruses and enteroviruses were not tested in our study and additional coinfections remained undetected. Considering this limitation, our data do not indicate that HBoV1 replication is influenced by the presence of other respiratory viruses. Our study suggest that HBoV1 could be an etiological agent of respiratory tract disease, because detection of the virus alone was significantly associated with RTI ($P=0.003$).

Our data show that HBoV1 infection has a seasonal distribution. It was detected from autumn to spring, mainly in winter, which indicates an epidemiologic similarity with RSV and in general with other major respiratory viruses. This finding is in agreement with other studies^{1, 11, 14}.

HBoV1 was more prevalent in patients with RTI than in asymptomatic children ($P=0.046$). In our study, specimens of 71% of asymptomatic children were collected during the months in which HBoV1 was detected in symptomatic children. HBoV1 detection in asymptomatic children might be due to prolonged shedding from a previous illness as described previously¹⁹. A large number of mixed infections were observed with HBoV1. Despite the relatively high co-detection rate, our results suggest a potential etiologic role for HBoV1 in RTI in children.

A comparative analysis of the clinical characteristics of HBoV1 and RSV in single infections was performed. As expected, a more severe disease was found in patients with RSV single infection than in HBoV1 single infection. Children with RSV single infection had more hospitalization and oxygen therapy days than those with HBoV1 single infection ($P<0.007$ and $P=0.042$ respectively).

Allander *et al*¹³ previously defined two subgroups characterized by HBoV1 DNA levels lower or higher than 10^4 copies/ml. According to this study, an HBoV1 DNA level higher than 10^4 copies/ml corresponds to a high viral load and is significantly associated with symptoms. Based on the hypothesis that high viral loads may be an indication of pathogenic relevance, we compared the HBoV1 viral load in NPA according to severity of disease. However, in our study no correlation between viral load and severity of disease, similar to described by Flores *et al*³⁷.

Our findings indicate that the two genotypes of HBoV1 identified in our study are closely related to the initial strains of HBoV1 identified in Sweden¹ and comparable with strains of other countries. This suggests that the nucleotide sequences of the VP1/VP2 genes are highly

conserved among viruses circulating in different geographical locations.

The diagnostic criteria for a bocavirus infection are currently unsettled. Using only HBoV-positive PCR results in NPAs as the criterion, some cases of acute HBoV infection (evidenced by viremia and/or serodiagnostic findings) would be missed³⁸. Furthermore, a number of false diagnoses would be obtained, perhaps as the result of persisting HBoV DNA or mucosal contamination. Kantola *et al*³⁸ found that respiratory infections due to HBoV are systemic, elicit B cell immune responses, and can be diagnosed serologically. Serological testing should be included in diagnostics, to strengthen the causal association between HBoV and respiratory disease. Whether, and in which context and to what extent, this virus affects immunocompromised individuals, pregnant women, and elderly individuals is currently unknown. Additional knowledge of the neutralizing capacity and the longevity of HBoV1 immunity is also required.

In conclusion, in the population studied (children below 5 years) HBoV1 is frequently found in RTI and often simultaneously with other respiratory viruses. Furthermore, our data suggest that HBoV1 could be an etiological agent of RTI in this population. HBoV1 can be detected in healthy children with a significantly lower frequency than in children with RTI. Additional studies are required to completely define the epidemiological profile of this newly recognized pathogen, being probably serodiagnosis the method of choice.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Miguel Pérez for technical assistance and Francisco Zorondo-Rodríguez for statistical assistance. Loreto Fuenzalida is funded by "Presidente de la República de Chile" (CONICYT) scholarship

from the Chilean State. Jose Domínguez and Elisa Martró are researchers funded by the "Miguel Servet" programme of the Instituto de Salud Carlos III (Spain).

Declaration of interest: the authors report no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:12891-12896.
2. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000391.
3. Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. *The Journal of infectious diseases*. 2009;199:196-200.
4. Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *The Journal of infectious diseases*. 2010;201:1633-1643.
5. Chieochansin T, Kapoor A, Delwart E, Poovorawan Y, Simmonds P. Absence of detectable replication of human bocavirus species 2 in respiratory tract. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1503-1505.
6. Chow BD, Ou Z, Esper FP. Newly recognized bocaviruses (HBoV, HBoV2) in children and adults with gastrointestinal illness in the United States. *J Clin Virol*. 2010;47:143-147.
7. Song JR, Jin Y, Xie ZP, et al. Novel human bocavirus in children with acute respiratory tract infection. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:324-327.
8. Han TH, Chung JY, Hwang ES. Human bocavirus 2 in children, South Korea. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1698-1700.
9. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human Bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:848-850.

10. Foulongne V, Olejnik Y, Perez V, et al. Human bocavirus in French children. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1251-1253.
11. Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, et al. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol.* 2006;35:99-102.
12. Weissbrich B, Neske F, Schubert J, et al. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Dis.* 2006;6:109.
13. Allander T, Jartti T, Gupta S, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis.* 2007;44:904-910.
14. Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *The Journal of infectious diseases.* 2006;194:1276-1282.
15. Manning A, Russell V, Eastick K, et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *The Journal of infectious diseases.* 2006;194:1283-1290.
16. Carmichael LE, Schlafer DH, Hashimoto A. Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J Vet Diagn Invest.* 1994;6:165-174.
17. Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, et al. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. *Clin Infect Dis.* 2006;43:585-592.
18. Martin ET, Fairchok MP, Kuypers J, et al. Frequent and prolonged shedding of bocavirus in young children attending daycare. *The Journal of infectious diseases.* 2010;201:1625-1632.
19. von Linstow ML, Høgh M, Høgh B. Clinical and epidemiologic characteristics of human bocavirus in Danish infants: results from a prospective birth cohort study. *The Pediatric infectious disease journal.* 2008;27:897-902.
20. Schildgen O, Muller A, Allander T, et al. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clinical microbiology reviews.* 2008;21:291-304, table of contents.
21. Fuenzalida L, Fàbrega J, Blanco S, et al. Usefulness of two new methods for diagnosing metapneumovirus infections in children. *Clin Microbiol Infect.* 16:1663-1668.
22. Rohayem J, Berger S, Juretzek T, et al. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. *J Virol Methods.* 2004;118:49-59.
23. Sambrook J, Russell DW. Plasmids and their usefulness in molecular cloning. In: Argentine J, Irwing N, Janssen KA, et al., eds. *Molecular Cloning A Laboratory Manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 2001:1.32.
24. Neske F, Blessing K, Tollmann F, et al. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2116-2122.
25. Staden R, Beal KF, Bonfield JK. The Staden package, 1998. *Methods Mol Biol.* 2000;132:115-130.
26. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution.* 2007;24:1596-1599.
27. Smuts H, Hardie D. Human bocavirus in hospitalized children, South Africa. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1457-1458.
28. Hayden FG. Rhinovirus and the lower respiratory tract. *Rev Med Virol.* 2004;14:17-31.
29. Villa L, Melón S, Suárez S, et al. Detection of human bocavirus in Asturias, Northern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;27:237-239.
30. García-García ML, Calvo Rey C, Pozo Sánchez F, et al. Human bocavirus infections in Spanish 0-14 year-old: clinical and epidemiological characteristics of an emerging

- respiratory virus. *An Pediatr (Barc)*. 2007;67:212-219.
31. Pozo F, García-García ML, Calvo C, et al. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol*. 2007;40:224-228.
32. García-García ML, Calvo C, Falcon A, et al. Role of emerging respiratory viruses in children with severe acute wheezing. *Pediatr Pulmonol*.45:585-591.
33. Qu XW, Duan ZJ, Qi ZY, et al. Human bocavirus infection, People's Republic of China. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:165-168.
34. Maggi F, Andreoli E, Pifferi M, et al. Human bocavirus in Italian patients with respiratory diseases. *J Clin Virol*. 2007;38:321-325.
35. Herrmann B, Larsson C, Zwegberg BW. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). *J Clin Microbiol*. 2001;39:134-138.
36. Chung JY, Han TH, Kim CK, Kim SW. Bocavirus infection in hospitalized children, South Korea. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1254-1256.
37. Flores CJ, Vizcaya AC, Araos BR, et al. Human bocavirus in Chile: clinical characteristics and epidemiological profile in children with acute respiratory tract infections. *Rev Chilena Infectol*. 2011;28:504-511.
38. Kantola K, Hedman L, Allander T, et al. Serodiagnosis of human bocavirus infection. *Clin Infect Dis*. 2008;46:540-546.

4.3 Artículo 3

Utility of the rapid antigen detection BinaxNOW Influenza A&B test for detection of novel influenza A (H1N1) virus

Loreto Fuenzalida, Silvia Blanco, Cristina Prat, Marta Vivancos, María Jesús Domínguez, Josep Maria Mòdol, Carlos Rodrigo and Vicente Ausina.

Clinical Microbiology and Infection. 2010. 16:1574-1576.

La aparición y propagación mundial del nuevo virus de la influenza A (H1N1) en Marzo de 2009 [85], causada por un cuádruple reordenamiento del virus, planteó la necesidad de disponer de técnicas de diagnóstico rápido, especialmente al inicio de la pandemia. La reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (rRT-PCR) se considera la técnica de referencia para el diagnóstico de la nueva gripe A H1N1. Se trata de una técnica cara y compleja, no disponible en todos los laboratorios.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de una técnica de detección rápida de antígeno (BinaxNOW® Influenza A&B) diseñada para el diagnóstico de influenza A estacional en el diagnóstico del nuevo virus influenza A (H1N1) 2009. Se incluyeron 512 muestras de NPA (entre junio y noviembre de 2009) de pacientes con sintomatología gripal aguda. Los resultados de la técnica de detección rápida fueron comparados con los obtenidos mediante la técnica de referencia (rRT-PCR) desarrollada por los CDC.

Los resultados indican que el ensayo evaluado es altamente sensible y preciso para la detección del nuevo virus influenza A (H1N1) 2009 en pacientes menores de 18 años de edad y durante la etapa aguda del brote. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad disminuye en población adulta y cuando la prevalencia del virus es menor. El elevado valor predictivo positivo del ensayo indica que un resultado positivo no necesita ser confirmado por la técnica de referencia durante el periodo epidémico. Sin embargo, un resultado negativo no permite excluir la infección. Además, no es posible diferenciar entre influenza A estacional y el nuevo virus influenza.

La técnica inmunocromatográfica evaluada es simple y rápida, que proporciona resultados en 30 minutos. Esto puede ser trascendental para hospitales con limitaciones de tiempo y de recursos para cubrir los gastos de una rRT-PCR.

Utility of the rapid antigen detection BinaxNOW Influenza A&B test for detection of novel influenza A (H1N1) virus

L. Fuenzalida^{1*}, S. Blanco^{1,2*}, C. Prat^{1,2}, M. Vivancos¹, M. J. Dominguez³, J. M. Mòdol³, C. Rodrigo⁴ and V. Ausina^{1,2}

1) Microbiology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain, 2) CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, 3) Emergency Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona Spain and 4) Paediatric Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

Abstract

Nasopharyngeal aspirates, collected during outbreaks, of the novel influenza A (H1N1) virus in Barcelona, were used to compare the accuracy of a rapid antigen-based test (Binax) with the real-time RT-PCR assay developed by the CDC. The sensitivity, specificity and positive predictive value of the rapid test are higher in patients less than 18 years old and during the acute stage of the epidemic than in adult patients.

Keywords: Antigen detection, influenza A H1N1, novel influenza A, pandemic, rapid diagnosis

Original Submission: 4 December 2009; **Accepted:** 21 December 2009

Editor: D. Raoult

Clin Microbiol Infect

Corresponding author and reprint requests: V. Ausina, Servei de Microbiologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain
E-mail: vausina.germanstrias@gencat.cat

*Loreto Fuenzalida and Silvia Blanco contributed equally to this study.

Viral influenza is a seasonal infection associated with significant morbidity and mortality in both children and adults [1,2] during local outbreaks or epidemics. Influenza viruses infect, on average, 10–15% of the population annually. The

rapid detection of influenza viruses is important for the application of preventive strategies and the initiation of antiviral therapy in patients at risk of complications. The recent appearance and worldwide spread of the novel influenza A (H1N1) virus [3,4] has highlighted the need to evaluate commercially available rapid tests.

The aim of this study was to evaluate the BinaxNOW Influenza A&B test (Binax, Inc., Portland, Maine, USA), a rapid antigen-based test for detection of the novel swine-origin influenza A (H1N1) virus, during outbreaks in a tertiary-care hospital in Barcelona, Spain.

From June 2009 to October 2009, a total of 516 nasopharyngeal aspirate specimens were collected. We included paediatric and adult patients with suspected infection by pandemic influenza A (H1N1) (influenza-like illness or pneumonia of unknown origin) who presented at the emergency departments of Hospital Germans Trias i Pujol and required hospitalization or suffered from an underlying disease that indicated treatment according to criteria established by the Influenza Commission of the hospital. Patients with any immunodeficiency were included. Nasopharyngeal aspirates of each patient were used immediately for testing or stored at -80°C .

The BinaxNOW Influenza A&B (Binax, Inc., Portland, ME, USA) test is an immunochromatographic membrane assay that uses highly sensitive monoclonal antibodies to detect influenza type A and type B nucleoprotein antigens in nasopharyngeal specimens. This test does not differentiate between novel H1N1 and seasonal influenza A, but it provides a rapid diagnosis of influenza A or B infection. The technique was performed according to the manufacturer's recommendations.

Total RNA was extracted using a commercial kit, the QIAamp Viral RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. Viral RNA was extracted from 200 μL of each sample. The RNA was used immediately in the following experiments or stored at -80°C .

The presence of novel or seasonal influenza A virus was confirmed with the H1N1 assay of the CDC, approved by the Food and Drug Administration. This Protocol includes a panel of oligonucleotide primers and dual-labelled hydrolysis (Taqman) probes to be used in real-time RT-PCR (rRT-PCR) assays for the *in vitro* qualitative detection and characterization of swine influenza viruses in respiratory specimens. The InfA primer and probe set is designed for universal detection of type A influenza viruses. The swInfA primer and probe set is designed to specifically detect all swine influenza A viruses. The swHI primer and probe set is designed to specifically detect novel influenza A (H1N1) 2009.

Each clinical specimen was characterized by the Ct value determined in the universal influenza type A rRT-PCR assay

TABLE I. Test parameters of the BinaxNOW Influenza A&B test as compared with the real-time RT-PCR (CDC) assay

| | Sensitivity | Specificity | PPV | NPV | κ |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------------|
| Total samples | 60.3 (53.6–66.7) | 93.6 (90.0–96.1) | 88.3 (82.0–92.7) | 74.7 (69.8–79.1) | 0.5584 (0.4844–0.6325) |
| Paediatric patients (≤ 18 years) | 65.3 (56.9–72.8) | 96.4 (92.0–98.5) | 94.1 (87.1–97.5) | 76.1 (69.7–81.5) | 0.6301 (0.5432–0.7170) |
| Adult patients (> 18 years) | 51.2 (39.8–62.4) | 89.6 (82.2–94.3) | 77.3 (63.4–87.2) | 72.7 (64.5–79.6) | 0.4317 (0.2975–0.5659) |
| Acute stage of infection | 62.9 (54.9–70.3) | 94.1 (87.1–97.5) | 94.4 (87.8–97.7) | 61.5 (53.3–69.1) | 0.5198 (0.4195–0.6201) |

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.
Sensitivity, specificity, PPV and NPV are given as % (95% CI).

with the matrix (M) gene used as the target [5]. Ct values are indicators of the amount of virus in a specimen, with lower values indicating higher viral titres.

The sensitivity, specificity, κ index, positive predictive value (PPV) and negative predictive value of the BinaxNOW Influenza A&B test results as compared with those of the rRT-PCR assay were calculated using standard formulas. The calculations were performed with VassarStats tools (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.htm>), and 95% CIs were calculated for each value. Fisher's exact test was performed with the STATA 9.0 program (Stata Corp., College Station, Texas, USA), and a p -value of <0.05 was considered to be statistically significant.

Informed consent was obtained from all patients and parents of the children included.

Five hundred and sixteen samples of 499 patients were studied with both techniques. The median age was 20 years (range, 4 days to 87 years). There were 258 (52%) males. Only four cases of seasonal influenza A were detected, and they were not considered in the calculation. The period of greatest percentage of H1N1-positive tests (33.8%) was from 16 October to 15 November. Influenza B was not detected with the rapid test in any patient.

Among the 512 valid samples, 227 were rRT-PCR (CDC)-positive. Of these, 137 were detected using the BinaxNOW assay, corresponding to a sensitivity of 60.3%. The test parameters are presented in Table I. The PPV in patients less than 18 years old was greater than in adult patients and similar if it was considered only during the acute stage of the epidemic.

The high PPV of the BinaxNOW assay observed in this study indicates that positive results do not need to be confirmed by rRT-PCR. However, negative BinaxNOW results, as well as negative results obtained with other rapid antigen assays, should be confirmed by rRT-PCR.

Various previous reports have described low sensitivity of the BinaxNOW assay in comparison with rRT-PCR [5–7] for detection of the novel influenza A (H1N1) virus. These authors found the sensitivity of BinaxNOW to be in the range of 11–40%. Unlike previous reports, our data show

high sensitivity and specificity for detection of the novel influenza A (H1N1) virus using the BinaxNOW Influenza A&B test. The high sensitivity of the test might be explained by the study population, the majority of whom were children (62%), who had more viral shedding, and also by the high quality of specimen collection. Only nasopharyngeal aspirates, and not swabs, were collected, and patients were selected on the basis of high suspicion by expert clinicians. Furthermore, previous studies [5–7] considered small numbers of patients.

Balish *et al.* [5] reported that the sensitivity of a rapid diagnostic influenza test declines as the viral titre in the specimen decreases. In agreement with these results, our findings show that the sensitivity of the BinaxNOW assay declined substantially with lower viral titres (determined by Ct values). Over cycle 27, the sensitivity dropped to 28% (Fisher's exact test, p 0.049).

This finding indicates that the BinaxNOW rapid antigen-based test is highly sensitive and accurate for the detection of influenza A virus (H1N1) in patients under 18 years of age, and at any age during the most acute stage of an outbreak. BinaxNOW could be an important tool for patient care, because this test usually provides results within 30 min. This might be especially important for hospitals with time constraints and limited funds to cover the expense of rRT-PCR.

Acknowledgements

The authors thank M. Pérez and M. A. Hernández for technical assistance, and the staff from the Paediatric Department and Emergency Department, as well as the Influenza Commission, of the hospital.

Transparency Declaration

L. Fuenzalida is funded by a Presidente de la República de Chile (CONICYT) scholarship from the Chilean State. The authors report no conflicts of interest.

References

1. Heikkinen T. Influenza in children. *Acta Paediatr* 2006; 95: 778–784.
2. Rothberg MB, Haessler SD, Brown RB. Complications of viral influenza. *Am J Med* 2008; 121: 258–264.
3. CDC. Update: novel influenza A (H1N1) virus infections—worldwide. *MMWR* 2009; 58: 453–458.
4. Dawood FS, Jain S, Finelli L et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009; 360: 2605–2615.
5. Balish A, Warnes CM, Wu K et al. Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) virus. *MMWR* 2009; 58: 826–829.
6. Drexler JF, Helmer A, Kirberg H et al. Poor clinical sensitivity of rapid antigen test for influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1662–1664.
7. Vasoo S, Stevens J, Singh K. Rapid antigen tests for diagnosis of pandemic (swine) influenza A/H1N1. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 1090–1093.

4.4 Artículo 4

Validation of a polymerase chain reaction-oligochromatography test for detection of influenza A (H1N1) 2009 virus

Loreto Fuenzalida, Cristina Prat, Silvia Blanco, Albert Bas, MJ Domínguez, Ángeles Hernández, Carlos Rodrigo and Vicente Ausina.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2012. 72:144-9

El brote de influenza A (H1N1) 2009 causó la primera pandemia del siglo XXI pasando a estado post pandémico en agosto del año 2010. Sin embargo, hasta la fecha, aún se producen brotes localizados de diversas magnitudes.

El objetivo de esta parte de la Tesis fue evaluar una nueva técnica molecular con detección mediante oligocromatografía (Speed-Oligo®) [127] en el diagnóstico de influenza A (H1N1) 2009. Se estudió un total de 405 aspirados nasofaríngeos de pacientes con sospecha de influenza A (H1N1) 2009, a los cuales se les realizó la detección del nuevo virus mediante el nuevo ensayo y la técnica de referencia, rRT-PCR, descrita por los CDC. Además, en 380 muestras se realizó la técnica de detección rápida, BinaxNOW, para la detección de influenza A estacional e influenza B.

La sensibilidad y especificidad de la nueva técnica en comparación con la técnica de referencia desarrollada por los CDC fue de un 86.5% y 92.2%, respectivamente. En comparación con la técnica de detección rápida, 77% de las muestras fueron positivas y un 23% negativas entre ambas técnicas, presentando una correlación del 85%. El nuevo ensayo resultó ser más sensible y específico que la técnica de detección rápida. No se detectaron casos de influenza B. La nueva técnica es simple, rápida y proporciona una buena sensibilidad para la detección del virus de la influenza A H1N1 (2009). Esta técnica es una buena alternativa a la técnica desarrollada por los CDC para laboratorios que no estén equipados con instrumentos de PCR en tiempo real.

ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease xx (2011) xxx–xxx

DIAGNOSTIC
MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS
DISEASEwww.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Validation of a polymerase chain reaction–oligochromatography test for detection of influenza A (H1N1) 2009 virus^{☆,☆☆}

Loreto Fuenzalida^{a,*}, Cristina Prat^{a,b}, Silvia Blanco^{a,b}, Albert Bas^{a,b}, M.J. Domínguez^c,
M. Ángeles Hernández^a, Carlos Rodrigo^d, Vicente Ausina^{a,b}

^aServei de Microbiologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08916 Badalona, Spain

^bCIBER de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Madrid, Spain

^cServei de Urgències, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, 08216 Badalona, Spain

^dServei de Pediatria, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, 08216 Badalona, Spain

Received 15 July 2011; accepted 25 October 2011

Abstract

The outbreak of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus caused the first influenza pandemic disease of the 21st century. In August 2010, the pandemic moved into the post-pandemic period. However, localized outbreaks of various magnitudes continued with a higher rate of disease severity. The aim of this study was to assess a new polymerase chain reaction (PCR)–oligochromatographic assay (Speed-Oligo) in the diagnosis of novel influenza A (H1N1) 2009. A total of 405 nasopharyngeal aspirate specimens from 400 pediatric and adults patients with suspected infection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 were analyzed. The sensitivity and specificity values of the Speed-Oligo assay in comparison to reverse transcriptase–PCR assay developed by the Centers for Disease Control and Prevention were 86.5% and 92.2%, respectively. The new assay is simple, rapid, and provides a good sensitivity for detection of influenza A (H1N1) 2009. This assay might be a good alternative to real-time PCR assays for laboratories not equipped with real-time PCR instruments.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Influenza A (H1N1) 2009; Pandemic; Oligochromatography; Real-time RT-PCR; Rapid detection

1. Introduction

The outbreak of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus was first detected in Mexico in March 2009 and spread worldwide rapidly (CDC, 2009a), causing the first influenza pandemic disease of the 21st century with about 18,000 deaths around the world (http://www.who.int/csr/don/2010_04_23a/en/index.html). On August 10, 2010, the World Health Organization announced that the influenza A (H1N1) 2009 virus had moved into the post-pandemic period

(http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/). In spite of this, however, localized outbreaks of various magnitudes continued. Transmission of the influenza A (H1N1) 2009 virus remained intense in certain parts of India and in the temperate southern hemisphere, particularly New Zealand and Australia (http://www.who.int/csr/don/2010_08_27/en/index.html). A recent study in Spain, and also in our experience, suggests that patients admitted to the intensive care units during 2010–2011 appear to have a higher frequency of severe comorbidities, severity of illness, incidence of primary viral pneumonia, and increased mortality when compared with those observed in the 2009 pandemic outbreak (Rodríguez et al., 2011). Also, there are concerns that this virus may mutate or reassort with other existing influenza viruses to give rise to more readily transmissible or more pathogenic viruses.

[☆] Loreto Fuenzalida is funded by a Presidente de la República de Chile (CONICYT) scholarship from the Chilean state.

^{☆☆} Declaration of interest: the authors report no conflicts of interest.

* Corresponding author.

E-mail address: loretoffi@gmail.com (L. Fuenzalida).

ARTICLE IN PRESS

2

L. Fuenzalida et al. / Diagnostic Microbiology and Infectious Disease xx (2011) xxx–xxx

Clinical management of influenza is optimized by the use of rapid diagnostic tests, which facilitate early antiviral use and implementation of infection control measures while obviating the need for further unnecessary investigations and treatment. Rapid antigen-based diagnostic tests (RIDT) are available within 15 to 30 min, but previous studies have reported low sensitivity for the influenza A (H1N1) 2009 virus (CDC, 2009b; Faix et al., 2009). Unlike previous reports (Balish et al., 2009; Drexler et al., 2009; Vasoo et al., 2009), our data show that a common rapid test, BinaxNOW Influenza A & B (Binax, Portland, ME, USA), is useful in patients younger than 18 years and during the acute stage of the epidemic (Fuenzalida et al., 2010). However, this assay cannot distinguish the novel virus from the current circulating seasonal strains.

Real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction (rRT-PCR) developed by the Centers for Disease Control (Atlanta, GA, USA) has become the method of choice due to its increased sensitivity (Druce et al., 2005), its ability to subtype, and its minor turnaround time than viral culture. However, rRT-PCR is a technique with high complexity and technical requirement and cannot be readily performed in a primary health care setting. Oligochromatography, a new technique based on an adaptation of lateral flow immunochromatography, was recently proposed as an easy and rapid alternative for nucleic acid detection (Kiatpathomchai et al., 2008; Mugasa et al., 2009).

The aim of this study was to evaluate a new commercial assay Speed-Oligo® Novel Influenza A H1N1 test (Viracell, Spain), a PCR-based method coupled to a dipstick device for detection of novel swine-origin influenza A (H1N1) 2009 virus in comparison with a reference H1N1 rRT-PCR assay.

2. Materials and methods

2.1. Patients and clinical specimens

From July 2009 to November 2009, a total of 405 nasopharyngeal aspirates were collected from 400 pediatric and adults patients with suspected infection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus at the emergency department of Hospital Germans Trias i Pujol and who required hospitalization or suffered from an underlying disease that indicated treatment. Inclusion criteria were patients with fever and acute respiratory illness (respiratory failure, dyspnea, signs of sepsis, generalized weakness); acute pneumonia without other diagnoses; acute respiratory symptoms but without severity criteria in patients who potentially may develop complications (patients with chronic pneumopathy, heart disease, liver disease, metabolic disease); immunocompromised; and who are pregnant. One sample per patient and episode was collected and used immediately for the experiments or stored at -80°C . New episodes in the same patient were considered only when occurring at an interval of at least 10 days from the first one. Pediatric patients were considered those aged less than or

equal to 18 years. Informed consent was obtained from all patients and parents of the children included.

2.2. Samples processing

Viral RNA was extracted from 200 μL of each sample using a commercial kit (QIAamp Viral RNA kit, Qiagen) (Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. The RNA was used immediately in the following experiments or stored at -80°C .

2.3. Confirmation of novel influenza A (H1N1) 2009

The presence of novel or seasonal influenza A virus was confirmed by rRT-PCR assay developed by the CDC (http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf). This protocol includes a panel of oligonucleotide primers and dual-labeled hydrolysis (TaqMan®) probes for use in rRT-PCR assays for the in vitro qualitative detection and characterization of swine influenza viruses in respiratory specimens. The InfA primer and probe set is designed for universal detection of type A influenza viruses. The swInfA primer and probe set is designed to specifically detect all swine influenza A viruses. The swHI primer and probe set is designed to specifically detect novel influenza A (H1N1) 2009. The RNase P primer and probe serve as an internal positive control for presence of human nucleic acids. Each clinical specimen was characterized by the C_T value demonstrated in the universal influenza type A rRT-PCR assay with the matrix (M) gene used as the target (Balish et al., 2009). C_T values are indicators of the amount of virus in a specimen, with lower values indicating higher viral titres.

2.4. Complementary microbiological studies

Additionally, an immunochromatographic assay (BinaxNOW Influenza A & B) was used for influenza A and B virus detection. This test does not differentiate between novel influenza A and seasonal influenza A, but it provides a rapid diagnosis of influenza A or B infection. The technique was performed according to the manufacturer's recommendations. When the sample was negative for novel influenza A and when the physician in charge judged it necessary, other pathogens were also detected. The indirect immunofluorescence method (Chemicon International, Temecula, USA) was used to detect RSV, influenza A and B, parainfluenza (PIV) 1–3, and adenovirus. *Bordetella pertussis* was detected by means of real-time PCR (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA).

2.5. rRT-PCR

Total cDNA was synthesized with random primers from 10 μL of extracted RNAs using the iScript™ Reverse Transcriptase System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

ARTICLE IN PRESS

L. Fuenzalida et al. / Diagnostic Microbiology and Infectious Disease xx (2011) xxx–xxx

3

2.6. Test evaluation

Speed-Oligo® Novel Influenza A H1N1 is a PCR-based method coupled to a dipstick device that enables a rapid detection of influenza A (H1N1) 2009 virus. The supplied PCR mix contains a specific oligo pair for the amplification of a fragment in the H1 gene region, together with the Taq polymerase, dNTPs, and other elements required for the PCR amplification; a DNA fragment for an internal amplification control for the detection of PCR inhibitors and the corresponding primers are also included. Briefly, 2 µL of each cDNA previously synthesized was added to 23 µL of reconstituted PCR mix. Reactions were performed using the SpeedCycler (Analytik Jena, Jena, Germany) at 92 °C for 60 s, followed by 40 cycles at 92 °C for 20 s, 55 °C for 20 s, 72 °C for 20 s, 1 cycle of 72 °C for 60 s, and 1 cycle at 95 °C for 60 s.

Then, the detection was performed following the manufacturer's instructions. Briefly, 5 µL of denaturalized PCR product is diluted in a running solution and placed in a thermal block set at 55 °C. When put in contact with the dipstick device, the amplicons flow into the strip to react, in a first instance, with a gold conjugate bearing complementary probes for the specific amplicon and the internal control. The complex between PCR products and gold conjugates reaches the lines (test line and PCR amplification control line) where specific probes have been immobilized, and the whole length of the dipstick. The final line indicates a positive result. The primers and probes have been designed in a way that only the influenza A (H1N1) 2009 A virus is detected. As indicated by the manufacturer, Speed-Oligo is able to detect up to 1 copy of DNA per reaction.

2.7. Statistical analysis

Sensitivity, specificity, kappa index, and positive (PPV) and negative (NPV) predictive values were calculated using VassarStats (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.htm>). Chi-squared, Fisher's exact test, and Mann–Whitney *U* test were carried out for comparison of clinical characteristics on hospitalized and nonhospitalized patients using the STATA 9.0 program (Stata, College Station, TX,

USA). For all analyses, a probability (*P*) value of <0.05 was regarded as statistically significant.

3. Results

The majority of patients with pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus were children and young adults; the median age was 20.4 years (range, 0.1 month to 77 years). There were 73 (54%) males. A total of 34 (25%) patients evaluated in the emergency department were subsequently hospitalized an average of 3 days. Clinical data of adults and pediatric patients are presented in Table 1. The primary diagnosis in both cases was influenza syndrome, and the main comorbidity in children was asthma (44%), while for adults it was pregnancy (26%). No significant differences were detected when we compared hospitalized and non-hospitalized patients.

Among 405 specimens, 9 samples were inhibited by CDC rRT-PCR assay (2.2%). Only 9 cases of seasonal influenza A were detected by CDC rRT-PCR assay, and these samples were considered as influenza A (H1N1) 2009 negative in calculation. Among 392 valid samples, 134 were influenza A (H1N1) 2009 confirmed cases by CDC rRT-PCR assay.

Of the 392 CDC rRT-PCR valid samples, Speed-Oligo was positive for 118 (30%) (Table 2). No inhibited samples were obtained with Speed-Oligo. The overall agreement between Speed-Oligo and CDC rRT-PCR assay was 95% (372/392) ($k = 0.833$ [standard error = 0.0254]). Only 2 (1%) samples were Speed-Oligo–positive and H1N1 CDC rRT-PCR–negative. One of these samples was positive for seasonal influenza A. Eighteen (13%) samples were Speed-Oligo–negative and CDC rRT-PCR–positive. The sensitivity, specificity, PPV, and NPV for Speed-Oligo were 86.5%, 92.2%, 98.3%, and 93.4%, respectively (Table 3). The comparison of these parameters between pediatric and adult patients is presented in Table 4. In both groups of patients, the sensitivity, specificity, PPV, and NPV for Speed-Oligo were similar.

The sensitivity of Speed-Oligo was also determined according to the PCR cycles of CDC rRT-PCR assay. The

Table 1
Clinical characteristics of pediatric and adults patients with influenza A H1N1 infections

| Clinical characteristics | Pediatric patients (<i>n</i> = 77) | | | Adult patients (<i>n</i> = 57) | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|--------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------|
| | Hospitalized (<i>n</i> = 18) | No hospitalized (<i>n</i> = 59) | Total | Hospitalized (<i>n</i> = 16) | No hospitalized (<i>n</i> = 41) | Total |
| Age (years), median (range) | 5.3 (0.1–17) | 8.1 (0.1–17) | 7.4 (0.1–17) | 40.3 (22–77) | 36.8 (19–69) | 37.8 (19–77) |
| Gender, male (%) | 9 (50.0) | 36 (61.0) | 45 (58.4) | 8 (50.0) | 20 (48.7) | 28 (49.1) |
| Asthma | 7 (38.8) | 27 (45.7) | 34 (44.1) | 3 (18.7) | 5 (12.1) | 8 (14.0) |
| COPD | ^a | ^a | | 3 (18.7) | 1 (2.1) | 4 (7.0) |
| Obesity (%) | 0 (0) | 2 (3.3) | 2 (2.6) | 2 (12.5) | 2 (4.8) | 4 (7.0) |
| Pregnancy (%) | 0 (0) | 1 (1.6) | 1 (1.2) | 2 (12.5) | 13 (31.7) | 15 (26.3) |
| Other comorbidities (%) | 4 (22.2) | 7 (11.8) | 11 (14.2) | 4 (25.0) | 9 (21.9) | 13 (22.8) |
| Diagnosis | | | | | | |
| Influenza syndrome (%) | 6 (33.3) | 46 (77.9) | 52 (67.5) | 8 (50.0) | 41 (100) | 49 (84.2) |
| Pneumonia (%) | 5 (27.7) | 3 (5.0) | 8 (10.3) | 8 (50.0) | 1 (2.4) | 9 (15.7) |

^a Not applicable.

ARTICLE IN PRESS

4

L. Fuenzalida et al. / Diagnostic Microbiology and Infectious Disease xx (2011) xxx–xxx

Table 2
Speed-Oligo® Novel Influenza A H1N1 results compared with CDC rRT-PCR and BinaxNOW Influenza A & B for influenza A (H1N1) detection in nasopharyngeal aspirates

| | | CDC rRT-PCR | | | BinaxNOW | | |
|-------------|----------|-------------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| | | Positive | Negative | Total | Positive | Negative | Total |
| Speed-Oligo | Positive | 116 (87) | 2 (1) | 118 (30) | 75 (77) | 35 (12) | 110 (29) |
| | Negative | 18 (13) | 256 (99) | 274 (70) | 22 (23) | 248 (88) | 270 (71) |
| | Total | 134 (100) | 258 (100) | 392 (100) | 97 (100) | 283 (100) | 380 (100) |

Values are shown as *n* (%).

cycle threshold (C_T) values obtained in the confirmation real-time PCR ranged from 14 to 39. Of the 134 H1N1-positive samples confirmed by CDC assay, 109 had a C_T value under cycle 28 and 25 had a C_T value over cycle 27. Under cycle 28, the sensitivity of Speed-Oligo was 95% (104/109), and over cycle 27, the sensitivity decreased dramatically to 48% (12/25). Among the 18 samples that were Speed-Oligo false negative, 13 were a C_T over cycle 27. Therefore, probably, the sensitivity of Speed-Oligo declined with lower viral titres. On the other hand, we compared the sensitivity between pediatric and adult patients according to the PCR cycles of CDC rRT-PCR assay. The sensitivity under cycle 28 was 96.8% for pediatric patients and 93.3% for adults, and over cycle 27, the sensitivity decreased to 53.8% and 58.3%, respectively.

Speed-Oligo presented a high specificity. We found 7 samples that were Speed-Oligo negative for influenza A H1N1 virus (and confirmed by CDC protocol) and -positive for other pathogens. One sample was positive for adenovirus, 5 samples were positive for PIV1, and 1 sample was positive for *B. pertussis*. Also, 1 of 9 samples of seasonal influenza A detected by the CDC protocol was positive by Speed-Oligo. No more positive samples for other viruses were found.

A total of 380 samples were also analyzed with the rapid influenza diagnostic test (BinaxNOW Influenza A & B) and compared with Speed-Oligo assay (Table 2). Ninety-seven samples were influenza A-positive using BinaxNOW Influenza A & B. Seventy-five samples (77%) were positive by both techniques and 22 (23%) were BinaxNOW-positive and Speed-Oligo-negative. Of these 22 samples, only 1 sample was CDC rRT-PCR-positive for influenza A H1N1 virus. The overall agreement between BinaxNOW Influenza A & B and Speed-Oligo was 85% (323/380) ($k = 0.6221$ [standard error = 0.0461]). Influenza B was not detected by the rapid test in any sample. The sensitivity, specificity, PPV, and NPV for BinaxNOW are presented in Table 3.

The sensitivity of BinaxNOW was also determined according to the PCR cycles of CDC rRT-PCR assay. Of the 380 samples studied by BinaxNOW, 126 samples were influenza A H1N1 CDC-positive. Of these samples, 101 samples had a C_T value under cycle 28 and 25 had a C_T value over cycle 27. Under cycle 28, the sensitivity of BinaxNOW was 67% (68/101), and over cycle 27, the sensitivity decreased dramatically to 24% (6/25).

4. Discussion

The emergence of novel strains of respiratory viruses, most notably those responsible for significant outbreaks, epidemics, and pandemics, highlights the need for a comprehensive and flexible diagnostic algorithm (Cowling et al., 2008; Crawford et al., 2010; Dinh et al., 2006). Over the past 2 decades, technologies used in the laboratory diagnosis of respiratory tract infections have improved significantly. Antigen-based assays have also been incorporated into clinical practice (Principi and Esposito, 2009). Notwithstanding the advancements made in these testing methods, their limitations have led to unmet needs in the diagnostic laboratory being addressed by new tools, most notably nucleic acid-based assays developed for the detection of respiratory viruses (Kehl and Kumar, 2009; Mahony, 2008).

The H1N1 influenza virus, which caused the 2009 pandemic, continues to circulate in some parts of the world, causing variable levels of disease and outbreaks (Rodriguez et al., 2011). Because of rapid result (within 15–30 min), easy availability, and low cost, the influenza RIDT is used for rapid diagnosis of influenza (Choi et al., 2010; Fuenzalida et al., 2010; Ginocchio et al., 2009; Hurt et al., 2007). The sensitivity of RIDT for detection of influenza A (H1N1) 2009 ranges from 9.6% to 69% (Balish et al., 2009; Fuenzalida et al., 2010). The main diagnostic difficulties in diagnosing H1N1 were based on the high number of false-negative tests with rapid influenza A screening tests. In our

Table 3
Analytic performance of Speed-Oligo® Novel Influenza A H1N1 and BinaxNOW Influenza A & B test compared with CDC rRT-PCR assay

| | Sensitivity | Specificity | PPV | NPV |
|--------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Speed-Oligo® | 86.5 (79.3–91.6) | 99.2 (96.9–99.8) | 98.3 (93.4–99.7) | 93.4 (89.6–95.9) |
| BinaxNOW Influenza A & B | 58.7 (49.6–67.3) | 92.6 (88.4–95.4) | 80.4 (70.5–87.6) | 81.6 (76.1–85.6) |

Values are shown as % (95% confidence interval).

ARTICLE IN PRESS

L. Fuenzalida et al. / *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* xx (2011) xxx–xxx

5

Table 4

Test parameters of Speed-Oligo® Novel Influenza A H1N1 for pediatric and adult patients compared with CDC rRT-PCR assay

| | Sensitivity | Specificity | PPV | NPV |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Pediatric patients ^a (n = 228) | 89.6 (80.0–95.0) | 98.6 (94.8–99.7) | 97.1 (89.2–99.5) | 94.9 (89.8–97.6) |
| Adult patients ^b (n = 164) | 82.4 (69.6–90.8) | 1.0 (95.6–1.0) | 1.0 (90.5–1.0) | 91.4 (84.4–95.5) |

Values are shown as % (95% confidence interval).

^a ≤18 years.^b >18 years.

experience, the sensitivity of rapid antigen test for the detection of influenza A (H1N1) 2009 virus is higher in patients aged less than 18 years and during the acute stage of the epidemic than in adult patients (Fuenzalida et al., 2010). However, this assay cannot distinguish the novel virus from the current circulating seasonal strains.

Within 2 weeks of the first recognition of 2009 pandemic influenza A H1N1, the CDC developed and began distributing a new approved pandemic influenza A H1N1 PCR assay. Real-time RT-PCR has the advantage of rapidity and high sensitivity but has the disadvantage of requiring highly technical expertise and specialized equipment. The Speed-Oligo® Novel Influenza A H1N1 is a test that is easy to perform with rapid detection. This technique requires minimal equipment. With a thermocycler (conventional or fast) and a thermoblock at one's disposal, it is possible to perform the technique.

The Speed-Oligo Novel Influenza A H1N1 has an excellent correlation with H1N1 RT-PCR CDC assay (95%, $k = 0.833$) and a good sensitivity (86.5%). Also, Speed-Oligo had a high PPV and NPV. However, this study was performed during a period of high prevalence (July–November 2009) and that actual PPV and NPV might not be as high in the context of seasonal infections. Unlike RAT, Speed-Oligo results were similar between adults and pediatric patients. In both cases, high sensitivity, specificity, PPV, and NPV values were obtained. Speed-Oligo is more sensitive than BinaxNOW Influenza A & B. As we have found previously (Fuenzalida et al., 2010), the overall sensitivity of BinaxNOW Influenza A & B test was 58.7%.

On the other hand, 1 of 9 influenza A seasonal samples showed cross-reaction with Speed-Oligo. However, no cross-reaction was found with adenovirus, PIV1, and *B. pertussis*.

The amount of virus found in respiratory specimens can be affected by the timing of the specimen collection; viral titres are highest in the first 3 days of illness. C_T values of the rRT-PCR are indicators of the amount of viral titres (Balish et al., 2009). The sensitivity of Speed-Oligo declined as the viral titre in the specimen decreased. Other factors that can affect the amount of virus in the specimens include age (e.g., children generally shed more virus and for longer periods than adults). In our study, 60% of the Speed-Oligo–negative and CDC rRT-PCR–negative samples were from adult patients.

The oligochromatographic method used for the detection of PCR amplicons avoids the manipulation requirements, as well as the technical and material requirements,

normally associated with the classical agarose gel methods. However, the risk of contamination is high because the tubes containing the amplicons must be opened. In the setting of minimally qualified technologists operating this assay in a clinical laboratory, rigorous precautions should be taken in order to avoid contamination. One of the advantages of oligochromatographic tests is that the detection step takes only a few minutes. PCR of Speed-Oligo is completed within 55 min and detection requires no more than 5 min. Taking into account the time of extraction of sample (40 min) and the rRT-PCR (30 min), the turnaround time for the whole procedure is around 2.5 h. Also, the strip reveals a clear positive and negative result. However, seasonal influenza A is not detected by Speed-Oligo. Speed-Oligo, unlike CDC rRT-PCR (http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf), does not have an extraction internal control that indicates the quality of the sample.

Future planning efforts should identify ways to improve the availability of reliable testing for managing patient care and approaches for optimal use of molecular testing for detecting and controlling emerging influenza virus and other pathogens.

In summary, the new assay is simple, rapid, and provides a good sensitivity for detection of the 2009 H1N1 virus. This assay might be a good alternative to real-time PCR assays for laboratories not equipped with real-time PCR instruments.

Acknowledgments

The authors would like to thank Vircell (Spain) for providing the Speed-Oligo® Novel Influenza A H1N1 kit required for the study. They also thank Miguel Perez for technical assistance and the staff from the Pediatric Department and Emergency Department, as well as the Influenza Commission of the hospital.

References

- Balish A, Warnes CM, Wu K, Barnes N, Emery S, Berman L, Shu B, Lindstrom S, Xu X, Uyeki X, Shaw M, Klimov A, Villanueva J (2009) Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) virus. *MMWR* 58:826–829.
- CDC (2009a) Update: novel influenza A (H1N1) virus infections—worldwide. *MMWR* 58:453–458.
- CDC (2009b) Performance of rapid influenza diagnostic tests during two school outbreaks of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58:1029–1032.

ARTICLE IN PRESS

6

L. Fuenzalida et al. / *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* xx (2011) xxx–xxx

- Cowling BJ, Ho LM, Leung GM (2008) Effectiveness of control measures during the SARS epidemic in Beijing: a comparison of the Rt curve and the epidemic curve. *Epidemiol Infect* 136:562–566.
- Crawford JM, Stallone R, Zhang F, Gerolimatos M, Korologos DD, Sweetapple C, de Geronimo M, Dlugacz Y, Armellino DM, Ginocchio CC (2010) Laboratory surge response to pandemic (H1N1) 2009 outbreak, New York City metropolitan area, USA. *Emerg Infect Dis* 16:8–13.
- Choi YJ, Kim HJ, Park JS, Oh MH, Nam HS, Kim YB, Cho BK, Ji MJ, Oh JS (2010) Evaluation of new rapid antigen test for detection of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *J Clin Microbiol* 48:2260–2262.
- Dinh PN, Long HT, Tien NT, Hien NT, Mai le TQ, Phong le H, Tuan le V, Van Tan H, Nguyen NB, Van Tu P, Phuong NT (2006) Risk factors for human infection with avian influenza A H5N1, Vietnam, 2004. *Emerg Infect Dis* 12:1841–1847.
- Drexler JF, Helmer A, Kirberg H, Reber U, Panning M, Muller M, Hofling K, Matz B, Drosten C, Eis-Hubinger AM (2009) Poor clinical sensitivity of rapid antigen test for influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis* 15:1662–1664.
- Druce J, Tran T, Kelly H, Kaye M, Chibo D, Kostecki R, Amiri A, Catton M, Birch C (2005) Laboratory diagnosis and surveillance of human respiratory viruses by PCR in Victoria, Australia, 2002–2003. *J Med Virol* 75:122–129.
- Faix DJ, Sherman SS, Waterman SH (2009) Rapid-test sensitivity for novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 361:728–729.
- Fuenzalida L, Blanco S, Prat C, Vivancos M, Dominguez MJ, Modol JM, Rodrigo C, Ausina V (2010) Utility of the rapid antigen detection BinaxNOW Influenza A&B test for detection of novel influenza A (H1N1) virus. *Clin Microbiol Infect* 16:1574–1576.
- Ginocchio CC, Zhang F, Manji R, Arora S, Bornfreund M, Falk L, Lotlikar M, Kowerska M, Becker G, Korologos D, de Geronimo M, Crawford JM (2009) Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak. *J Clin Virol* 45:191–195.
- Hurt AC, Alexander R, Hibbert J, Deed N, Barr IG (2007) Performance of six influenza rapid tests in detecting human influenza in clinical specimens. *J Clin Virol* 39:132–135.
- Kehl SC, Kumar S (2009) Utilization of nucleic acid amplification assays for the detection of respiratory viruses. *Clin Lab Med* 29:661–671.
- Kiatpathomchai W, Jaroenram W, Arunrut N, Jitrapakdee S, Flegel TW (2008) Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J Virol Methods* 153:214–217.
- Mahony JB (2008) Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* 21:716–747.
- Mugasa CM, Laurent T, Schoone GJ, Kager PA, Lubega GW, Schallig HD (2009) Nucleic acid sequence-based amplification with oligochromatography for detection of *Trypanosoma brucei* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 47:630–635.
- Principi N, Esposito S (2009) Antigen-based assays for the identification of influenza virus and respiratory syncytial virus: why and how to use them in pediatric practice. *Clin Lab Med* 29:649–660.
- Rodriguez A, Martin-Loeches I, Bonastre J, Olaechea P, Alvarez-Lerma F, Zaragoza R, Guerrero J, Blanco J, Gordo F, Pozo F, Lorente J, Carratala J, Cordero M, Rello J, Esteban A, Leon C (2011) First influenza season after the 2009 pandemic influenza: report of the first 300 ICU admissions in Spain. *Med Intensiva* 35:208–216.
- Vasoo S, Stevens J, Singh K (2009) Rapid antigen tests for diagnosis of pandemic (swine) influenza A/H1N1. *Clin Infect Dis* 49:1090–1093.

4.5 Artículo 5

Study of oseltamivir-resistant of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus by pyrosequencing

Loreto Fuenzalida, Silvia Blanco, Cristina Prat, Jose Domínguez, Carlos Rodrigo and Vicente Ausina.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. Submitted.

Los antivíricos juegan un papel fundamental en la prevención y manejo de los virus influenza. La mayoría de los virus influenza A (H1N1) 2009 son sensibles a oseltamivir y resistentes a adamantano. Sin embargo, una única mutación (H275Y) en el gen de la neuraminidasa (NA) produce resistencia a oseltamivir, como ya ha sido reportado. La pirosecuenciación es una nueva técnica de secuenciación de DNA, desarrollada a finales de la década de los años 90 [128]. Está basada en la secuenciación por síntesis, acoplando la síntesis de DNA a una reacción quimioluminiscente, lo que permite una rápida determinación de secuencias en tiempo real.

De esta manera, en este apartado de la Tesis se describe el estudio del gen de la NA de la gripe pandémica mediante pirosecuenciación para la detección de la mutación H275Y que confiere resistencia a oseltamivir en 33 muestras de NPA de pacientes con detección confirmada del virus de la gripe pandémica. En el estudio no encontramos cepas resistentes a oseltamivir, independientemente de si eran pacientes con o sin criterios clínicos de gravedad. Otros estudios en España, indican un bajo porcentaje de resistencia a oseltamivir en la población. Por otra parte, se encontró que este método es dependiente de la cantidad de RNA presente en la muestra. No fue posible subtipar muestras con un ciclo de corte (Ct) mayor a 24 y por tanto una relativa baja carga vírica.

La pirosecuenciación es una técnica rápida y fácil de realizar, y que puede ser fácilmente adaptada a la detección de marcadores de resistencia. Sin embargo, el sofisticado equipamiento de la técnica podría limitar su uso en hospitales pequeños y países en desarrollo.

A pesar de esta baja resistencia a oseltamivir, es necesario continuar con la vigilancia de la resistencia a antivíricos debido a la posible emergencia de virus resistentes en la población.

Study of oseltamivir-resistant of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus by pyrosequencing

Loreto Fuenzalida¹, Silvia Blanco^{1,3}, Jose Domínguez^{1,3}, Cristina Prat^{1,3}, Carlos Rodrigo² and Vicente Ausina^{1,3}.

1 Servei de Microbiologia, 2 Servei de Pediatria, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona. Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain. 3 CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

ABSTRACT

Antivirals play a critical role in the prevention and the management of influenza. Most pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses are sensitive to oseltamivir, but a single point mutation (H275Y) in the neuraminidase (NA) gene of influenza A (H1N1) 2009 can lead to resistance and such viruses have been reported from several countries. We analyzed the neuroaminidase gene of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in 33 samples of nasopharyngeal aspirates of patients with confirmed viral detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses. We did not find oseltamivir-resistant strains from samples with or without clinical criteria of severity.

Keywords: Influenza A (H1N1) 2009; Neuraminidase; H275Y mutation; Oseltamivir-resistance, Pyrosequencing

INTRODUCTION

With the advent of the 21st century, a novel influenza A variant of swine origin - H1N1 - appeared which spread to humans and then manifested rapidly across the world since it began in America and Mexico in March 2009 [1, 2]. Eventually, on June 11, 2009, the World Health Organization raised the worldwide pandemic alert level to phase 6.

Initial testing of pandemic H1N1 virus found it susceptible to neuraminidase inhibitors, oseltamivir and zanamivir, but resistant to amantadine [3]. Influenza A and B strains had remained susceptible to oseltamivir with rare exceptions since their availability in 1999. Recent reviews and expert opinions have identified studies reporting prevalence and incidence rates of antiviral resistance among patients treated with oseltamivir [4, 5]. Until recently, the prevalence of antiviral resistance has been relatively low [6, 7]. However, in the influenza season 2008-2009, the Centers for

Disease Control and Prevention (CDC) reported a worldwide significant increase in the prevalence of oseltamivir resistance to influenza A/H1N1 viruses (A/Brisbane/59/2007-like strains) due to the H275Y NA mutation (<http://www.cdc.gov/H1N1flu/recommendations.htm>). Furthermore, about 1% of tested 2009 pandemic H1N1 viruses (A/California/07/2009 (H1N1) - like strain) were found to be resistant to oseltamivir due to the same mutation. To date influenza A and B, including all types of A/H1N1 virus, remain susceptible to zanamivir. Further, a recent review only found one documented case of zanamivir resistance [4, 8].

Pyrosequencing is a relatively new technology that is based on the principle of sequencing by synthesis [9]. It has the capacity of generating accurate sequence information for at least 50 nucleotides in real-time, and the capacity of high throughput screening of up to 96 samples within one hour. Combining the benefits of both sequencing and real-time PCR, pyrosequencing has been widely used in influenza molecular

surveillance for SNP detection and mutation screening, such as antiviral resistant mutations [10-12]. Recently, pyrosequencing was used for the timely detection of resistance to adamantanes and oseltamivir during the pandemic influenza A virus (H1N1) 2009 [13, 14].

The aim of our study was to detect oseltamivir-resistant pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in patient treated at Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona, Spain.

MATERIAL AND METHODS

The study was performed at the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol from July 2009 to November 2009. A total of 40 nasopharyngeal aspirate (NPA) specimens collected from 40 patients with confirmed pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus were studied. We included pediatric and adult patient influenza A H1N1-positive by RT-PCR assay developed by the CDC (http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf). Each clinical specimen was characterized by the cycle threshold (Ct) value determined in the universal influenza type A rRT-PCR assay with the matrix (M) gene used as the target [15]. Ct values are indicators of the amount of virus in a specimen, with lower values indicating higher viral titres. Severe cases were defined as any condition or clinical presentation requiring hospital admission for clinical management according to WHO guidance criteria

(http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/clinical_management/en/index.html).

Also, two samples of NPA of seasonal influenza A and one negative sample for both influenza A (H1N1) 2009 and seasonal influenza A confirmed by rRT-PCR assay developed by the CDC were included as negative controls.

Pyrosequencing. Total RNA was extracted using a commercial kit, the QIAamp Viral RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. Viral RNA was extracted from 200 µl of each sample. The RNA was used immediately in the following experiments or stored at -80°C. RT-PCR amplifications were performed using Invitrogen Superscript III One step RT-PCR with Hi Fi Taq system (Carlsbad, CA, USA). Primers were used at 20 µM in a standard 50-µl reaction mixture, and amplification was performed for 45 cycles. Biotinylated amplicons were purified, and the pyrosequencing reactions were carried out as described CDC (http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/NA_DetailedPyrosequencing_20090513.pdf), using a PSQ 96MA platform pyrosequencer.

Informed consent was obtained from all patients and parents of the children included. The Ethical Committee of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol approved the study protocol.

RESULTS

A total of 40 human influenza A (H1N1) 2009 samples with Ct from 14-28 for influenza A M gene were chosen for pyrosequencing. We included 2 seasonal influenza A. Thirty three of them (83%) were correctly sequenced, with a median Ct value of 20 (range 14-24); whereas 7 samples with a median Ct value of 26 (range 23-28) could not be subtyped. Also, the samples of seasonal influenza A had a median Ct of 35.5 and could not be analyzed by pyrosequencing. This association with Ct value suggested that the lack of pyrosequencing signals for some of the samples was most likely caused by the lower viral loads in these samples.

Clinical characteristics of patients are presented in Table 1. Most patients were treated with oseltamivir. Five patients corresponded to

severe cases and required hospitalization. The mean of hospitalization days in severe patient group was 3.4 days (SD± 1.5) and 2 of them received oseltamivir therapy. One patient received combined therapy of oseltamivir and amantadine.

H275Y NA substitution was not found in any patient infected with pandemic influenza A (H1N1) 2009 with or without clinical criteria of severity. All sequences analyzed corresponded to the wild type at position 275 in the NA gene, providing no evidence for any circulation of oseltamivir-resistant pandemic H1N1 viruses in the studied population.

DISCUSSION

Monitoring of antiviral resistance is an essential component of influenza virus surveillance as reported previously in influenza A (H1N1) 2009 [16]. The influenza A (H1N1) 2009 pandemic viruses are continuously evolving, and there is a concern that they may acquire gene segments through reassortment with other circulating viruses from both human and animal sources to produce a new virus which could have higher pathogenicity in man.

There are a number of methods that have been used for reassortment detection, including real-time RT-PCR [17-19] conventional RT-PCR and conventional sequencing. The pyrosequencing assay reported combines the benefits of some of these methods as it is a fast and high-throughput.

We did not find oseltamivir-resistant strains from samples with or without clinical criteria of severity in studied population. However, the number of samples studied was small. Despite of this limitation, a previous study in Spain described a very low number of oseltamivir-resistant pandemic influenza A (H1N1) 2009 [19].

Other mutations had been detected in Spain. Antón et al 2010 analyzed the hemagglutinin gene sequence of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in 189 respiratory specimens. They found the D225G mutation in 3 severe cases. However, it was not found in samples from other cases with or without clinical criteria of severity [20]. The biologic significance of this mutation remains still unclear. On the other hand, Ledesma et al 2011 reported that the appearance of D222G and D222E substitution in HA of pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses circulating in Spain might be related with severe respiratory disease [21]. These mutations have not been studied in our samples.

The low frequency of influenza A (H1N1) 2009 oseltamivir-resistant viruses observed to date is in stark contrast to the situation with seasonal H1N1 viruses during 2007–2008, when, after previously rare occurrences, an H275Y strain appeared in Europe and within 12 months had spread globally [22, 23]. One possible explanation is that, unlike the seasonal H1N1 H275Y mutant, the influenza A (H1N1) 2009 oseltamivir-resistant mutation compromises viral fitness.

The pyrosequencing method was found to be depended on the quantity of the specimen. The pyrosequencing could only reliably detect samples with a moderate viral load, with a Ct value of less than 24 for influenza A M gene in most cases. Similar results were reported by Deng YM et al, 2011 [14].

Many published data showed that the appearance of resistance mutations may precede the increase in viral load by several months [24-26], and could be a prognostic marker for the occurrence of viral breakthrough. It is therefore of relevance to detect known and novel mutations at the very early signs of a failing treatment, to maximize the success of early therapeutic changes in failed patients. In

this context, pyrosequencing would allow the identification of patients who develop genotypic resistance early during their treatment, enabling early intervention and prevention of treatment failure.

The pyrosequencing approach is relatively flexible and can be readily modified as soon as new markers of resistance are established or when substantial genetic variation occurs in the drug-targeted protein. The pyrosequencing method can greatly reduce the workload and cost of testing for reassortment. However, the requirement of the PyroMark instrument for this assay might limit its use in some developing countries, as this device is currently not as widely used as conventional sequencers which are available in many laboratories. Another limitation of the assay is that it can only accurately sequence up to 50 bases, so is not suitable for full genome sequencing.

In conclusion, we did not find oseltamivir-resistant strains from samples with or without clinical criteria of severity in studied population. However, it is necessary continue surveillance of resistance because the possibility of emergence of oseltamivir-resistant viruses in general population.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Miguel Pérez for technical assistance. Loreto Fuenzalida is funded by “Presidente de la República de Chile” (CONICYT) scholarship from the Chilean State. Jose Domínguez is a researcher funded by the “Miguel Servet” programme of the Instituto de Salud Carlos III (Spain).

Declaration of interest: the authors report no conflicts of interest.

Table 1: Clinical features of the total 33 patients with novel influenza A (H1N1) 2009.

| Clinical Characteristics | N (%) |
|--------------------------|---------|
| Age (years) mean | |
| Adults (> 18 years) | 11 (33) |
| Pediatric (≤ 18 years) | 22 (67) |
| Male | 19 (58) |
| Associated Risk Factors | |
| No Risk Factor | 14 (42) |
| Diabetes mellitus | 2 (6) |
| Chronic renal failure | 1 (3) |
| Obesity | 1 (3) |
| Asthma | 9 (27) |
| Pregnancy (in females) | 6 (18) |
| Other | 1 (3) |
| Oseltamivir therapy | 19 (58) |

REFERENCES

- 1 Dawood FS, Jain S, Finelli L, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med.* 2009; 360: 2605-2615.
- 2 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: Novel influenza A (H1N1) virus infections - worldwide, May 6, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58: 453-458.
- 3 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: Drug susceptibility of swine-origin influenza A (H1N1) viruses, April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58: 433-435.
- 4 Hurt AC, Ho HT, Barr I. Resistance to anti-influenza drugs: Adamantanes and neuraminidase inhibitors. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2006; 4: 795-805.
- 5 Schirmer P, Holodniy M. Oseltamivir for treatment and prophylaxis of influenza infection. *Expert Opin Drug Saf.* 2009; 8: 357-371.
- 6 Hurt AC, Barr IG. Influenza viruses with reduced sensitivity to the neuraminidase inhibitor drugs in untreated young children. *Commun Dis Intell.* 2008; 32: 57-62.
- 7 Monto AS, McKimm-Breschkin JL, Macken C, et al. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 2395-2402.
- 8 Gubareva LV, Matrosovich MN, Brenner MK, Bethell RC, Webster RG. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *J Infect Dis.* 1998; 178: 1257-1262.
- 9 Diggle MA, Clarke SC. Pyrosequencing: Sequence typing at the speed of light. *Mol Biotechnol.* 2004; 28: 129-137.
- 10 Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *Jama.* 2006; 295: 891-894.
- 11 Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Sheu TG, et al. Pyrosequencing as a tool to detect molecular markers of resistance to neuraminidase inhibitors in seasonal influenza A viruses. *Antiviral Res.* 2009; 81: 16-24.
- 12 Bright RA, Medina MJ, Xu X, et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: A cause for concern. *Lancet.* 2005; 366: 1175-1181.
- 13 Deyde VM, Sheu TG, Trujillo AA, et al. Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses by pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 1102-1110.
- 14 Deng YM, Caldwell N, Hurt A, et al. A comparison of pyrosequencing and neuraminidase inhibition assays for the detection of oseltamivir-resistant pandemic influenza A(H1N1) 2009 viruses. *Antiviral Res.* 2011; 90: 87-91.
- 15 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) virus - United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58: 826-829.
- 16 Gulland A. First cases of spread of oseltamivir resistant swine flu between patients are reported in Wales. *Bmj.* 2009; 339: b4975.
- 17 Ducatez MF, Sonnberg S, Hall RJ, et al. Genotyping assay for the identification of 2009-2010 pandemic and seasonal H1N1 influenza virus reassortants. *J Virol Methods.* 2010; 168: 78-81.
- 18 Mak PW, Wong CK, Li OT, et al. Rapid genotyping of swine influenza viruses. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17: 691-694.
- 19 Ledesma J, Vicente D, Pozo F, et al. Oseltamivir-resistant pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses in Spain. *J Clin Virol.* 2011; 51: 205-208.
- 20 Antón A, Marcos MA, Martínez MJ, et al. D225G mutation in the hemagglutinin protein

found in 3 severe cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 67: 207-208.

21 Ledesma J, Pozo F, Ruiz MP, et al. Substitutions in position 222 of haemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses in Spain. *J Clin Virol.* 2011; 51: 75-78.

22 Hurt AC, Ernest J, Deng YM, et al. Emergence and spread of oseltamivir-resistant a(h1n1) influenza viruses in Oceania, south East Asia and South Africa. *Antiviral Res.* 2009; 83: 90-93.

23 Lackenby A, Hungnes O, Dudman SG, et al. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill.* 2008; 13.

24 Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A, Papaioannou C. Efficacy of long-term lamivudine monotherapy in patients

with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2000; 32: 847-851.

25 Lampertico P, Vigano M, Manenti E, Lavarone M, Lunghi G, Colombo M. Adefovir rapidly suppresses hepatitis B in HBeAG-negative patients developing genotypic resistance to lamivudine. *Hepatology.* 2005; 42: 1414-1419.

26 Mehta T, McGrath E, Bheemreddy S, et al. Detection of oseltamivir resistance during treatment of 2009 H1N1 influenza virus infection in immunocompromised patients: Utility of cycle threshold values of qualitative real-time reverse transcriptase pcr. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 4326-4328.

4.6 Artículo 6

Evaluación de una nueva técnica molecular de detección simultánea de múltiples virus respiratorios

Loreto Fuenzalida, Silvia Blanco, Jordi Fàbrega, Cristina Prat, Miguel Pérez, Jose Domínguez, Carlos Rodrigo y Vicente Ausina.
Scientific technical report, 2009.

Los métodos convencionales para la detección de virus respiratorios tienen numerosas limitaciones, además de tener una gama restringida de patógenos. Es por esto que se han diseñado nuevas pruebas de detección múltiple basadas en la PCR [129, 130], particularmente considerando el hecho de que virus recientemente descubiertos han demostrado ser difíciles de detectar por los métodos tradicionales [129, 131]. Además, en las infecciones del tracto respiratorio es posible detectar más de un virus simultáneamente [132-134], muchos de los cuales son virus emergentes que no están considerados en las técnicas utilizadas rutinariamente en el laboratorio. Sin embargo, el significado de estas infecciones múltiples es aún de interpretación controvertida.

El objetivo de esta parte de la Tesis fue comparar una nueva técnica molecular de detección simultánea de múltiples virus respiratorios (Luminex xTAG RVP) con las técnicas convencionales utilizadas en el laboratorio (IF, ICT y RT-PCR). Esta técnica permite identificar 19 tipos y subtipos distintos de virus respiratorios. Se estudiaron 119 muestras de NPA de niños hospitalizados por infección respiratoria. Se incluyó un grupo control de 20 muestras de NPA de niños sanos, menores de 5 años.

De las 119 muestras, 105 (88%) tuvieron un resultado positivo para 1 ó más virus y 14 (12%) tuvieron un resultado negativo utilizando el nuevo ensayo, mientras que con las técnicas convencionales se detectaron 97 (82%) muestras con 1 ó más virus y 22 (18%) fueron negativas. Los virus VPI4, HCoV y picornavirus, no se incluyen en las técnicas convencionales del laboratorio, por lo que no es posible compararlos. Sin embargo, picornavirus (enterovirus y RV) fueron los principales virus detectados tanto en niños enfermos (46%) como en niños sanos (65%). Para VRS e influenza B se obtuvo una buena correlación entre la ICT/IF y la nueva técnica ($k = 0.685$ y 0.630 respectivamente) y una correlación moderada en el caso de adenovirus ($k=0.531$), virus influenza A ($k=0.496$) y VPI3 ($k= 0.569$). Para el resto de virus se obtuvieron muy

pocas muestras positivas y por tanto no se estimó la correlación entre las técnicas. No se encontraron diferencias significativas entre el número de virus detectados y la edad, sexo y gravedad (medida en días de hospitalización y oxigenoterapia) del paciente. La nueva técnica evaluada es una herramienta útil para el estudio, diagnóstico y manejo de las infecciones respiratorias víricas, es una técnica sólida y reproducible con múltiples posibilidades de aplicación en microbiología clínica. Desde el punto de vista coste-beneficio, esta nueva técnica sería un gran aporte en poblaciones de riesgo. Son necesarios más estudios para aclarar el papel de las infecciones múltiples en la infección respiratoria.

Evaluación de una nueva técnica de detección de virus respiratorios Luminex xTAG RVP

Loreto Fuenzalida, Silvia Blanco, Jordi Fàbrega, Cristina Prat-Aymerich, Miguel Pérez, Jose Domínguez, Carlos Rodrigo and Vicente Ausina
Scientific technical report. 2009

Las infecciones de las vías respiratorias (IVR) constituyen las enfermedades infecciosas más frecuentes del ser humano y representan una importante causa de morbimortalidad en pediatría. Los niños sanos pueden presentar entre 6 y 8 infecciones respiratorias al año, muchas de las cuales, sobre todo durante la lactancia, afectan las vías respiratorias inferiores (bronquiolitis, broncoalveolitis y neumonitis) [1]. Un diagnóstico preciso y rápido de la infección por virus respiratorios es esencial para tener un diagnóstico diferencial con las infecciones bacterianas, evitar el uso de antibióticos innecesariamente y prevenir la propagación vírica.

Clásicamente, los virus que con mayor frecuencia se han asociado a infecciones de las vías respiratorias inferiores son el virus respiratorio sincitial (VRS), los virus parainfluenza (VPI), los virus influenza A y B y los adenovirus. Sin embargo, en los últimos años se han identificado nuevos agentes etiológicos en las infecciones de las vías respiratorias inferiores, como rinovirus (RV) [2], metapneumovirus humano (HMNV) [3] y coronavirus humano (HCoV) [4]. Debido a la emergencia de virus respiratorios se han diseñado nuevas pruebas diagnósticas para poder detectar la presencia de los virus endémicos, epidémicos y de estos nuevos agentes infecciosos. Recientemente se desarrolló el panel de virus respiratorios (RVP) x TAG (Luminex Molecular Diagnostics Inc., Toronto, Canada) basado en la tecnología de microarreglos en suspensión, que ha mostrado una sensibilidad diagnóstica por sobre los métodos de cultivo viral tradicional, y comparable a las pruebas de PCR en tiempo real para virus respiratorios. Esta técnica permite identificar por métodos espectrofotométricos los productos de amplificación de 19 tipos y subtipos distintos de virus respiratorios en una sola prueba [5].

La técnica Luminex xTAG® se basa en la combinación de distintos conceptos tecnológicos de probada solvencia como la citometría de flujo, el uso de esferas, el procesamiento digital de las señales y la química tradicional, que nos permite realizar una gran variedad de bioensayos de una manera rápida, sensible y eficaz. Esta metodología implica un proceso que marca internamente con dos fluorocromos distintos, a una serie de microesferas de poliestireno. Es posible obtener hasta 100 grupos de microesferas distintas, cada una con su patrón único de color, identificable por láser. Cada grupo de microesferas se conjuga con un reactivo específico del bioensayo en cuestión. El analizador automático desarrollado por Luminex es capaz de identificar a cada grupo de microesferas y detectar la fluorescencia asociada durante el ensayo. La combinación de los distintos grupos de microesferas en un único pocillo nos permite analizar hasta 100 parámetros simultáneamente en una misma muestra, de una manera rápida, precisa y con pequeños volúmenes de muestra [6, 7].

OBJETIVOS

Comparar el panel de detección simultánea de virus respiratorios, Luminex xTAG® RVP con las técnicas convencionales utilizadas en el laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y muestras. Se realizó un estudio retrospectivo de un total de 119 muestras de aspirados nasofaríngeos pertenecientes a 119 niños hospitalizados en el Servicio de Urgencias de Pediatría del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, diagnosticados de infección de las vías respiratorias. Se recopilaron los datos clínicos y epidemiológicos de

los pacientes. El promedio de edad de los pacientes fue de 24,4 meses, siendo en su mayoría lactantes: el 41,2% fueron menores de 6 meses, el 34.5 % mayores de 6 meses y menores de 5 años, el 5% mayores de 5 años y menores de 10 años y el 4.2% mayores de 10 y menores de 18 años. Un 57% de los pacientes fue de sexo masculino y el principal diagnóstico fue bronquiolitis.

Las muestras fueron escogidas para tener una mayor representatividad de los virus. De las 119 muestras, previamente estudiadas por técnicas convencionales, 97 tenían un resultado positivo para uno o más virus. Además, se estudiaron 22 muestras con resultado negativo por dichas técnicas.

Grupo control. Se estudiaron 20 muestras de aspirados nasofaríngeos de niños sanos, menores de 5 años, que asistieron a visita control en el Centro de Atención Primaria o consultas externas del hospital y que no habían presentado infección en los 14 días previos a la visita.

Todas las muestras fueron recogidas y divididas en dos alícuotas. Una alícuota (3 ml) fue procesada mediante las técnicas convencionales y otra alícuota fue congelada -80°C para los siguientes análisis.

Técnicas convencionales de detección. Las muestras fueron previamente estudiadas por técnicas convencionales utilizadas en el laboratorio de microbiología: Inmunocromatografía (ICT) (Binax Now, Portland, Maine, USA) y/o Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Chemicon International, Temecula, USA) para la detección de VRS, Influenza A y B, Parainfluenza 1-3 y Adenovirus. Para la detección de hMPV se utilizó la técnica Pro hMPV™ 10 Real Time Assay Kit (Prodesse Inc., Waukesha, WI, USA).

Panel viral Luminex xTAG® RVP. El panel de virus respiratorios evaluado, Luminex xTAG respiratory virus panel (RVP), permite la detección de virus influenza A y B, virus parainfluenza 1, 2, 3 y 4, virus respiratorio sincitial, adenovirus, metapneumovirus humano, coronavirus, picornavirus (incluyendo enterovirus y

rinovirus). Además, esta técnica es capaz de subtipificar los virus influenza A en H1, H3, H5, los virus respiratorios sincitial en subtipos A y B y los coronavirus en OC43, 229E, NL63 y HKU1³.

Los ácidos nucleicos fueron extraídos usando el extractor automático EasyMAG (bioMérieux), eluyendo en un volumen final de 50 μl . 400 cada muestra.

Análisis estadísticos. Se calculó la sensibilidad, especificidad e Índice Kappa (k) de Luminex xTAG RVP. Los cálculos fueron desarrollados utilizando VassarStats Tools (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.htm>). Variables continuas fueron analizadas utilizando la prueba de Mann-Whitney. En el caso de variables cualitativas se empleó la prueba de Chi-cuadrado. Se utilizó el programa Stata 9.2 (Stata Corp., College Station, TX, USA). Todos los análisis fueron realizados con un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS

Concordancia de las técnicas. De las 119 muestras de niños diagnosticados con infección respiratoria, 105 (88%) muestras tuvieron un resultado positivo para 1 o más virus y 14 (12%) tuvieron un resultado negativo utilizando el nuevo panel viral, mientras que con las técnicas convencionales se detectaron 97 (82%) muestras con 1 o más virus y 22 (18%) muestras fueron negativas. En la figura 1 se muestra el número de muestras positivas para cada virus detectado por ambas técnicas.

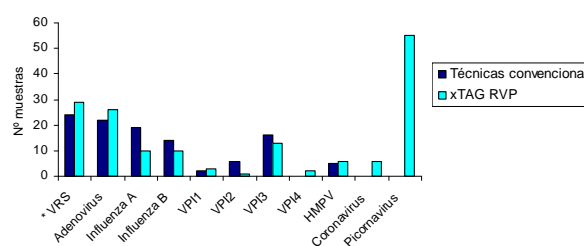


Fig 1. Comparación de los virus detectados por técnicas convencionales y Luminex xTAG® RVP.

* VRS representa los subtipos A y B en el caso de la nueva técnica.

Tabla 2. Detección de VPI1, VPI2 y HMPV mediante técnicas convencionales y xTAG RVP

| Virus | Nº muestras con resultado (Técnicas convencionales*/ xTAG RVP) | | |
|-------|--|-----|-----|
| | +/+ | +/- | -/+ |
| VPI1 | 1 | 1 | 2 |
| VPI2 | 1 | 5 | 0 |
| HMPV | 5 | 0 | 1 |

* ICT e IF para la detección de VPI1 y VPI2, y RT-PCR a tiempo real para la detección de HMPV.

En el caso de VPI4, coronavirus y picornavirus, no se disponen de técnicas convencionales de detección en el laboratorio, por lo que no es posible compararlos. Sin embargo, cabe destacar que picornavirus (enterovirus y rinovirus) se encontró en un 46% del total de muestras de niños enfermos, siendo el virus más frecuente detectado por la técnica xTAG RVP.

En la tabla 1 se resumen los resultados para cada virus estudiado, por las técnicas convencionales y por xTAG RVP. Debido a que ninguno de los dos es un verdadero gold estándar para la detección de virus respiratorios, se calculó la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN para las técnicas convencionales usando el xTAG RVP como *gold standard* y viceversa.

Los virus VRS y Influenza B presentan una buena correlación (rango índice Kappa entre 0,61-0,8) entre las técnicas estudiadas. Adenovirus, Influenza A y VPI3 presentan una correlación moderada (rango de índice Kappa entre 0,41-0,6). En el caso de Influenza A, 5 de las 11 muestras positivas por las técnicas convencionales y negativas para xTAG RVP se presentaron en coinfección con otro virus.

En el caso de VPI 1, VPI 2 y HMPV no se pudo calcular la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN e índice Kappa debido al bajo número de muestras positivas en el grupo estudiado. La Tabla 2 muestra los resultados encontrados para estos virus según las técnicas utilizadas. En el caso de VPI2, 4 de las 5 muestras positivas por las técnicas convencionales y negativas

Tabla 3. Coinfecciones detectadas a través de xTAG RVP

| Coinfecciones | Nº muestras |
|--------------------------------------|-------------|
| Adenovirus, Picornavirus | 10 |
| VRSB, Picornavirus | 8 |
| Influenza B, Picornavirus | 3 |
| VRSA, Picornavirus | 2 |
| VRSA, Adenovirus | 2 |
| PIV3, Picornavirus | 2 |
| HMPV, Adenovirus | 1 |
| PIV1, Coronavirus | 1 |
| PIV1, PIV3 | 1 |
| PIV2, Picornavirus | 1 |
| PIV3, Adenovirus | 1 |
| PIV3, Coronavirus | 1 |
| VRSA, Adenovirus, Picornavirus | 3 |
| VRSB, Adenovirus, Picornavirus | 1 |
| VRSB, HMPV, Picornavirus | 1 |
| VRSB, PIV4, Picornavirus | 1 |
| VRSB, Coronavirus, Picornavirus | 1 |
| PIV3, Adenovirus, Picornavirus | 1 |
| VRSB, HMPV, Adenovirus, Picornavirus | 1 |
| VRSB, PIV4, Adenovirus, Picornavirus | 1 |

para xTAG RVP se presentaron en coinfección con otro virus, lo que podría corresponder a una reacción cruzada de las técnicas de ICT o IF.

Estudio de las coinfecciones. Por medio de las técnicas convencionales, se detectó un 8,4% de muestras en coinfección con 1 o más virus y con la técnica xTAG RVP se detectó en un 43% de muestras una coinfección. En el caso de las técnicas convencionales, un 90% de las coinfecciones estuvo dada por 1 virus, un 9% por 2 virus y un 1% 1 virus. No se encontró coinfección de 4 virus o más. Para xTAG RVP se encontró un 57% de muestras con 1 virus, siendo picornavirus el principal virus detectado. Un 33% de las muestras presentó coinfección con 2 virus, un 8% con 3 virus y un 2% con 4 virus (Tabla 3).

Tabla 4. Virus detectados en muestras de niños sanos mediante técnicas convencionales y xTAG RVP.

| Muestra | Técnicas convencionales * | xTAG RVP |
|---------|---------------------------|--------------------|
| S1 | - | Picornavirus |
| S2 | - | - |
| S3 | HMPV | HMPV, Picornavirus |
| S4 | - | PIV2, Picornavirus |
| S6 | - | Picornavirus |
| S9 | - | Picornavirus |
| S10 | - | Picornavirus |
| S11 | - | Picornavirus |
| S12 | VRS | VRSB |
| S13 | - | Picornavirus |
| S14 | - | - |
| S15 | - | Picornavirus |
| S16 | - | - |
| S17 | - | PIV1, Picornavirus |
| S18 | - | Picornavirus |
| S19 | - | Picornavirus |
| S20 | PIV3 | - |
| S21 | - | - |
| S22 | - | Picornavirus |
| S23 | - | - |

* ICT e IF para la detección de VRS, Influenza A y B , Adenovirus, Parainfluenza 1, 2 y 3

RT-PCR a tiempo real para la detección de HMPV.

- : Negativo

Las principales coinfecciones estuvieron dadas por picornavirus (10 muestras) y VRSB-Picornavirus. Como se mostró en la figura 1, según la técnica xTAG RVP, Adenovirus, VRS y picornavirus fueron los virus más frecuentes en el grupo estudiado.

No se encontraron diferencias significativas entre el número de virus detectado y la edad, sexo y gravedad (medida en días de hospitalización y días de oxigenoterapia) del paciente.

Estudio niños sanos. Con respecto a las muestras del grupo de niños sanos, xTAG RVP detectó al menos un virus en el 70% (14/20) de las muestras. La sonda enterovirus/rinovirus fue detectada en un 65% (13/20) de las muestras. En comparación, las técnicas

convencionales detectaron la presencia de 1 virus en sólo 3 muestras (15%), coincidiendo en dos de ellas con la técnica xTAG RVP (Tabla 4).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, el nuevo ensayo de detección de múltiples virus, Luminex xTAG® RVP, fue comparado con las técnicas convencionales utilizadas en el laboratorio (IF, ICT y RT-PCR). Dicha técnica, ya ha sido previamente comparada con técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, reportando una muy buena correlación entre ambas técnicas [8]. Según nuestros resultados, de las 119 muestras de niños diagnosticados con infección respiratoria, 105 (88%) tuvieron un resultado positivo para 1 o más virus y 14 (12%) tuvieron un resultado negativo utilizando el nuevo ensayo, mientras que con las técnicas convencionales se detectaron 97 (82%) muestras con 1 o más virus y 22 (18%) muestras fueron negativas.

En la Tabla 1 se resumen los resultados para cada virus estudiado por las técnicas convencionales y por Luminex. Debido a que ninguno de los dos es un verdadero *gold standard* para la detección de virus respiratorios, se calculó la sensibilidad y especificidad para las técnicas convencionales usando Luminex como *gold standard* y viceversa, así como la correlación entre ellas. El VRS e influenza B presentan una buena correlación (rango índice Kappa entre 0,61-0,8) entre las técnicas estudiadas. Adenovirus, influenza A y VPI3 presentan una correlación moderada (rango de índice Kappa entre 0,41-0,6). En el caso de influenza A, 5 de las 11 muestras positivas por las técnicas convencionales y negativas para Luminex se

presentaron en coinfección con otro virus, lo que podría corresponder a una reacción cruzada de las técnicas de ICT o IF. Lo mismo puede ocurrir en el caso de adenovirus, donde 4 de las 7 muestras positivas sólo por técnicas convencionales se presentan en coinfección con otros virus.

Los picornavirus (enterovirus/rinovirus) se encuentran tanto en las muestras estudio como en las muestras

control en un elevado porcentaje (46% y 65% respectivamente). La posibilidad de detección de estos virus en la población estudiada es un elemento de confusión. La interpretación de un resultado positivo para picornavirus es difícil debido al elevado porcentaje de prevalencia en niños asintomáticos en nuestra población (65%) (Tabla 4). Sin embargo, hay que tener en cuenta que RV es considerado cada vez con mayor frecuencia un agente etiológico frecuente en las infecciones respiratorias en niños [8-10]. En este sentido, este tipo de tecnología podría aportar al representar un avance en el diagnóstico de las infecciones por RV, que cada día parece más justificado por su incidencia y relación con procesos respiratorios de gravedad más o menos severos en niños y pacientes con EPOC [11].

Con la nueva técnica de detección múltiple se detectó un elevado número de muestras en coinfección con uno o más virus, que mediante las técnicas convencionales no son detectadas. El principal virus detectado en las coinfecciones fue picornavirus (Tabla 3), Sin embargo, hay que considerar que picornavirus no forma parte de los virus respiratorios incluidos en las técnicas convencionales. Respecto a la elevada detección de coinfecciones con picornavirus, desconocemos aún el valor clínico de estos hallazgos. Marguet C. et al. estudiaron 209 niños menores de 1 año ingresados por bronquiolitis, encontrando que la presencia dual de VRS y RV no aumentan la severidad de la enfermedad [12]. Además, en cuanto a las infecciones respiratorias múltiples en general, un reciente estudio desarrollado por Brand HK. et al. encontraron que la severidad de la bronquiolitis en niños menores de dos años no está asociada con la detección de múltiples virus. Según sus resultados, existen otros factores como la edad que contribuyen en un mayor grado a la gravedad de la enfermedad [13]. Por otro lado, Semple MG. et al. encontraron que la coinfección de VRS y HMPV en niños menores de 2 años se asocia con bronquiolitis severa [14]. Al igual que estos últimos estudios, nuestros análisis no encontraron diferencias significativas entre el número de virus detectado y la edad, sexo y gravedad (medida en días de hospitalización y días de oxigenoterapia) del

paciente. Sin embargo, algunos estudios han encontrado que la detección de múltiples virus en niños está asociada a la presencia de fiebre alta, mayor frecuencia de uso de antibióticos y hospitalizaciones más largas [15, 16]. La inclusión de estrategias de diagnóstico basadas en la PCR multiplex podría ser de gran ayuda en la identificación de la verdadera relevancia de las infecciones víricas múltiples, así como las características y la gravedad asociados con esta condición.

El ensayo Luminex es una herramienta muy útil para el estudio, diagnóstico y manejo de las infecciones respiratorias víricas. La identificación simultánea de 19 virus implica una mejora en la rapidez del diagnóstico, algo clave para un correcto tratamiento y manejo del paciente. Esta nueva tecnología es sólida y reproducible, con múltiples posibilidades de aplicación en microbiología clínica.

La incorporación en forma paulatina de este tipo de técnicas moleculares en los laboratorios, posibilitará el diagnóstico oportuno y el control de infecciones, evitando la transmisión intrahospitalaria, principalmente en pacientes con factores de riesgo. El conocimiento de los mecanismos de transmisión y las interacciones entre virus y hospedador, permitirá a su vez un mejor manejo, con la posibilidad de acceder tanto a vacunas como a tratamientos específicos.

Por ahora, la principal limitación de este tipo de ensayo es que requiere una elevada tecnología y la necesidad de varias horas de trabajo en el laboratorio para generar los resultados. En la mayoría de los casos, las muestras no pueden ser tratadas individualmente y los resultados se dan generalmente un día después de la recepción de la muestra. Esto también significa que estas pruebas podrían no ser realizadas en condiciones de emergencia si el personal capacitado no está presente. Otra dificultad viene por la interpretación de los resultados. Mientras que los métodos convencionales están limitados por la excesiva presencia de resultados negativos, los ensayos basados en PCR multiplex presentan una importante gama de resultados positivos, siendo una de las

principales dificultades reconocer cuál es el agente causal de los trastornos clínicos y si la asociación entre ellos puede desempeñar un papel en la severidad de la enfermedad. Como se mencionó anteriormente, el papel de las coinfecciones víricas puede ser evaluado más fácilmente al disponer de estas nuevas herramientas de diagnóstico. Finalmente, en contraste con la PCR en tiempo real, esta técnica no es cuantitativa y la persistencia residual de genoma vírico en ausencia de una actividad replicativa puede ser fuente de una interpretación errónea.

A pesar de estas limitaciones, la aplicación rutinaria de esta nueva herramienta contribuiría a la re-evaluación de los datos clínicos de una lista de agentes patógenos de primera línea (ya sea bacterias o virus), contribuyendo a la construcción de nuevos algoritmos para el diagnóstico y el tratamiento de las infecciones respiratorias graves. Sin embargo, será necesario disminuir su coste, simplificación y automatización antes de que sustituyan a las técnicas actualmente empleadas. Desde el punto de vista coste-beneficio, esta nueva técnica sería de indudable valor en poblaciones de riesgo como son pacientes oncohematológico, inmunodeprimidos y ancianos. Además, podría ser interesante utilizar el panel para detectar posibles infecciones víricas en los procesos de reactivación de la EPOC. Por el momento, estas pruebas podrían ser más un complemento que un sustituto de las técnicas actualmente empleadas, que permitirían detectar agentes víricos implicados en infecciones graves, que han escapado a otras técnicas, sobre todo en población de riesgo. Este tipo de técnica permite ampliar las posibilidades diagnósticas para aquellos virus que, por sus características, no son detectables por otros métodos o son de difícil cultivo.

REFERENCIAS

1 Peret TC, Boivin G, Li Y, et al. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis.* 2002; 185: 1660-1663.

2 McErlean P, Shackelton LA, Lambert SB, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Characterisation of

a newly identified human rhinovirus, HRV-QPM, discovered in infants with bronchiolitis. *J Clin Virol.* 2007; 39: 67-75.

3 van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med.* 2001; 7: 719-724.

4 Woo PC, Yuen KY, Lau SK. Epidemiology of coronavirus-associated respiratory tract infections and the role of rapid diagnostic tests: A prospective study. *Hong Kong Med J.* 2012; 18 Suppl 2: 22-24.

5 Pabbaraju K, Tokaryk KL, Wong S, Fox JD. Comparison of the Luminex xTAG respiratory viral panel with in-house nucleic acid amplification tests for diagnosis of respiratory virus infections. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 3056-3062.

6 Krunic N, Yager TD, Himsworth D, Merante F, Yaghoubian S, Janeczko R. XTAG RVP assay: Analytical and clinical performance. *J Clin Virol.* 2007; 40 Suppl 1: S39-46.

7 Merante F, Yaghoubian S, Janeczko R. Principles of the xTAG respiratory viral panel assay (RVP assay). *J Clin Virol.* 2007; 40 Suppl 1: S31-35.

8 Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsolia M, et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165: 1285-1289.

9 Takeyama A, Hashimoto K, Sato M, et al. Rhinovirus load and disease severity in children with lower respiratory tract infections. *J Med Virol.* 2012; 84: 1135-1142.

10 Calvo Rey C, García García ML, Casas Flecha I, et al. Role of rhinovirus in respiratory tract infections in hospitalized children. *An Pediatr (Barc).* 2006; 65: 205-210.

11 Ariles-Campelo F, Pérez-González M del C, Caballero-Hidalgo A, Pena-López MJ. Etiology of acute viral respiratory tract infections in children from Gran Canaria, The Canary Islands (Spain). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006; 24: 556-561.

12 Marguet C, Lubrano M, Gueudin M, et al. In very young infants severity of acute bronchiolitis depends on carried viruses. *PLoS One.* 2009; 4: e4596.

13 Brand HK, de Groot R, Galama JM, et al. Infection with multiple viruses is not associated with

increased disease severity in children with bronchiolitis.

Pediatr Pulmonol. 2012; 47: 393-400.

14 Semple MG, Cowell A, Dove W, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2005; 191: 382-386.

15 Calvo C, García-García ML, Blanco C, et al. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. *J Clin Virol.* 2008; 42: 268-272.

16 Midulla F, Scagnolari C, Bonci E, et al. Respiratory syncytial virus, human bocavirus and rhinovirus bronchiolitis in infants. *Arch Dis Child.* 2010; 95: 35-41.

Resultados

Tabla 1. Sensibilidad, especificidad y concordancia para cada virus utilizando técnicas convencionales y xTAG RVP.

| Virus | Nº muestras con resultado (Técnicas convencionales/ RVP) | | | | xTAG RVP comparado con técnicas convencionales como <i>gold estandard</i> | | Técnicas convencionales comparadas con xTAG RVP como <i>gold estandard</i> | | <i>Kappa</i> | | | |
|-------------|--|-----|-----|-----|--|-------------------|---|-------------------|--------------|-------|-----------------|-----------------|
| | +/+ | +/- | -/+ | -/- | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) | <i>k</i> | ES | Límite inferior | Límite superior |
| VRS | 20 | 4 | 9 | 86 | 83.3 | 90.5 | 68.9 | 95.6 | 0.685 | 0.082 | 0.524 | 0.847 |
| Adenovirus | 15 | 7 | 11 | 86 | 68.2 | 88.7 | 57.7 | 92.5 | 0.531 | 0.102 | 0.331 | 0.731 |
| Influenza A | 8 | 11 | 2 | 98 | 42.1 | 98.0 | 80.0 | 89.9 | 0.496 | 0.132 | 0.238 | 0.755 |
| Influenza B | 8 | 6 | 2 | 103 | 57.1 | 98.1 | 80.0 | 94.5 | 0.630 | 0.126 | 0.383 | 0.878 |
| VPI 3 | 9 | 7 | 4 | 99 | 56.3 | 96.1 | 69.2 | 93.4 | 0.569 | 0.124 | 0.326 | 0.811 |

5. DISCUSIÓN

Las infecciones respiratorias víricas continúan siendo una de las causas principales de morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas. Diferentes estudios han calculado las tasas de hospitalización por infecciones de las vías respiratorias inferiores. En España, un estudio de la Comunidad Valenciana calculó un coste por hospitalización únicamente debida a infecciones por VRS de 3.618.000 euros anuales en dicha comunidad [4]. Aunque frecuentemente son enfermedades autolimitadas, en determinados grupos de riesgo como los niños, los ancianos y los inmunodeprimidos, pueden asociarse con cuadros clínicos graves e incluso a veces, mortales. Para los niños menores de 5 años de edad, estas infecciones se clasificaron como la segunda causa de la muerte, independientemente de su ubicación geográfica [135]. Está claramente establecido que la mayoría de las infecciones respiratorias de vías aéreas inferiores están causadas por un virus. En los niños, el VRS, VPI y el virus de la gripe son conocidos como las principales causas de bronquiolitis y enfermedades del tracto respiratorio inferior; sin embargo, hasta en un tercio de los casos no se consigue demostrar ningún agente etiológico. En los últimos 10 años los avances en la biología molecular han permitido el descubrimiento de algunos virus respiratorios humanos no identificados hasta ahora, que posiblemente quedaban incluidos en ese porcentaje de infecciones no diagnosticadas previamente, planteando nuevos desafíos tanto clínicos como terapéuticos. Además, estos avances tecnológicos han permitido también mejorar la sensibilidad de detección de los virus clásicos con respecto a las técnicas convencionales.

5.1 Estudio de la prevalencia de HMPV en niños menores de 5 años ingresados por infección respiratoria baja y sus características clínicas y epidemiológicas.

El HMPV es un patógeno emergente que se ha asociado con síntomas que van desde infecciones leves del tracto respiratorio superior a la neumonía grave, exacerbación del asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Fue aislado recientemente debido a las dificultades del virus para crecer en cultivos celulares tradicionales, mostrando un lento crecimiento en la línea celular de riñón de mono Rhesus (LLC-MK2) [136]. El ensayo molecular para la detección de HMPV descrito inicialmente por van den Hoogen et al. se ha utilizado en diferentes estudios [60, 137]. En todos estos estudios, la RT-PCR se realizó con detección mediante electroforesis en gel de agarosa seguida por secuenciación o hibridación para confirmar las muestras

positivas. Actualmente, se han realizado sólo unos pocos estudios utilizando los ensayos disponibles en el mercado. Por esto, existe la necesidad de optimizar reactivos y métodos comerciales de diagnóstico para la detección de la infección por HMPV. En la actualidad, no existe un *gold standard* ni consenso en un ensayo para la detección de HMPV en muestras clínicas. Las técnicas basadas en RT-PCR son en general los métodos de elección para la detección de HMPV, en su mayoría técnicas *in house* [138-141]. Sin embargo, también se han utilizado otros ensayos, tales como la amplificación isotérmica en tiempo real del ácido nucleico (NASBA) [142]. La mayoría de los protocolos de PCR detectan todos los genotipos de HMPV, que amplifican regiones conservadas dentro de los genes N y F. Desafortunadamente, los datos sobre la utilidad de estos ensayos son escasos, a pesar del hecho de que NASBA ha demostrado ser tan sensible como los métodos basados en la PCR.

Dada la falta de estudios en cuanto a nuevas técnicas de detección de HMPV, en esta Tesis se evaluaron dos nuevas técnicas comerciales para la detección de dicho virus. Una técnica corresponde a una RT-PCR en tiempo real y la otra a un EIA. El HMPV fue detectado en el 8% de los casos mediante la RT-PCR en tiempo real, y en el 9,3% de los casos con el EIA. La prevalencia observada en el presente estudio (8-9,3%) está de acuerdo con el rango de 5-10% observado entre los niños hospitalizados por infecciones respiratorias agudas en España [143] y otros países [144-147]. En un estudio previo realizado en Cataluña [148] se encontró una prevalencia de HMPV del 25%. Sin embargo, en este estudio sólo se incluyeron niños menores a 1 año, donde ocurre el pico de infección por HMPV, aumentando así la proporción de casos.

Según nuestros resultados, ambas técnicas tienen una buena correlación (94%) (Artículo 1, Tabla 1). Una evaluación previa de este enzoinmunoensayo [149] encontró que la sensibilidad del EIA era menor a la de una RT-PCR no comercial o *in house*. Sin embargo, la mayoría de las muestras que resultaron ser negativas mediante EIA y positivas por RT-PCR o cultivo celular se habían congelado durante al menos 4 años, dando lugar a una posible degradación de antígeno y por tanto afectando la sensibilidad de la técnica. En nuestro estudio, tres muestras fueron positivas para HMPV mediante la RT-PCR en tiempo real y negativas mediante EIA. Es posible que una baja carga vírica en estas muestras pueda limitar la sensibilidad del EIA, como ha descrito Kukavica-Ibrulj et al. [149]. Por otro lado, 6 muestras fueron positivas para HMPV sólo por EIA. Una de estas muestras se encontraba contaminada con sangre del paciente, lo cual puede inhibir la amplificación de la RT-PCR. El fabricante de la técnica indica que la presencia de sangre en la muestra puede

conducir a resultados falsos positivos. Por otra parte, los genotipos de HMPV pueden variar en temporadas consecutivas. Huck et al. [150] describieron la existencia de sublinajes de HMPV dentro del grupo A2 (A2a y A2b). Es posible que el EIA detecte una mayor proporción de estos sublinajes. Además, no podemos excluir la posibilidad de que el RNA se pueda haber degradado en las muestras congeladas, disminuyendo así el rendimiento de la RT-PCR en tiempo real. Por otro lado, los métodos de PCR son inherentemente más sensibles que los métodos basados en la unión antígeno anticuerpo. El límite de detección de la técnica de RT-PCR en tiempo real, expresado como una mediana de la dosis infectiva de cultivo de tejido (TCID), es de 10^1 - 10^2 TCID₅₀/ml, y del EIA es de 10^4 TCID₅₀/ml. Por esta razón, no podemos descartar la posibilidad de que las muestras positivas por EIA y negativas por la técnica de detección molecular sean falsos positivos. Curiosamente, ninguno de los pacientes con muestras positivas sólo por EIA requirió oxigenoterapia, en comparación con la mayoría de los niños que fueron positivos por ambas técnicas (Tabla 5). A pesar de que la técnica de RT-PCR en tiempo real sería una técnica más sensible y específica, el EIA aquí evaluado es una forma rápida, menos costosa y con buena especificidad comparada con una técnica molecular para la detección de HMPV en muestras clínicas, con la gran ventaja de que puede ser utilizada en los laboratorios de microbiología que no estén dotados de una plataforma molecular. En la tabla 5 se muestran los días de hospitalización, tratamiento con oxígeno y diagnóstico al alta de los 10 pacientes positivos para HMPV por las dos técnicas evaluadas.

Tabla 5. Días de hospitalización, tratamiento con oxígeno y diagnóstico de los 10 pacientes positivos para HMPV por RT-PCR en tiempo real y EIA.

| Paciente | Días de hospitalización | Días de oxígeno | Diagnóstico |
|-----------------|--------------------------------|------------------------|--------------------|
| 1 | 5 | 3 | Bronquiolitis |
| 2 | 3 | 2 | Neumonía |
| 3 | 6 | 2 | Bronquiolitis |
| 4 | 1 | 0 | Bronquiolitis |
| 5 | 9 | 8 | Bronquiolitis |
| 6 | 4 | 0 | Bronquiolitis |
| 7 | 5 | 1 | Bronquiolitis |
| 8 | 3 | 2 | Bronquiolitis |
| 9 | 5 | 0 | Bronquiolitis |
| 10 | 4 | 0 | Bronquiolitis |

En nuestra experiencia, HMPV estuvo involucrado en infecciones severas de las vías respiratorias que requirieron oxigenoterapia; sin embargo, no hubo muertes. Los niños con infección por HMPV (positivos por las dos técnicas evaluadas) requirieron terapia con oxígeno más frecuentemente que los niños que no estaban infectados con HMPV ($P = 0,005$), siendo el principal diagnóstico bronquiolitis. Además, según los resultados de otro estudio realizado en esta Tesis, HMPV no fue comúnmente detectado en muestras de niños sanos (5% grupo control) (Artículo 6, Tabla 4). El hecho de que HMPV se encuentre asociado a enfermedades respiratorias, pero no en niños asintomáticos y adultos, apoya su papel como un verdadero patógeno [61, 151]. Estudios previos han sugerido que la coinfección por HMPV y otros virus respiratorios es frecuente [141, 143]. Además, algunos estudios han indicado que la coinfección con VRS es más grave que la infección por VRS o HMPV como agentes etiológicos únicos [141, 144]. Sin embargo, en la población estudiada encontramos una baja tasa de coinfección. Se detectó otro virus respiratorio en tres muestras positivas (15%) para HMPV, y sólo una de estas coinfecciones fue por VRS. Debido a los diferentes métodos utilizados para detectar una amplia gama de virus respiratorios, la contribución exacta de cada virus en las infecciones del tracto respiratorio de nuestra población sigue siendo difícil de evaluar.

En nuestra experiencia, las nuevas técnicas aquí evaluadas tienen una rentabilidad en el diagnóstico de la infección por HMPV. Nuestros resultados, como otros similares, indican que HMPV es una de las principales causas de infección de las vías respiratorias bajas en niños pequeños. Incorporando la detección de HMPV en los laboratorios de microbiología, se puede mejorar el diagnóstico etiológico de las infecciones del tracto respiratorio en niños, especialmente el de las infecciones graves del tracto respiratorio inferior.

El estudio de prevalencia de HMPV en este apartado de la Tesis ha permitido la incorporación en rutina de la detección de este nuevo virus. La técnica escogida fue una inmunofluorescencia que incluye agentes etiológicos víricos clásicos en las infecciones respiratorias en niños: VRS, influenza A y B, Adenovirus, VPI 1-3, además del ya mencionado virus emergente HMPV.

En cuanto a la repercusión clínica de HMPV, es necesario realizar estudios a largo plazo para profundizar en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad y entender cómo responde la inmunidad de la población juvenil, ancianos e inmunodeprimidos a la infección por HMPV. A pesar de que se han realizado un gran

número de estudios sobre el impacto clínico de HMPV, son necesarios estudios más detallados para aclarar la importancia de la variación antigénica de HMPV en la población humana. Esto es importante para el desarrollo de vacunas eficaces que induzcan inmunidad protectora y tal vez dar una protección cruzada contra los virus relacionados, tales como el VRS, y también para el diseño de antivíricos.

Dentro de las limitaciones de nuestro estudio está la falta de un método de referencia (cultivo vírico) para un mejor análisis de la discordancia los resultados obtenidos con RT-PCR y EIA. Otra limitación importante es que no se incluye la detección de RV. Según recientes investigaciones, este virus sería el causante de una gran parte de las infecciones del tracto respiratorio en niños, tanto en vías respiratorias altas como bajas [132, 152, 153]. Además, como ya se ha descrito en el apartado 4.6 de esta Tesis, se estudió la utilidad de una nueva técnica molecular de detección de múltiples virus respiratorios (Artículo 6) encontrando que virus pertenecientes al grupo picornavirus (RV y enterovirus) fueron los virus que con mayor frecuencia se detectaron en muestras de niños ingresados por infección respiratoria (46%) en nuestra población. Sin embargo, el significado clínico de RV sigue siendo controvertido.

5.2 Estudio del papel de HBoV1 en niños menores de 5 años ingresados por infección respiratoria

Por otra parte, es necesario el estudio de diferentes técnicas moleculares que permitan esclarecer el papel de otros virus emergentes en las infecciones respiratorias. Según diferentes publicaciones, la prevalencia de HBoV1 oscila entre 1,5% a 19% [21, 71, 154]. En nuestra serie de pacientes, encontramos una elevada prevalencia de HBoV1 (24%), la más alta encontrada en España. La gran variación en la prevalencia de HBoV1 puede estar condicionada por las diferencias de sensibilidad de las técnicas utilizadas para la detección del virus, las poblaciones estudiadas y el momento de recolección de la muestra. Dentro de los estudios realizados en España, uno incluye una amplia selección de muestras respiratorias [155] mientras que otros tres estudios incluyen pacientes de hasta 14 años, donde la detección de HBoV1 es menor [156-158].

También es necesario considerar que la prolongada excreción del virus puede sobrestimar la prevalencia del virus cuando la prueba diagnóstica no está diseñada para diferenciar infección activa de excreción producto de infecciones previas, como

es el caso del uso de la PCR en estudios transversales de muestras de aspirado nasofaríngeo (NPA). Según previos estudios, la excreción de HBoV1 puede perdurar hasta 2 meses en niños con infección respiratoria sin patología de base [159] y hasta 4,5 meses en pacientes inmunodeprimidos [160]. De la misma forma, la estacionalidad del virus puede verse afectada debido a la inclusión de muestras que podrían ser positivas como consecuencia de la prolongada excreción del virus. Sin embargo, si consideramos sólo las muestras con alta carga vírica, la estacionalidad del virus sigue siendo principalmente en meses de invierno, al igual que si se incluyen todas las muestras. El diseño de estudios longitudinales, donde se considere un muestreo seriado de los pacientes, puede contribuir a diferenciar reinfecciones de excreción vírica perteneciente a un proceso anterior.

Al igual que en el estudio de HMPV, una posible limitación de nuestro trabajo es no incluir la detección de RV. Como hemos comentado anteriormente, también se estudió la presencia de RV al evaluar una nueva técnica molecular de detección de múltiples virus respiratorios. Según estos resultados, el grupo picornavirus (RV y enterovirus) fueron los virus que con mayor frecuencia (46%) se detectaron en muestras de niños ingresados por infección respiratoria. Además, según la literatura actual, los RV están considerados cada vez con mayor frecuencia un agente etiológico frecuente en las infecciones respiratorias en niños [57, 153, 161]. Por lo tanto, las coinfecciones asociadas a HBoV1 pueden estar subestimadas. Sin embargo, coinfecciones con RV no han incrementado la gravedad de la enfermedad [134, 162] y como mencionamos anteriormente, su valor clínico aún es controvertido.

Para el estudio cualitativo de HBoV1 se utilizó una PCR convencional, mientras que para el estudio cuantitativo del virus se utilizó una PCR a tiempo real. Sin embargo, en un estudio previo las proporciones de resultados positivos obtenidos con los dos métodos no fueron significativamente diferentes [163]. En contraste con los métodos de PCR utilizados para el estudio de HBoV1 y HMPV, los otros virus respiratorios fueron examinados por ICT/IF. En general, los ensayos de PCR son más sensibles que los métodos de detección de antígenos. Por lo tanto, la prevalencia de los virus respiratorios que fueron analizados por ICT/IF podría ser mayor que la encontrada en nuestro estudio. Sin embargo, como se describe en el Artículo 6, se obtuvo una buena correlación entre la detección de VRS detectado por ICT/IF comparado con una técnica de detección molecular y una correlación moderada en la detección de adenovirus y el virus influenza. El VRS fue el virus más frecuentemente identificado,

apoyando su papel como el principal virus asociado a las infecciones del tracto respiratorio en niños pequeños [164].

El HBoV1 fue detectado con mayor frecuencia en pacientes con infección del tracto respiratorio que en niños asintomáticos ($P= 0.046$). En nuestra serie, el 71% de las muestras de niños asintomáticos fue tomada durante los meses en que HBoV1 fue detectado en niños ingresados.

Allander et al. [21] definieron dos subgrupos caracterizados por los niveles de DNA de HBoV1 mayores o menores a 10^4 copias/ml. Según este estudio, una carga vírica de HBoV1 superior a 10^4 copias/ml corresponde a una carga vírica alta y está asociada significativamente con sintomatología. Basado en la hipótesis de que una carga vírica alta puede ser un indicio de la relevancia patogénica, se comparó la carga vírica en NPA con la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, en nuestro estudio no se encontró una correlación entre la carga vírica y la gravedad del paciente, similarmente a lo descrito por Flores et al. [165].

En cuanto al análisis filogenético, nuestros hallazgos indican que los dos genotipos de HBoV1 identificados en nuestra población están estrechamente relacionados con las cepas iniciales de HBoV1 identificadas en Suecia [14] y son comparables con las cepas de otros países. Esto sugiere que las secuencias de nucleótidos de los genes VP1/VP2 están altamente conservadas entre los virus circulantes en diferentes partes del mundo.

Los criterios para el diagnóstico de la infección por HBoV1 se encuentran aún pendientes de consensuar. Usando como criterio sólo resultados positivos para HBoV1 mediante PCR en NPA, algunos casos de infección aguda por HBoV1 (evidenciados por viremia y/o resultados de seroconversión) podrían perderse [166]. Además, como comentábamos anteriormente, es posible obtener falsos positivos como resultado de la persistencia de DNA del virus o también por contaminación de la mucosa nasal. Kantola et al. [166] encontraron que las infecciones respiratorias debidas a HBoV1 pueden ser sistémicas, provocando respuesta inmune de células B, y pudiendo ser diagnosticadas serológicamente. Las pruebas serológicas deben incluirse en el diagnóstico, para fortalecer la asociación causal entre HBoV1 y las enfermedades respiratorias. Actualmente se desconoce cómo y en qué contexto puede afectar HBoV1 a individuos inmunodeprimidos, mujeres embarazadas, y personas de edad

avanzada. Además, se requiere conocer acerca de la capacidad de neutralización y la duración de la inmunidad contra HBoV1.

En conclusión, en la población estudiada (niños menores de 5 años) HBoV1 se encuentra con frecuencia en infecciones del tracto respiratorio, a menudo conjuntamente con otros virus respiratorios. Por otra parte, nuestros datos sugieren que HBoV1 podría ser un agente etiológico de infección del tracto respiratorio en esta población. HBoV1 es detectado en niños sanos con una frecuencia significativamente menor que en niños con infección respiratoria. Se requieren estudios adicionales para definir completamente el perfil epidemiológico de este nuevo patógeno, siendo probablemente el serodiagnóstico el método de elección, esto debido a que la cuantificación de la carga viral no ha dado resultados definitivos.

5.3 Evaluar la utilidad de las técnicas inmunológicas y moleculares en el manejo de los pacientes con Influenza A (H1N1) 2009.

La reciente aparición y propagación mundial de la nueva influenza A (H1N1) 2009 [85, 167] puso en relieve la necesidad de evaluar técnicas rápidas de detección del virus. La detección rápida de virus de influenza es importante para la aplicación de las estrategias preventivas y el inicio de terapias antivíricas en pacientes con riesgo de complicaciones.

La RT-PCR en tiempo real es actualmente la técnica de referencia para el diagnóstico de infección para el virus influenza [168], altamente sensible y rápida. Sin embargo es una técnica costosa y requiere equipamiento y personal especializado. Las técnicas rápidas de detección de antígeno, aunque menos sensibles, han demostrado tener beneficios clínicos y económicos cuando se emplean como métodos de cribado durante la temporada de gripe [169].

Por esta razón, en este apartado de la Tesis se evaluó la utilidad de una técnica inmunológica diseñada para la detección de influenza A estacional en la detección del nuevo virus influenza A (H1N1) 2009, comparado con la técnica de referencia para el nuevo virus recomendada por los CDC.

En nuestro estudio se evaluaron 512 muestras de pacientes con sospecha de influenza A (H1N1) 2009. Según nuestros resultados, la técnica inmunológica

evaluada presentó una sensibilidad del 60,3%. A diferencia de estudios previos, nuestros datos indican una alta sensibilidad y especificidad de este inmunodiagnóstico para la detección del nuevo virus (Artículo 2, Tabla1) y que estos parámetros varían de acuerdo a la edad del grupo de pacientes y estadio del brote. Si separamos pacientes adultos de niños, la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (PPV) y valor predictivo negativo (NPV) disminuyen. El PPV en pacientes menores de 18 años de edad fue mayor que en pacientes adultos, y similar si se considera sólo el estadio agudo de la epidemia. El elevado PPV del inmunoensayo observado en este estudio indica que un resultado positivo durante el periodo pandémico no necesita ser confirmado por RT-PCR a tiempo real. Sin embargo, un resultado negativo debe ser confirmado por la técnica de referencia.

Varios estudios describen una baja sensibilidad para el ensayo de inmunodiagnóstico BinaxNOW en comparación con la técnica de referencia RT-PCR en tiempo real en la detección del nuevo virus influenza A (H1N1) 2009 [170-172]. Estos autores encontraron que la sensibilidad del inmunoensayo se encontraba en el rango de 11-40%. La elevada sensibilidad encontrada en nuestro estudio podría ser explicada por la población de estudio, la mayoría de los cuales fueron niños (62%), que presentan mayor carga vírica, y también por la alta calidad de la recogida de muestras. Sólo se tomaron muestras de NPA y los pacientes fueron seleccionados sobre la base de una alta sospecha del nuevo virus por médicos expertos. Además, los estudios mencionados anteriormente incluyeron sólo un pequeño número de los pacientes.

Un estudio previo [170] determinó que la sensibilidad de las técnicas de diagnóstico rápido para la influenza disminuye a medida que el título vírico en la muestra disminuye. De acuerdo con estos resultados, nuestros hallazgos muestran que la sensibilidad del inmunoensayo disminuye sustancialmente a medida que los títulos víricos son más bajos (determinados por los valores de Ct de la RT-PCR en tiempo real).

Por lo tanto, este ensayo inmunocromatográfico podría ser una técnica útil para el diagnóstico de la nueva gripe, debido a que esta prueba proporciona resultados rápidos (30 minutos) y no requiere de equipamientos costosos. Esto podría ser especialmente importante para centros asistenciales con limitaciones de tiempo y recursos necesarios para realizar una RT-PCR en tiempo real. A diferencia de estudios anteriores [170-172], nuestros datos muestran que la técnica inmunológica evaluada es útil principalmente en pacientes menores de 18 años y durante la fase aguda de la

epidemia, siempre y cuando el virus circulante sea el pandémico. Sin embargo, una gran limitación de este ensayo es que no distingue el nuevo virus de la cepa estacional del virus influenza.

Siguiendo con el mismo objetivo de estudiar técnicas para la detección rápida del nuevo virus influenza, se evaluó una nueva técnica molecular (Speed-Oligo®), basada en una PCR acoplada a un revelado en tira reactiva (oligocromatografía) que posibilita una detección cualitativa rápida del virus en muestras clínicas. La oligocromatografía es una técnica basada en una adaptación de la inmunocromatografía, y se ha propuesto recientemente como una alternativa fácil y rápida para la detección de ácidos nucleicos [173, 174].

Cómo se comentó anteriormente, la RT-PCR en tiempo real tiene la ventaja de ser rápida y de alta sensibilidad, pero tiene la desventaja de requerir personal y equipo especializado. La técnica molecular evaluada es una prueba fácil de realizar y con una etapa de revelado final muy rápida (5 min). Esta técnica requiere un equipamiento mínimo, con sólo un termociclador (convencional) y un termobloque es posible realizar la misma. Esta tecnología fue también evaluada por nuestro grupo para la detección de *Mycoplasma pneumoniae* (Anexo I) presentando una buena sensibilidad y excelente especificidad comparada con una técnica serológica. Según nuestros resultados, esta nueva técnica tiene una excelente correlación con la técnica de referencia para la detección del nuevo virus ($k = 0,833$) y una buena sensibilidad (86,5%) (Artículo 3, Tabla 2). Además, tiene un elevado valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (NPV) (Artículo 3, Tabla 3), con valores muy superiores a los encontrados con la técnica rápida de detección de antígenos. Sin embargo, este estudio, al igual que el anterior, se llevó a cabo durante un período de alta prevalencia (julio- noviembre de 2009) y es posible que dichos parámetros no sean tan altos en el contexto de las infecciones estacionales. A diferencia de la técnica rápida de detección de antígenos evaluada en la primera parte de este estudio (Artículo 2), los resultados fueron similares entre pacientes adultos y pediátricos. En ambos casos se obtuvo una alta sensibilidad, especificidad, PPV y NPV. Por otro lado, 1 de 9 muestras de influenza A estacional mostró reacción cruzada con la nueva técnica. Sin embargo, no se detectó reacción cruzada al evaluar muestras positivas para adenovirus, VPI1 y *Bordetella pertussis*.

Dentro de las ventajas de esta nueva técnica es que la etapa de detección tarda sólo unos minutos. Considerando que la etapa de RT-PCR tarda 30 min, la PCR 55 min y la

detección requiere no más de 5 minutos, el tiempo necesario para todo el procedimiento es de alrededor de 1,5 h. Además, la tira revela un resultado positivo y negativo claro (Figura 9). Otra gran ventaja es que la etapa de detección evita el uso de los métodos clásicos asociados a la PCR como son la electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Sin embargo, una gran desventaja es que no detecta la presencia de gripe estacional a diferencia de la técnica de referencia. Además, no posee un control interno de extracción que indique la calidad de la muestra.

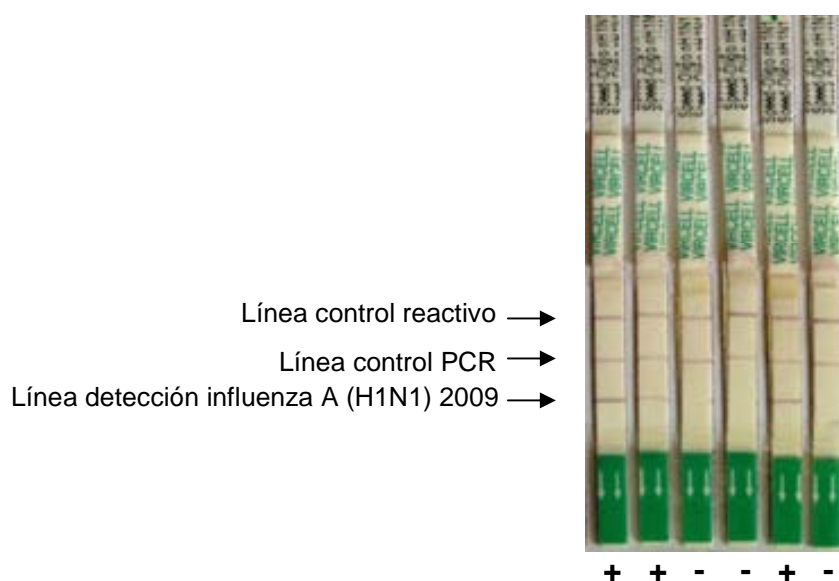


Figura 9. Tiras de detección del ensayo Speed-oligo para diagnóstico del virus influenza A (H1N1) 2009. (-) Resultado negativo, (+) Resultado positivo.

Como última parte de este segmento de la Tesis, se estudió la presencia de cepas de influenza A (H1N1) 2009 resistentes a oseltamivir mediante la técnica de pirosecuenciación. La monitorización de la resistencia antivírica es un componente esencial de la vigilancia del virus influenza. El virus influenza A (H1N1) 2009 está en continua evolución, existiendo la preocupación de que pueda adquirir segmentos de genes a través de la recombinación con otros virus circulantes, tanto de fuentes humanas como animales para producir un nuevo virus que podría tener una mayor patogenicidad en humanos.

Existe una serie de métodos que se han utilizado para la detección de resistencias incluyendo la RT-PCR en tiempo real [175-177], RT-PCR convencional y la secuenciación convencional. La pirosecuenciación combina los beneficios de algunas de estas técnicas, siendo un método rápido y de alto rendimiento.

En nuestro estudio no encontramos cepas resistentes a oseltamivir a partir de muestras de pacientes con o sin criterios clínicos de gravedad. Sin embargo, el número de muestras estudiadas fue bajo. A pesar de esta limitación, un estudio previo en España, describió una muy baja proporción de cepas de la gripe pandémica resistentes a oseltamivir [177]. En España también se han detectado otras mutaciones en dicho virus. Antón et al. analizaron el gen de la hemaglutinina del virus influenza A (H1N1) 2009 en 189 muestras respiratorias, encontrando la mutación D225G en 3 casos de pacientes graves [178]. Sin embargo, en el mismo estudio se encontraron pacientes en cuyas muestras se encontró la mutación, pero que no tuvieron criterios clínicos de gravedad. El significado biológico de esta mutación aún permanece poco claro. Por otro lado, en el año 2011, Ledesma et al. informaron que la aparición de las sustituciones D222G y D222E en la hemaglutinina del virus de la gripe pandémica que circula en España podría estar relacionado con la presencia de enfermedad respiratoria severa [179]. La baja frecuencia de cepas resistentes a oseltamivir está en marcado contraste con la situación de los virus H1N1 estacionales durante el período 2007-2008, cuando una cepa H275Y apareció en Europa y que en los siguientes 12 meses se había extendido por todo el mundo [180, 181]. Una posible explicación es que, a diferencia de la mutante H275Y de la gripe estacional, la mutación de la resistencia a oseltamivir en el virus influenza A (H1N1) 2009 compromete la replicación vírica.

En nuestro estudio, encontramos que obtener un resultado fiable mediante la técnica de pirosecuenciación dependía de la carga vírica de la muestra. Esta técnica fue capaz de detectar muestras con una carga vírica moderada, con un valor de Ct menor a 24 para el gen de la proteína de la matriz en la mayoría de los casos. Resultados similares a los obtenidos en este estudio fueron descritos por Deng YM. et al. 2011 [182].

La detección de mutaciones conocidas y nuevas en los inicios del fallo del tratamiento, es importante ya que al conocerlas se podría maximizar el éxito de los primeros cambios terapéuticos en los pacientes. En este contexto, la pirosecuenciación permitiría la identificación de los pacientes que desarrollan resistencia temprana al tratamiento, lo que permitiría una intervención oportuna evitando el fracaso del tratamiento antivírico.

La pirosecuenciación es una técnica relativamente flexible, que puede ser fácilmente modificada ante la aparición de nuevos marcadores de resistencia o cuando se

produce una variación genética sustancial en la proteína diana del fármaco. Esta tecnología puede reducir considerablemente la carga de trabajo y el coste asociado a la determinación de resistencias. Sin embargo, requiere instrumentos especializados que limitan su uso, sobre todo en países en desarrollo. Otra limitación del ensayo es que sólo puede secuenciar fragmentos de hasta 50 bases, por lo que no es adecuado para la secuenciación del genoma completo.

5.4 Uso de una técnica molecular de detección de múltiples virus en la infección respiratoria en niños.

Como hemos comentado anteriormente, la detección rápida y sensible de los virus respiratorios en el laboratorio de microbiología clínica es esencial para el diagnóstico precoz y preciso de las infecciones respiratorias. Sin embargo, los métodos convencionales tienen varias limitaciones: el cultivo vírico es lento y escasamente coste-efectivo, y las técnicas de IF directa e IC, aunque son rápidas, tienen baja sensibilidad para la detección de la mayoría de los virus. Además, estos métodos tienen una gama limitada de detección y puede ser subjetiva, basándose en la experiencia técnica para la interpretación del efecto citopático en el cultivo celular [183]. Los ensayos moleculares, basados en la PCR, son rápidos y sensibles en comparación con métodos convencionales [129, 184]. Las estrategias de detección múltiple basados en la PCR son muy adecuadas para el diagnóstico de las infecciones respiratorias [129, 130], particularmente cuando se considera el hecho de que virus recientemente descubiertos han demostrado ser difíciles de detectar por los métodos tradicionales [129, 131].

La necesidad de evaluar un panel respiratorio para el diagnóstico de las infecciones del tracto respiratorio surge del hecho de que en estas infecciones es posible detectar la presencia de más de un virus [131-134], muchos de ellos correspondientes a virus emergentes que no están considerados en las técnicas utilizadas rutinariamente en el laboratorio. Sin embargo, el significado de estos hallazgos es aún objetivo de controversia. Es por esto, que para finalizar esta Tesis, se evaluó una nueva técnica de detección de múltiples virus respiratorios (Luminex xTAG RVP) en muestras de NPA proveniente de niños con infección respiratoria. En nuestro estudio, el nuevo ensayo fue comparado con las técnicas convencionales utilizadas en el laboratorio (IF, ICT y RT-PCR). Según nuestros resultados, de las 119 muestras de niños diagnosticados con infección respiratoria, 105 (88%) tuvieron un resultado positivo

para 1 o más virus y 14 (12%) tuvieron un resultado negativo utilizando el nuevo ensayo, mientras que con las técnicas convencionales se detectaron 97 (82%) muestras con 1 o más virus y 22 (18%) muestras fueron negativas.

En la Tabla 1 del Artículo 6 se resumen los resultados para cada virus estudiado por las técnicas convencionales y por Luminex. Debido a que ninguno de los dos es un verdadero *gold standard* para la detección de virus respiratorios, se calculó la sensibilidad y especificidad para las técnicas convencionales usando Luminex como *gold standard* y viceversa, así como la correlación entre ellas. El VRS e influenza B presentan una buena correlación (rango índice Kappa entre 0,61-0,8) entre las técnicas estudiadas. Adenovirus, influenza A y VPI3 presentan una correlación moderada (rango de índice Kappa entre 0,41-0,6). En el caso de influenza A, 5 de las 11 muestras positivas por las técnicas convencionales y negativas para Luminex se presentaron en coinfección con otro virus, lo que podría corresponder a una reacción cruzada de las técnicas de ICT o IF. Lo mismo puede ocurrir en el caso de adenovirus, donde 4 de las 7 muestras positivas sólo por técnicas convencionales se presentan en coinfección con otros virus.

Los picornavirus (enterovirus/rinovirus) se encuentran tanto en las muestras estudio como en las muestras control en un elevado porcentaje (46% y 65% respectivamente). La posibilidad de detección de estos virus en la población estudiada es un elemento de confusión. La interpretación de un resultado positivo para picornavirus es difícil debido al elevado porcentaje de prevalencia en niños asintomáticos en nuestra población (65%) (Artículo 6, tabla 4). Sin embargo, hay que tener en cuenta que RV es considerado cada vez con mayor frecuencia un agente etiológico frecuente en las infecciones respiratorias en niños [57, 153, 161]. En este sentido, este tipo de tecnología podría aportar al representar un avance en el diagnóstico de las infecciones por RV, que cada día parece más justificado por su incidencia y relación con procesos respiratorios de gravedad más o menos severos en niños y pacientes con EPOC [185].

Con la nueva técnica de detección múltiple se detectó un elevado número de muestras en coinfección con uno o más virus, que mediante las técnicas convencionales no son detectadas. El principal virus detectado en las coinfecciones fue picornavirus (Artículo 6, Tabla 3), Sin embargo, hay que considerar que picornavirus no forma parte de los virus respiratorios incluidos en las técnicas convencionales. Respecto a la elevada detección de coinfecciones con picornavirus, desconocemos aún el valor clínico de estos hallazgos. Marguet C. et al. estudiaron 209 niños menores de 1 año ingresados

por bronquiolitis, encontrando que la presencia dual de VRS y RV no aumentan la severidad de la enfermedad [134]. Además, en cuanto a las infecciones respiratorias múltiples en general, un reciente estudio desarrollado por Brand HK. et al. encontraron que la severidad de la bronquiolitis en niños menores de dos años no está asociada con la detección de múltiples virus. Según sus resultados, existen otros factores como la edad que contribuyen en un mayor grado a la gravedad de la enfermedad [162]. Por otro lado, Semple MG. et al. encontraron que la coinfección de VRS y HMPV en niños menores de 2 años se asocia con bronquiolitis severa [186]. Al igual que estos últimos estudios, nuestros análisis no encontraron diferencias significativas entre el número de virus detectado y la edad, sexo y gravedad (medida en días de hospitalización y días de oxigenoterapia) del paciente. Sin embargo, algunos estudios han encontrado que la detección de múltiples virus en niños está asociada a la presencia de fiebre alta, mayor frecuencia de uso de antibióticos y hospitalizaciones más largas [187, 188]. La inclusión de estrategias de diagnóstico basadas en la PCR multiplex podría ser de gran ayuda en la identificación de la verdadera relevancia de las infecciones víricas múltiples, así como las características y la gravedad asociados con esta condición.

El ensayo Luminex es una herramienta muy útil para el estudio, diagnóstico y manejo de las infecciones respiratorias víricas. La identificación simultánea de 19 virus implica una mejora en la rapidez del diagnóstico, algo clave para un correcto tratamiento y manejo del paciente. Esta nueva tecnología es sólida y reproducible, con múltiples posibilidades de aplicación en microbiología clínica.

La incorporación en forma paulatina de este tipo de técnicas moleculares en los laboratorios, posibilitará el diagnóstico oportuno y el control de infecciones, evitando la transmisión intrahospitalaria, principalmente en pacientes con factores de riesgo. El conocimiento de los mecanismos de transmisión y las interacciones entre virus y hospedador, permitirá a su vez un mejor manejo, con la posibilidad de acceder tanto a vacunas como a tratamientos específicos.

Por ahora, la principal limitación de este tipo de ensayo es que requiere una elevada tecnología y la necesidad de varias horas de trabajo en el laboratorio para generar los resultados. En la mayoría de los casos, las muestras no pueden ser tratadas individualmente y los resultados se dan generalmente un día después de la recepción de la muestra. Esto también significa que estas pruebas podrían no ser realizadas en condiciones de emergencia si el personal capacitado no está presente. Otra dificultad viene por la interpretación de los resultados. Mientras que los métodos convencionales

están limitados por la excesiva presencia de resultados negativos, los ensayos basados en PCR multiplex presentan una importante gama de resultados positivos, siendo una de las principales dificultades reconocer cuál es el agente causal de los trastornos clínicos y si la asociación entre ellos puede desempeñar un papel en la severidad de la enfermedad. Como se mencionó anteriormente, el papel de las coinfecciones víricas puede ser evaluado más fácilmente al disponer de estas nuevas herramientas de diagnóstico. Finalmente, en contraste con la PCR en tiempo real, esta técnica no es cuantitativa y la persistencia residual de genoma vírico en ausencia de una actividad replicativa puede ser fuente de una interpretación errónea.

A pesar de estas limitaciones, la aplicación rutinaria de esta nueva herramienta contribuiría a la re-evaluación de los datos clínicos de una lista de agentes patógenos de primera línea (ya sea bacterias o virus), contribuyendo a la construcción de nuevos algoritmos para el diagnóstico y el tratamiento de las infecciones respiratorias graves. Sin embargo, será necesario disminuir su coste, simplificación y automatización antes de que sustituyan a las técnicas actualmente empleadas. Desde el punto de vista coste-beneficio, esta nueva técnica sería de indudable valor en poblaciones de riesgo como son pacientes oncohematológico, inmunodeprimidos y ancianos. Además, podría ser interesante utilizar el panel para detectar posibles infecciones víricas en los procesos de reactivación de la EPOC. Por el momento, estas pruebas podrían ser más un complemento que un sustituto de las técnicas actualmente empleadas, que permitirían detectar agentes víricos implicados en infecciones graves, que han escapado a otras técnicas, sobre todo en población de riesgo. Este tipo de técnica permite ampliar las posibilidades diagnósticas para aquellos virus que, por sus características, no son detectables por otros métodos o son de difícil cultivo.

6. CONCLUSIONES

Diagnóstico de HMPV en niños con infección respiratoria aguda (Artículo 1)

1. Las nuevas técnicas de detección para HMPV tienen muy buena correlación entre ellas y son útiles para el diagnóstico de infección por HMPV en niños.
2. HMPV es una de las principales causas de infección de las vías respiratorias inferiores en niños pequeños.
3. La incorporación de la detección de HMPV en los laboratorios microbiológicos puede mejorar el diagnóstico etiológico de las infecciones respiratorias agudas en niños.

Estudio del papel de HBoV1 en niños con infección respiratoria (Artículo 2)

4. HBoV1 es encontrado en niños hospitalizados con infección respiratoria, siendo el segundo virus más frecuentemente detectado después del VRS.
5. HBoV1 se detectó más frecuentemente en niños enfermos que en niños sanos.
6. Una elevada carga vírica de HBoV1 no se correlacionó con la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, la presencia de HBoV sí se correlacionó con la presencia de infección respiratoria.
7. Las cepas de HBoV1 encontradas en nuestro estudio se agrupan en los dos genotipos encontrados hasta el momento, ST1 y ST2, al igual que las cepas circulantes en otros países de Europa y América.
8. A pesar de la elevada tasa de codetección con otros virus, nuestros resultados sugieren que HBoV1 podría jugar un papel como agente etiológico en las infecciones respiratorias en niños.

Utilidad de una técnica de detección rápida en el diagnóstico de influenza A (H1N1) 2009 (Artículo 3)

9. La técnica inmunocromatográfica evaluada es altamente sensible y precisa para la detección del nuevo virus influenza A (H1N1) 2009 en pacientes menores de 18 años de edad y durante la etapa aguda del brote.
10. El elevado valor predictivo positivo del ensayo indica que un resultado positivo durante el período pandémico no necesita ser confirmado por la técnica de referencia. Sin embargo, un resultado negativo no permite excluir la infección.
11. Una limitación de la técnica es que no es capaz de diferenciar entre influenza A estacional e influenza A (H1N1)2009.
12. Es una técnica simple y rápida. Esto puede ser trascendental para hospitales con limitaciones de tiempo y de recursos para cubrir los gastos de una rRT-PCR.

Validación de una nueva técnica de detección molecular (Speed-Oligo®) para influenza A (H1N1) 2009 (Artículo 4)

13. La sensibilidad y especificidad de la nueva técnica en comparación con la técnica de referencia desarrollada por los CDC fue de un 86.5% y 92.2% respectivamente.
14. En comparación con la técnica de detección de antígenos, el nuevo ensayo resultó ser más sensible y específico para la detección del nuevo virus.
15. La nueva técnica es simple, rápida y proporciona una buena sensibilidad para la detección del virus de la influenza A H1N1 (2009).
16. Esta técnica es una buena alternativa a la técnica desarrollada por los CDC para laboratorios que no estén equipados con instrumentos de PCR en tiempo real.

Estudio de la presencia de cepas de influenza A (H1N1) 2009 resistentes a oseltamivir (Artículo 5)

17. No encontramos cepas resistentes a oseltamivir en la población estudiada, independiente de si eran pacientes con o sin criterios clínicos de gravedad.
18. No es posible analizar mediante pirosecuenciación muestras con una carga vírica baja.
19. A pesar de no detectar resistencia a oseltamivir, es necesario continuar con la vigilancia de la resistencia a antiviricos debido a la posible emergencia de virus resistentes en la población.
20. La pirosecuenciación es una técnica molecular que permite estudiar la presencia o ausencia de mutaciones de forma sencilla y rápida.

Utilidad de una técnica molecular para la detección de múltiples virus en infección respiratorias en niños (Artículo 6)

21. La técnica molecular evaluada detectó un mayor número de muestras positivas que las técnicas convencionales.
22. Los picornavirus (enterovirus y RV) fueron los principales virus detectados por la nueva técnica tanto en niños enfermos (46%) como en niños sanos (65%).
23. El número de muestras con más de un virus detectado fue mayor con la técnica molecular de detección múltiple que con las técnicas convencionales.
24. No se encontraron diferencias significativas entre el número de virus detectados y la edad, sexo y gravedad (medida en días de hospitalización y oxigenoterapia) de los pacientes. Son necesarios más estudios para aclarar el papel de las infecciones múltiples en la infección respiratoria.
25. El ensayo evaluado es una herramienta sólida y reproducible, útil para el estudio, diagnóstico y manejo de las infecciones respiratorias víricas.

26. Desde el punto de vista coste-beneficio, esta nueva técnica sería de indudable utilidad en poblaciones de riesgo.

En resumen, las nuevas técnicas inmunológicas y moleculares evaluadas se han mostrado útiles para la detección de virus respiratorios emergentes. En general, los ensayos de PCR son más sensibles que los métodos de detección de antígenos. Por lo tanto, la prevalencia de los virus respiratorios que fueron analizados por ICT/IF podría ser mayor que la encontrada en nuestro estudio. Sin embargo, es necesario considerar que una de las principales limitaciones de las técnicas de detección de antígeno y moleculares es la detección de infecciones pasadas, lo que puede llevar a un falso diagnóstico. Por otra parte, la inclusión de estrategias de diagnóstico basadas en la PCR multiplex podría ser de gran ayuda en la identificación de la verdadera relevancia de las coinfecciones víricas. La incorporación en forma paulatina de este tipo de técnicas moleculares e inmunológicas en los laboratorios, en conjunto con los antecedentes clínicos del paciente, posibilitará el diagnóstico oportuno y rápido y un mejor control de infecciones, evitando la transmisión intrahospitalaria, principalmente en pacientes con factores de riesgo. Sin embargo, es necesario disminuir su coste y equipamiento para que puedan ser instauradas como técnicas de detección los laboratorios asistenciales. Las nuevas técnicas aquí estudiadas permitirían ampliar las posibilidades diagnósticas para aquellos virus que no son detectables por otros métodos o son de difícil cultivo. Incorporando la detección de virus emergentes en los laboratorios de microbiología, se puede mejorar el diagnóstico etiológico de las infecciones del tracto respiratorio en niños.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Mulholland K. Global burden of acute respiratory infections in children: Implications for interventions. *Pediatr Pulmonol.* 2003; 36: 469-474.
- 2 García-García ML, Ordoñas Gabin M, Calvo Reya C, et al. Viral infection of the lower respiratory tract in hospitalized infants: Etiology, clinical features and risk factors. *An Esp Pediatr.* 2001; 55: 101-107.
- 3 American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis. Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics.* 2006; 118: 1774-1793.
- 4 Díez Domingo J, Ridao López M, Ubeda Sansano I, Ballester Sanz A. Incidence and cost of hospitalizations for bronchiolitis and respiratory syncytial virus infections in the autonomous community of Valencia in Spain (2001 and 2002). *An Pediatr (Barc).* 2006; 65: 325-330.
- 5 Nokso-Koivisto J, Pitkaranta A, Blomqvist S, et al. Viral etiology of frequently recurring respiratory tract infections in children. *Clin Infect Dis.* 2002; 35: 540-546.
- 6 Fox JD. Respiratory virus surveillance and outbreak investigation. *J Clin Virol.* 2007; 40 Suppl 1: S24-30.
- 7 van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med.* 2001; 7: 719-724.
- 8 Renwick N, Schweiger B, Kapoor V, et al. A recently identified rhinovirus genotype is associated with severe respiratory-tract infection in children in Germany. *J Infect Dis.* 2007; 196: 1754-1760.
- 9 McErlean P, Shackelton LA, Lambert SB, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Characterisation of a newly identified human rhinovirus, HRV-QPM, discovered in infants with bronchiolitis. *J Clin Virol.* 2007; 39: 67-75.
- 10 Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, et al. Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10: 1095-1101.
- 11 Peiris JS, Lai ST, Poon LL, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet.* 2003; 361: 1319-1325.
- 12 Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1967-1976.
- 13 Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1953-1966.
- 14 Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 12891-12896.
- 15 Hamilton K. The emergence of the pandemic A/H1N1 2009 virus and its characteristics. *Bull Mem Acad R Med Belg.* 2009; 164: 260-263.
- 16 Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, Kuiken T, Osterhaus AD. Newer respiratory virus infections: Human metapneumovirus, avian influenza virus, and human coronaviruses. *Curr Opin Infect Dis.* 2005; 18: 141-146.
- 17 Marx A, Torok TJ, Holman RC, Clarke MJ, Anderson LJ. Pediatric hospitalizations for croup (laryngotracheobronchitis): Biennial increases associated with human parainfluenza virus 1 epidemics. *J Infect Dis.* 1997; 176: 1423-1427.
- 18 McConnochie KM. Bronchiolitis. What's in the name? *Am J Dis Child.* 1983; 137: 11-13.

- 19 Warner JO, Naspitz CK. Third international pediatric consensus statement on the management of childhood asthma. International pediatric asthma consensus group. *Pediatr Pulmonol.* 1998; 25: 1-17.
- 20 Vesa S, Kleemola M, Blomqvist S, Takala A, Kilpi T, Hovi T. Epidemiology of documented viral respiratory infections and acute otitis media in a cohort of children followed from two to twenty-four months of age. *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20: 574-581.
- 21 Allander T, Jartti T, Gupta S, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis.* 2007; 44: 904-910.
- 22 Juven T, Mertsola J, Waris M, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J.* 2000; 19: 293-298.
- 23 Korppi M. Non-specific host response markers in the differentiation between pneumococcal and viral pneumonia: What is the most accurate combination? *Pediatr Int.* 2004; 46: 545-550.
- 24 Khetsuriani N, Kazerouni NN, Erdman DD, et al. Prevalence of viral respiratory tract infections in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119: 314-321.
- 25 Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, et al. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *Bmj.* 1995; 310: 1225-1229.
- 26 Calvo C, García-García ML, Pozo F, Carvajal O, Pérez-Breña P, Casas I. Clinical characteristics of human bocavirus infections compared with other respiratory viruses in Spanish children. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27: 677-680.
- 27 Ruuskanen O, Ogra PL. Respiratory syncytial virus. *Curr Probl Pediatr.* 1993; 23: 50-79.
- 28 Kaplan NM, Dove W, Abd-Eldayem SA, Abu-Zeid AF, Shamoon HE, Hart CA. Molecular epidemiology and disease severity of respiratory syncytial virus in relation to other potential pathogens in children hospitalized with acute respiratory infection in Jordan. *J Med Virol.* 2008; 80: 168-174.
- 29 Simoes EA. Respiratory syncytial virus infection. *Lancet.* 1999; 354: 847-852.
- 30 Ukkonen P, Hovi T, von Bonsdorff CH, Saikku P, Penttinen K. Age-specific prevalence of complement-fixing antibodies to sixteen viral antigens: A computer analysis of 58,500 patients covering a period of eight years. *J Med Virol.* 1984; 13: 131-148.
- 31 Smyth RL, Openshaw PJ. Bronchiolitis. *Lancet.* 2006; 368: 312-322.
- 32 Andrade MA, Hoberman A, Glustein J, Paradise JL, Wald ER. Acute otitis media in children with bronchiolitis. *Pediatrics.* 1998; 101: 617-619.
- 33 Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet.* 1999; 354: 541-545.
- 34 Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 1501-1507.
- 35 Openshaw PJ, Dean GS, Culley FJ. Links between respiratory syncytial virus bronchiolitis and childhood asthma: Clinical and research approaches. *Pediatr Infect Dis J.* 2003; 22: S58-64; discussion S64-55.
- 36 Girard MP, Cherian T, Pervikov Y, Kieny MP. A review of vaccine research and development: Human acute respiratory infections. *Vaccine.* 2005; 23: 5708-5724.
- 37 Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1917-1928.
- 38 Laurichesse H, Dedman D, Watson JM, Zambon MC. Epidemiological features of parainfluenza virus infections: Laboratory surveillance in England and Wales, 1975-1997. *Eur J Epidemiol.* 1999; 15: 475-484.

- 39 Vachon ML, Dionne N, Leblanc E, Moisan D, Bergeron MG, Boivin G. Human parainfluenza type 4 infections, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12: 1755-1758.
- 40 Gardner SD. The isolation of parainfluenza 4 subtypes A and B in England and serological studies of their prevalence. *J Hyg (Lond)*. 1969; 67: 545-550.
- 41 Strauss J SE. Minus-strand rna viruses. 2nd edn. Oxford, UK, 2008.
- 42 Manning A, Russell V, Eastick K, et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis*. 2006; 194: 1283-1290.
- 43 Teo SS, Nguyen-Van-Tam JS, Booy R. Influenza burden of illness, diagnosis, treatment, and prevention: What is the evidence in children and where are the gaps? *Arch Dis Child*. 2005; 90: 532-536.
- 44 Cunney RJ, Bialachowski A, Thornley D, Smaill FM, Pennie RA. An outbreak of influenza a in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2000; 21: 449-454.
- 45 Munoz FM. Influenza virus infection in infancy and early childhood. *Paediatr Respir Rev*. 2003; 4: 99-104.
- 46 Neuzil KM, Wright PF, Mitchel EF, Jr., Griffin MR. The burden of influenza illness in children with asthma and other chronic medical conditions. *J Pediatr*. 2000; 137: 856-864.
- 47 O'Brien KL, Walters MI, Sellman J, et al. Severe pneumococcal pneumonia in previously healthy children: The role of preceding influenza infection. *Clin Infect Dis*. 2000; 30: 784-789.
- 48 Ramet J, Weil-Olivier C, Sedlak W. Influenza vaccination: The paediatric perspective. *Vaccine*. 2007; 25: 780-787.
- 49 Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953; 84: 570-573.
- 50 Munoz FM, Galasso GJ, Gwaltney JM, Jr., et al. Current research on influenza and other respiratory viruses: II international symposium. *Antiviral Res*. 2000; 46: 91-124.
- 51 Yun BY, Kim MR, Park JY, Choi EH, Lee HJ, Yun CK. Viral etiology and epidemiology of acute lower respiratory tract infections in Korean children. *Pediatr Infect Dis J*. 1995; 14: 1054-1059.
- 52 van der Hoek L, Sure K, Ihorst G, et al. Croup is associated with the novel coronavirus n163. *PLoS Med*. 2005; 2: e240.
- 53 Rotbart HA, Hayden FG. Picornavirus infections: A primer for the practitioner. *Arch Fam Med*. 2000; 9: 913-920.
- 54 Pitkaranta A, Hayden FG. Rhinoviruses: Important respiratory pathogens. *Ann Med*. 1998; 30: 529-537.
- 55 Gwaltney JM, Jr. Acute community-acquired sinusitis. *Clin Infect Dis*. 1996; 23: 1209-1223; quiz 1224-1205.
- 56 Winther B, Alper CM, Mandel EM, Doyle WJ, Hendley JO. Temporal relationships between colds, upper respiratory viruses detected by polymerase chain reaction, and otitis media in young children followed through a typical cold season. *Pediatrics*. 2007; 119: 1069-1075.
- 57 Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsolia M, et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165: 1285-1289.
- 58 Kotaniemi-Syrjanen A, Vainionpaa R, Reijonen TM, Waris M, Korhonen K, Korppi M. Rhinovirus-induced wheezing in infancy--the first sign of childhood asthma? *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111: 66-71.
- 59 Calvo C, García-García ML, Blanco C, Pozo F, Flecha IC, Pérez-Breña P. Role of rhinovirus in hospitalized infants with respiratory tract infections in Spain. *Pediatr Infect Dis J*. 2007; 26: 904-908.

- 60 Boivin G, Abed Y, Pelletier G, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: A new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis.* 2002; 186: 1330-1334.
- 61 Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med.* 2004; 350: 443-450.
- 62 Williams JV, Wang CK, Yang CF, et al. The role of human metapneumovirus in upper respiratory tract infections in children: A 20-year experience. *J Infect Dis.* 2006; 193: 387-395.
- 63 Rohde G, Borg I, Arinir U, et al. Relevance of human metapneumovirus in exacerbations of copd. *Respir Res.* 2005; 6: 150.
- 64 Beneri C, Ginocchio CC, Manji R, Sood S. Comparison of clinical features of pediatric respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infections. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009; 30: 1240-1241.
- 65 Cubas C RJ, Ronco R, Muñoz G, Valenzuela A, Torres R et al. Insuficiencia respiratoria grave asociada a infección por metapneumovirus en lactantes. *Revista Chilena de Pediatría.* 2007; 78: 165-168.
- 66 Rawlinson WD, Waliuzzaman Z, Carter IW, Belessis YC, Gilbert KM, Morton JR. Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection. *J Infect Dis.* 2003; 187: 1314-1318.
- 67 García-García ML, Calvo C, Casas I, et al. Human metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5. *Pediatr Pulmonol.* 2007; 42: 458-464.
- 68 Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog.* 2009; 5: e1000391.
- 69 Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis.* 2009; 199: 196-200.
- 70 Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis.* 2010; 201: 1633-1643.
- 71 Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, et al. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. *Clin Infect Dis.* 2006; 43: 585-592.
- 72 Han TH, Chung JY, Hwang ES. Human bocavirus 2 in children, South Korea. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15: 1698-1700.
- 73 Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, Arden KE, Nissen MD, Mackay IM. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol.* 2006; 35: 99-102.
- 74 Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 848-850.
- 75 Foulongne V, Olejnik Y, Perez V, Elaerts S, Rodiere M, Segondy M. Human bocavirus in French children. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 1251-1253.
- 76 Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, et al. Human bocavirus infection in young children in the united states: Molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis.* 2006; 194: 1276-1282.
- 77 Carmichael LE, Schlafer DH, Hashimoto A. Minute virus of canines (mvc, canine parvovirus type-1): Pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J Vet Diagn Invest.* 1994; 6: 165-174.
- 78 Weissbrich B, Neske F, Schubert J, et al. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Dis.* 2006; 6: 109.

- 79 Martin ET, Fairchok MP, Kuypers J, et al. Frequent and prolonged shedding of bocavirus in young children attending daycare. *J Infect Dis.* 2010; 201: 1625-1632.
- 80 von Linstow ML, Hogh M, Hogh B. Clinical and epidemiologic characteristics of human bocavirus in Danish infants: Results from a prospective birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27: 897-902.
- 81 Schildgen O, Muller A, Allander T, et al. Human bocavirus: Passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21: 291-304, table of contents.
- 82 Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. Human bocavirus: Prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin Infect Dis.* 2006; 43: 283-288.
- 83 Chung JY, Han TH, Kim CK, Kim SW. Bocavirus infection in hospitalized children, South Korea. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 1254-1256.
- 84 Catalano-Pons C, Giraud C, Rozenberg F, Meritet JF, Lebon P, Gendrel D. Detection of human bocavirus in children with kawasaki disease. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13: 1220-1222.
- 85 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: Novel influenza A (H1N1) virus infections - worldwide, May 6, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58: 453-458.
- 86 Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, et al. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med.* 2009; 360: 2616-2625.
- 87 Nelson M, Spiro D, Wentworth D, et al. The early diversification of influenza A/H1N1pdm. *PLoS Curr.* 2009; 1: RRN1126.
- 88 Deyde VM, Xu X, Bright RA, et al. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis.* 2007; 196: 249-257.
- 89 Ferraris O, Lina B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J Clin Virol.* 2008; 41: 13-19.
- 90 Abed Y, Baz M, Boivin G. A novel neuraminidase deletion mutation conferring resistance to oseltamivir in clinical influenza A/H3N2 virus. *J Infect Dis.* 2009; 199: 180-183.
- 91 Wang MZ, Tai CY, Mendel DB. Mechanism by which mutations at his274 alter sensitivity of influenza A virus N1 neuraminidase to oseltamivir carboxylate and zanamivir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 3809-3816.
- 92 Garten RJ, Davis CT, Russell CA, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science.* 2009; 325: 197-201.
- 93 Gubareva LV, Trujillo AA, Okomo-Adhiambo M, et al. Comprehensive assessment of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus drug susceptibility in vitro. *Antivir Ther.* 2010; 15: 1151-1159.
- 94 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Swine-origin influenza A (H1N1) virus infections in a school - New York city, April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58: 470-472.
- 95 Jain S, Kamimoto L, Bramley AM, et al. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. *N Engl J Med.* 2009; 361: 1935-1944.
- 96 Dominguez-Cherit G, Lapinsky SE, Macias AE, et al. Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. *Jama.* 2009; 302: 1880-1887.
- 97 Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: Implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis.* 2008; 198: 962-970.
- 98 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) -

- United States, May-August 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58: 1071-1074.
- 99 Chien YW, Klugman KP, Morens DM. Bacterial pathogens and death during the 1918 influenza pandemic. *N Engl J Med.* 2009; 361: 2582-2583.
- 100 Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, Schildgen O, van der Hoek L. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. *J Virol.* 2009; 83: 7739-7748.
- 101 Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, Carroll KC. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 79-82.
- 102 Weinberg A, Brewster L, Clark J, Simoes E. Evaluation of r-mix shell vials for the diagnosis of viral respiratory tract infections. *J Clin Virol.* 2004; 30: 100-105.
- 103 Rovida F, Percivalle E, Zavattoni M, et al. Monoclonal antibodies versus reverse transcription-pcr for detection of respiratory viruses in a patient population with respiratory tract infections admitted to hospital. *J Med Virol.* 2005; 75: 336-347.
- 104 Hindiyyeh M, Goulding C, Morgan H, et al. Evaluation of Biostar Flu OIA assay for rapid detection of influenza A and B viruses in respiratory specimens. *J Clin Virol.* 2000; 17: 119-126.
- 105 Weinberg A, Walker ML. Evaluation of three immunoassay kits for rapid detection of influenza virus A and B. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12: 367-370.
- 106 Smit M, Beynon KA, Murdoch DR, Jennings LC. Comparison of the NOW Influenza A & B, NOW Flu A, NOW Flu B, and Directigen Flu A+B assays, and immunofluorescence with viral culture for the detection of influenza A and B viruses. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 57: 67-70.
- 107 Zheng X, Quianzon S, Mu Y, Katz BZ. Comparison of two new rapid antigen detection assays for respiratory syncytial virus with another assay and shell vial culture. *J Clin Virol.* 2004; 31: 130-133.
- 108 Tsutsumi H, Ouchi K, Ohsaki M, et al. Immunochromatography test for rapid diagnosis of adenovirus respiratory tract infections: Comparison with virus isolation in tissue culture. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 2007-2009.
- 109 Fujimoto T, Okafuji T, Okafuji T, et al. Evaluation of a bedside immunochromatographic test for detection of adenovirus in respiratory samples, by comparison to virus isolation, PCR, and real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 5489-5492.
- 110 Kikuta H, Ebihara T, Endo R, et al. Development of a rapid chromatographic immunoassay for detection of human metapneumovirus using monoclonal antibodies against nucleoprotein of hMPV. *Hybridoma (Larchmt).* 2007; 26: 17-21.
- 111 Kikuta H, Sakata C, Gamo R, et al. Comparison of a lateral-flow immunochromatography assay with real-time reverse transcription-pcr for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 928-932.
- 112 Brittain-Long R, Nord S, Olofsson S, Westin J, Anderson LM, Lindh M. Multiplex real-time pcr for detection of respiratory tract infections. *J Clin Virol.* 2008; 41: 53-56.
- 113 Sanghavi SK, Bullotta A, Husain S, Rinaldo CR. Clinical evaluation of multiplex real-time PCR panels for rapid detection of respiratory viral infections. *J Med Virol.* 2012; 84: 162-169.
- 114 van de Pol AC, Wolfs TF, van Loon AM, et al. Molecular quantification of respiratory syncytial virus in respiratory samples: Reliable detection during the initial phase of infection. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 3569-3574.
- 115 Gadsby NJ, Hardie A, Claas EC, Templeton KE. Comparison of the Luminex Respiratory Virus Panel fast assay with in-house real-time PCR for respiratory viral infection diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 2213-2216.

- 116 Kehl SC, Henrickson KJ, Hua W, Fan J. Evaluation of the hexaplex assay for detection of respiratory viruses in children. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1696-1701.
- 117 Sánchez-Yebra W, Ávila-Carrillo JA, Giménez-Sánchez F, et al. Viral agents causing lower respiratory tract infections in hospitalized children: Evaluation of the Speed-Oligo® RSV assay for the detection of respiratory syncytial virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31: 243-250.
- 118 Quezel-Guerraz NM, Arriaza MM, Avila JA, Sánchez-Yebra Romera WE, Martínez-Lirola MJ. Evaluation of the Speed-Oligo® Mycobacteria assay for identification of *Mycobacterium spp.* From fresh liquid and solid cultures of human clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 68: 123-131.
- 119 Renois F, Talmud D, Huguenin A, et al. 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.* 2010; 48: 3836-3842.
- 120 Raymond F, Carboneau J, Boucher N, et al. Comparison of automated microarray detection with real-time PCR assays for detection of respiratory viruses in specimens obtained from children. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 743-750.
- 121 Babady NE, Mead P, Stiles J, et al. Comparison of the Luminex xTAG RVP FAST and the Idaho Technology FilmArray RP Assays for the detection of respiratory viruses in pediatric patients at a cancer hospital. *J Clin Microbiol.* 2012. *In press.*
- 122 Jokela P, Piiparinen H, Mannonen L, Auvinen E, Lappalainen M. Performance of the Luminex Xtag Respiratory Viral Panel Fast in a clinical laboratory setting. *J Virol Methods.* 2012; 182: 82-86.
- 123 Sáez-Llorens X, Moreno MT, Ramilo O, Sánchez PJ, Top FH, Jr., Connor EM. Safety and pharmacokinetics of palivizumab therapy in children hospitalized with respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2004; 23: 707-712.
- 124 Boeckh M, Berrey MM, Bowden RA, Crawford SW, Balsley J, Corey L. Phase 1 evaluation of the respiratory syncytial virus-specific monoclonal antibody palivizumab in recipients of hematopoietic stem cell transplants. *J Infect Dis.* 2001; 184: 350-354.
- 125 Scarfone RJ. Controversies in the treatment of bronchiolitis. *Curr Opin Pediatr.* 2005; 17: 62-66.
- 126 Panitch HB. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: Supportive care and therapies designed to overcome airway obstruction. *Pediatr Infect Dis J.* 2003; 22: S83-87; discussion S87-88.
- 127 Pérez-Ruiz M, Navarro-Mari JM, Bautista-Marin MF, et al. Development and preliminary evaluation of a rapid oligochromatographic assay for specific detection of new human influenza A H1N1 virus. *J Clin Microbiol.* 48: 1801-1805.
- 128 Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem.* 1996; 242: 84-89.
- 129 Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21: 716-747.
- 130 Kehl SC, Kumar S. Utilization of nucleic acid amplification assays for the detection of respiratory viruses. *Clin Lab Med.* 2009; 29: 661-671.
- 131 Leven M. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections. *J Clin Virol.* 2007; 40: 259-276.
- 132 García-García ML, Calvo C, Pozo F, Villadangos PA, Pérez-Breña P, Casas I. Spectrum of respiratory viruses in children with community acquired pneumonia. *Pediatr Infect Dis J.* 2012. *In press.*

- 133 Huguenin A, Moutte L, Renois F, et al. Broad respiratory virus detection in infants hospitalized for bronchiolitis by use of a multiplex RT-PCR DNA microarray system. *J Med Virol.* 84: 979-985.
- 134 Marguet C, Lubrano M, Gueudin M, et al. In very young infants severity of acute bronchiolitis depends on carried viruses. *PLoS One.* 2009; 4: e4596.
- 135 Monto AS. Epidemiology of viral respiratory infections. *Am J Med.* 2002; 112 Suppl 6A: 4S-12S.
- 136 Deffrasnes C, Cote S, Boivin G. Analysis of replication kinetics of the human metapneumovirus in different cell lines by real-time pcr. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 488-490.
- 137 Stockton J, Stephenson I, Fleming D, Zambon M. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 897-901.
- 138 Boivin G, De Serres G, Cote S, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 634-640.
- 139 Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United States: Clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics.* 2003; 111: 1407-1410.
- 140 Falsey AR, Formica MA, Treanor JJ, Walsh EE. Comparison of quantitative reverse transcription-PCR to viral culture for assessment of respiratory syncytial virus shedding. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4160-4165.
- 141 Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 372-375.
- 142 Ginocchio CC, Manji R, Lotlikar M, Zhang F. Clinical evaluation of NucliSENS Magnetic Extraction and NucliSENS analyte-specific reagents for real-time detection of human metapneumovirus in pediatric respiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 1274-1280.
- 143 García-García ML, Calvo C, Pérez-Breña P, De Cea JM, Acosta B, Casas I. Prevalence and clinical characteristics of human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain. *Pediatr Pulmonol.* 2006; 41: 863-871.
- 144 Foulongne V, Guyon G, Rodiere M, Segondy M. Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25: 354-359.
- 145 Deffrasnes C, Hamelin ME, Boivin G. Human metapneumovirus. *Semin Respir Crit Care Med.* 2007; 28: 213-221.
- 146 do Carmo Debur M, Bordignon J, Duarte dos Santos CN, et al. Acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in southern Brazil. *J Clin Virol.* 2007; 39: 59-62.
- 147 Al Hajjar S, Al Thawadi S, Al Seraihi A, Al Muhsen S, Imambaccus H. Human metapneumovirus and human coronavirus infection and pathogenicity in Saudi children hospitalized with acute respiratory illness. *Ann Saudi Med.* 2011; 31: 523-527.
- 148 Camps M, Ricart S, Dimova V, et al. Prevalence of human metapneumovirus among hospitalized children younger than 1 year in Catalonia, Spain. *J Med Virol.* 2008; 80: 1452-1460.
- 149 Kukavica-Ibrulj I, Boivin G. Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal aspirates using an enzyme immunoassay. *J Clin Virol.* 2009; 44: 88-90.
- 150 Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weigl J, Falcone V. Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 147-150.
- 151 Falsey AR, Criddle MC, Walsh EE. Detection of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus by reverse transcription polymerase chain reaction in adults with and without respiratory illness. *J Clin Virol.* 2006; 35: 46-50.

- 152 Piralla A, Lilleri D, Sarasini A, et al. Human rhinovirus and human respiratory enterovirus (EV68 and EV104) infections in hospitalized patients in Italy, 2008-2009. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012; 73: 162-167.
- 153 Takeyama A, Hashimoto K, Sato M, et al. Rhinovirus load and disease severity in children with lower respiratory tract infections. *J Med Virol*. 2012; 84:1135-42.
- 154 Smuts H, Hardie D. Human bocavirus in hospitalized children, South Africa. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12: 1457-1458.
- 155 Villa L, Melón S, Suárez S, et al. Detection of human bocavirus in Asturias, Northern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008; 27: 237-239.
- 156 García-García ML, Calvo Rey C, Pozo Sánchez F, et al. Human bocavirus infections in Spanish 0-14 year-old: Clinical and epidemiological characteristics of an emerging respiratory virus. *An Pediatr (Barc)*. 2007; 67: 212-219.
- 157 Pozo F, García-García ML, Calvo C, Cuesta I, Pérez-Breña P, Casas I. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol*. 2007; 40: 224-228.
- 158 García-García ML, Calvo C, Falcon A, et al. Role of emerging respiratory viruses in children with severe acute wheezing. *Pediatr Pulmonol*. 2010 ; 45: 585-591.
- 159 Martin ET, Fairchok MP, Kuypers J, et al. Frequent and prolonged shedding of bocavirus in young children attending daycare. *J Infect Dis*. 2010: 1625-1632.
- 160 Blessing K, Neske F, Herre U, Kreth HW, Weissbrich B. Prolonged detection of human bocavirus DNA in nasopharyngeal aspirates of children with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2009; 28: 1018-1019.
- 161 Calvo Rey C, García-García ML, Casas Flecha I, et al. Role of rhinovirus in respiratory tract infections in hospitalized children. *An Pediatr (Barc)*. 2006; 65: 205-210.
- 162 Brand HK, de Groot R, Galama JM, et al. Infection with multiple viruses is not associated with increased disease severity in children with bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol*. 2012; 47: 393-400.
- 163 Neske F, Blessing K, Tollmann F, et al. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 2116-2122.
- 164 Qu XW, Duan ZJ, Qi ZY, et al. Human bocavirus infection, people's Republic of China. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13: 165-168.
- 165 Flores CJ, Vizcaya AC, Araos BR, et al. Human bocavirus in Chile: Clinical characteristics and epidemiological profile in children with acute respiratory tract infections. *Rev Chilena Infectol*. 2012; 28: 504-511.
- 166 Kantola K, Hedman L, Allander T, et al. Serodiagnosis of human bocavirus infection. *Clin Infect Dis*. 2008; 46: 540-546.
- 167 Dawood FS, Jain S, Finelli L, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*. 2009; 360: 2605-2615.
- 168 Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J Infect Dis*. 2006; 194 Suppl 2: S98-110.
- 169 Tavakoli M, Aziminejad A, Patel RV, Moallem M. Methods and mechanisms for contact feedback in a robot-assisted minimally invasive environment. *Surg Endosc*. 2006; 20: 1570-1579.
- 170 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) virus - United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009; 58: 826-829.
- 171 Drexler JF, Helmer A, Kirberg H, et al. Poor clinical sensitivity of rapid antigen test for influenza a pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15: 1662-1664.
- 172 Vasoo S, Stevens J, Singh K. Rapid antigen tests for diagnosis of pandemic (swine) influenza A/H1H1. *Clin Infect Dis*. 2009; 49: 1090-1093.

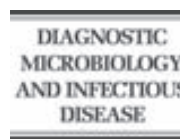
- 173 Kiatpathomchai W, Jaroenram W, Arunrut N, Jitrapakdee S, Flegel TW. Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J Virol Methods*. 2008; 153: 214-217.
- 174 Mugasa CM, Laurent T, Schoone GJ, Kager PA, Lubega GW, Schallig HD. Nucleic acid sequence-based amplification with oligochromatography for detection of *Trypanosoma brucei* in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 630-635.
- 175 Ducatez MF, Sonnberg S, Hall RJ, et al. Genotyping assay for the identification of 2009-2010 pandemic and seasonal H1N1 influenza virus reassortants. *J Virol Methods*. 2010; 168: 78-81.
- 176 Mak PW, Wong CK, Li OT, et al. Rapid genotyping of swine influenza viruses. *Emerg Infect Dis*. 2011 ;17: 691-694.
- 177 Ledesma J, Vicente D, Pozo F, et al. Oseltamivir-resistant pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses in Spain. *J Clin Virol*. 2011; 51: 205-208.
- 178 Anton A, Marcos MA, Martínez MJ, et al. D225G mutation in the hemagglutinin protein found in 3 severe cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 67: 207-208.
- 179 Ledesma J, Pozo F, Ruiz MP, et al. Substitutions in position 222 of haemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses in Spain. *J Clin Virol*. 2011 ; 51: 75-78.
- 180 Hurt AC, Ernest J, Deng YM, et al. Emergence and spread of oseltamivir-resistant A (H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. *Antiviral Res*. 2009; 83: 90-93.
- 181 Lackenby A, Hungnes O, Dudman SG, et al. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill*. 2008; 13.
- 182 Deng YM, Caldwell N, Hurt A, et al. A comparison of pyrosequencing and neuraminidase inhibition assays for the detection of oseltamivir-resistant pandemic influenza A(H1N1) 2009 viruses. *Antiviral Res*. 2011; 90: 87-91.
- 183 Ginocchio CC. Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods. *J Clin Virol*. 2007; 40 Suppl 1: S11-14.
- 184 Mahony JB. Nucleic acid amplification-based diagnosis of respiratory virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 20120; 8: 1273-1292.
- 185 Artiles-Campelo F, Pérez-González M del C, Caballero-Hidalgo A, Pena-López MJ. Etiology of acute viral respiratory tract infections in children from Gran Canaria, The Canary Islands (Spain). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006; 24: 556-561.
- 186 Semple MG, Cowell A, Dove W, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2005; 191: 382-386.
- 187 Calvo C, García-García ML, Blanco C, et al. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. *J Clin Virol*. 2008; 42: 268-272.
- 188 Midulla F, Scagnolari C, Bonci E, et al. Respiratory syncytial virus, human bocavirus and rhinovirus bronchiolitis in infants. *Arch Dis Child*. 2010; 95: 35-41.

ANEXO

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 71 (2011) 463–466

www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Comparison of 2 molecular assays and a serologic test in diagnosing *Mycoplasma pneumoniae* infection in paediatrics patients^{☆,☆☆}

Blanco Silvia^{a,b,*}, Fuenzalida Loreto^{a,1}, Bas Albert^a, Prat Cristina^{a,b}, Ramírez Aida^a, Matas Lurdes^{a,d}, Rodrigo Carlos^c, Ausina Vicente^{a,b}

^aServei de Microbiologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^bCIBER de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^cServei de Pediatria, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia i Medicina Preventiva, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^dCIBER de Epidemiologia y Salud Pública, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Received 2 May 2011; accepted 27 August 2011

Abstract

Two commercial polymerase chain reaction (PCR) assays (a real-time PCR [Cepheid] and an oligochromatographic test [Speed-oligo]) and 1 serology test (Serodia-Myco II) for detecting *Mycoplasma pneumoniae* in nasopharyngeal aspirates and serum samples were studied. Among the 145 samples, 32 serum pairs were serologically positive for *M. pneumoniae*. Of these, in 30 nasopharyngeal aspirates, *M. pneumoniae* was detected using the real-time PCR assay and 25 using Speed-oligo, corresponding to a sensitivity of 93.7% and 78.1%, respectively. Among the 94 samples with negative serology, we only obtained 1 positive result by real-time PCR assay. In the group of samples from healthy children, no positive results were obtained.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *M. pneumoniae*; Serology; PCR

Mycoplasma pneumoniae is a pathogen that is a causative agent of respiratory tract infections acquired from the community in children and young adults. The usual primary clinical presentation is tracheobronchitis with fever and nonproductive cough associated with a variety of upper respiratory tract manifestations. This infection can progress to bronchitis, especially in young children, and pneumonia in 15–20% of cases (Atkinson et al., 2008) and, rarely, is accompanied or followed by significant extrapulmonary, neurologic, and heart manifestations (Waites and Talkington, 2004).

Conventional tests for detecting *M. pneumoniae* are fraught with limitations (Daxboeck et al., 2003). *M. pneumoniae* culture can often take several weeks, requires special media, and has low sensitivity (60%) (She et al., 2010). Similarly, serologic assays such as complement fixation and commercially available immunoglobulin detection kits are retrospective, requiring paired serum samples from acute or convalescent phase, although sometimes the first sample allows presumptive diagnosis (Templeton et al., 2003). The current rapid tests (enzyme immunoassay) still present a low sensitivity and predictive value with respect to polymerase chain reaction (PCR) (Beersma et al., 2005).

The techniques of nucleic acid amplification as well as DNA probes and especially PCR (combined with subsequent hybridization or reamplification of the PCR product) have an important diagnostic superiority compared to culture or serology and are validated for respiratory tract samples (Loens et al., 2003). Specificity and sensitivity for P1 PCR amplification were excellent; no hybridization was observed

[☆] L. Fuenzalida is funded by a Presidente de la República de Chile (CONICYT) scholarship from the Chilean State.

^{☆☆} The authors report no conflicts of interest.

* Corresponding author. Tel.: +34-93-497-88-94; fax: +34-93-497-88-95. E-mail address: sblanc1976@gmail.com (B. Silvia).

¹ Loreto Fuenzalida and Silvia Blanco contributed equally to this study.

with *M. genitalium* and other human *Mycoplasma* species (Williamson et al., 1992). The specific attachment of *M. pneumoniae* to the respiratory ciliated epithelium is mediated by a surface protein P1.

From June 2008 to December 2009, a total of 145 nasopharyngeal aspirate specimens were collected. We included paediatric patients with respiratory infection who presented at the emergency department and healthy children.

Nasopharyngeal aspirate samples from 3 groups of patients were studied: group 1 consisted of 32 samples from patients with pneumonia by *M. pneumoniae* (13 men and 19 women). The median age was 6 years (range, 1 to 18 years). Group 2 included 94 samples from patients with viral infection or pneumonia of unknown etiology (3 adenovirus, 6 seasonal influenza A virus, 1 parainfluenza 2 virus, 24 respiratory syncytial virus, and 58 with negative results for respiratory virus detection by immunofluorescence and/or immunochromatographic assays) (55 men and 39 women). The median age was 4.2 years (range, 4 months to 18 years). Group 3 consisted of 19 samples from healthy children collected during a scheduled visit for other reasons, but without respiratory disturbances in the previous 10 days. Samples were stored at -20°C .

Nasopharyngeal aspirates and the first serum samples were obtained on admission, and convalescent serum samples were obtained 4–6 weeks later from all patients. Serum samples were tested on reception. Aliquots of each sample were stored at -20°C . Clinical and epidemiological data of patients were recorded.

Informed consent was obtained from the patients' parents. The ethical committee of Hospital Universitari Germans Trias i Pujol approved the study protocol.

Serum samples were tested against *M. pneumoniae* using a commercial particle agglutination test kit (Serodia-Myco II test, Fujirebio, Tokyo, Japan), which was used according to the manufacturer's instructions. This is a semiquantitative agglutination assay using gelatin particles sensitized with a crude antigen suspension of *M. pneumoniae* (Mac strain). With the use of the serum diluent supplied, serum samples were diluted serially, giving final dilutions of 1:40 to 1:20,480. After 3 h of incubation at room temperature, buttons or compact smooth rings of particles at the bottom of the wells were read as negative agglutination patterns and a more extensive ring as positive (Yoo et al., 2007).

For the detection of *M. pneumoniae* by PCR, aliquots (250 μL) of each specimen were extracted using a QIAmp DNA Mini kit (Qiagen CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The extracted DNA was eluted in 50 μL of elution buffer and immediately used in the amplification reaction.

The real-time PCR was performed with the SmartCycler II instrument (Cepheid, Sunnyvale, USA) and the respective reagent manufacturer's recommended cycling parameters. A segment of the P1 adhesion gene was amplified by real-time PCR (Mpn Primer and Probe Set, Cepheid). Vials containing lyophilized master mix and primers were reconstituted with 40 μL of water according to the manufacturer's

instructions; 20- μL aliquots were distributed into empty SmartCycler reaction tubes where we added 5 μL of extracted nucleic acid.

The Speed-oligo *M. pneumoniae* test (Vircell, Granada, Spain) is a PCR-based method coupled to a dipstick device that enables a rapid detection of *M. pneumoniae* in clinical samples. The PCR mix (supplied in lyophilized format) contains PCR reagents and a specific oligonucleotide pair for the amplification of a fragment in the P1 gene. The dipstick device carries 2 specific probe pairs for the detection of *M. pneumoniae* and internal control PCR products. Each probe pair consists of 1 probe conjugated with colloidal gold (gold probe) and another probe immobilized onto nitrocellulose membrane (nitrocellulose probe). The procedure of the assay was as follows: DNAs were subjected to PCR in a SpeedCycler instrument (Analytik Jena, Jena, Germany). After the amplification, the PCR products were detected by means of the dipstick according to the kit instructions. Briefly, denatured PCR product is placed in contact with the dipstick and the PCR product flows into the strip to react, in a first instance, with the gold probe. The PCR product–gold probe complex reaches the line with the nitrocellulose probe and a second hybridization takes place. This line reacts with the excess of colloidal gold. The final reading was visually accomplished after 5 min of incubation. Reactivity was confirmed by visualization of a red line.

A definitive diagnosis of *M. pneumoniae* infection was based on a demonstration of seroconversion, defined as a change from a negative acute serum sample to a positive convalescent serum sample or a fourfold rise in antibody titres between the paired sera. A presumptive diagnosis of acute *M. pneumoniae* infection was made in patients from whom only the acute-phase serum was available and was based on the presence of agglutination titre 160 (Matas et al., 1998).

The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were calculated using standard formulas. The calculations were performed with VassarStats tools (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.htm>), and 95% confidence intervals were calculated for each value. Student's *t* test was performed with the STATA 9.0 program (Stata, College Station, TX, USA), and a *P* value of <0.05 was considered to be statistically significant.

One hundred and forty-five patients (70 men and 75 women) were studied by both PCR techniques and serology. The median age was 3.2 years (range, 5 months to 18 years).

Among the 126 samples (groups 1 and 2), 32 were serologically positive for *M. pneumoniae*. Of these, 30 were detected using the real-time PCR assay and 25 using Speed-oligo, corresponding to a sensitivity of 93.7% and 78.1%, respectively. The results are presented in Table 1. In the samples from the healthy children (group 3), no positive results were obtained.

Among the 94 samples with negative serology, we only obtained 1 positive result by real-time PCR assay. We had considered this result like a false positive.

The agreement between serology and real-time PCR was $k = 0.936$ and that between serology and Speed-oligo was

Table 1
Sensitivity, specificity, PPV, and NPV of both molecular techniques compared with serology

| PCR Assay | No. of positive specimens | Sensitivity (%) | 95% CI | Specificity (%) | 95% CI | PPV | 95% CI | NPV | 95% CI |
|-------------|---------------------------|-----------------|--------|-----------------|--------|------|--------|------|--------|
| Cepheid kit | Group 1 30/32 | 93.7 | 77–98 | 98.9 | 93–99 | 96.7 | 81–99 | 97.8 | 91–99 |
| | Group 2 1/94 | | | | | | | | |
| | Group 3 0/19 | | | | | | | | |
| Speed-oligo | Group 1 25/32 | 78.1 | 59–90 | 100 | 95–100 | 100 | 83–100 | 93 | 86–97 |
| | Group 2 0/94 | | | | | | | | |
| | Group 3 0/19 | | | | | | | | |

PPV = Positive predictive value; NPV = negative predictive value; CI = confidence interval.

0.842. This agreement value means there was a high correlation between serology and PCR methods.

When we compared the cycle threshold (C_t) values of both PCR assays, samples with positive results by both PCR assays had an average C_t of 27.5 (SD = 4.12), which was significantly (Student's $t < 0.001$) lower than the average C_t of the group with discordant results (mean = 37.5, SD = 2.48). The samples with negative Speed-oligo result had a higher C_t by real-time PCR.

During the early stages of illness, PCR was slightly superior to serology in indicating infection by *M. pneumoniae*. Twenty-six (81%) of the *M. pneumoniae* cases had a diagnostic antibody reaction in their acute phase serum obtained during the first week of illness (Ig ≥ 160). Some authors reported that the use of PCR was superior to serology for diagnosing acute *M. pneumoniae* infections (Beersma et al., 2005; Kim et al., 2007; Nadala et al., 2001; Nilsson et al., 2008). During this period, a serologic response could be detected only in 23–56% of the cases, whereas PCR detected 96–100%. Even though, in our study, there was a titer of $< 1/160$ (IgG and IgM) in the acute phase sample in 5 cases (3 samples 1/40 and 2 samples 1/80) and a positive PCR result. The association of the detected mycoplasmas in a found infection suggests that PCR testing should be considered for diagnosis of *M. pneumoniae* infection during the early stages of illness.

We did not find any significant differences between group 1 and group 2. In group 2, we included patients with pneumonia and lower respiratory tract infection from different viruses (adenovirus, seasonal influenza A virus, parainfluenza 2 virus, respiratory syncytial virus) of unknown aetiology. In the entire group, we only had 1 PCR positive result; all serologic test results and the rest of the PCR results were negative. Therefore, our techniques do not have nonspecific reactions with other microorganisms or viruses.

Other studies show that timely collection of nasopharyngeal sample is critical for successful nucleic acid detection (Thurman et al., 2009). All our samples were collected at admission in the emergency department during acute phase, so, theoretically, the conditions were optimal. Also, the obtained sample (nasopharyngeal aspirate) is the recommended one (Xu et al., 2010).

The present results suggest that real-time PCR is suitable for rapid diagnosis as a first screening test. Both PCR

methods used for the detection of PCR amplicons avoid requirements normally associated with classical agarose gel methods or specific real-time PCR thermocycler. Furthermore, both PCR methods are fast; real-time PCR needs about 1 h to complete and Speed-oligo PCR is completed within 55 min and detection requires no more than 5 min. The Speed-oligo assay might be an alternative to real-time PCR assays for laboratories not equipped with real-time PCR instruments. On the other hand, serology has a better cost-effectiveness, does not require specific PCR instruments, and is most likely to become widely used for routine diagnosis despite requiring a second sample collection. We conclude, however, that the laboratory diagnosis of a chosen clinical episode should not rest on the PCR or acute phase serologic assay alone, but must also include antibody assays to confirm whether infection is current or represents persistence from past exposure.

Acknowledgments

The authors thank M. Pérez and L. Haba for technical assistance and the staff from the paediatric department of the hospital.

References

- Atkinson TP, Balish MF, Waites KB (2008) Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiol Rev* 32:956–973.
- Beersma MF, Dirven K, van Dam AP, Templeton KE, Claas EC, Goossens H (2005) Evaluation of 12 commercial tests and the complement fixation test for *Mycoplasma pneumoniae*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies, with PCR used as the “gold standard”. *J Clin Microbiol* 43:2277–2285.
- Daxboeck F, Krause R, Wenisch C (2003) Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Microbiol Infect* 9:263–273.
- Kim NH, Lee JA, Eun BW, Shin SH, Chung EH, Park KW, Choi EH, Lee HJ (2007) Comparison of polymerase chain reaction and the indirect particle agglutination antibody test for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children during two outbreaks. *Pediatr Infect Dis J* 26:897–903.
- Loens K, Ursi D, Goossens H, Ieven M (2003) Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 41:4915–4923.
- Matas L, Dominguez J, De Ory F, Garcia N, Gali N, Cardona PJ, Hernandez A, Rodrigo C, Ausina V (1998) Evaluation of Meridian ImmunoCard Mycoplasma test for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*-specific IgM in paediatric patients. *Scand J Infect Dis* 30:289–293.

- Nadala D, Bossart W, Zucol F, Steiner F, Berger C, Lips U, Altwegg M (2001) Community-acquired pneumonia in children due to *Mycoplasma pneumoniae*: diagnostic performance of a seminested 16S rDNA-PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 39:15–19.
- Nilsson AC, Bjorkman P, Persson K (2008) Polymerase chain reaction is superior to serology for the diagnosis of acute *Mycoplasma pneumoniae* infection and reveals a high rate of persistent infection. *BMC Microbiol* 8:93.
- She RC, Thurber A, Hymas WC, Stevenson J, Langer J, Litwin CM, Petti CA (2010) Limited utility of culture for *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* for diagnosis of respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 48:3380–3382.
- Templeton KE, Scheltinga SA, Graffelman AW, Van Schie JM, Crielaard JW, Sillekens P, Van Den Broek PJ, Goossens H, Beersma MF, Claas EC (2003) Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 41:4366–4371.
- Thurman KA, Walter ND, Schwartz SB, Mitchell SL, Dillon MT, Baughman AL, Deutscher M, Fulton JP, Tongren JE, Hicks LA, Winchell JM (2009) Comparison of laboratory diagnostic procedures for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in community outbreaks. *Clin Infect Dis* 48:1244–1249.
- Waites KB, Talkington DF (2004) *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 17:697–728 table of contents.
- Williamson J, Marmion BP, Worswick DA, Kok TW, Tannock G, Herd R, Harris RJ (1992) Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection: 4. Antigen capture and PCR-gene amplification for detection of the Mycoplasma: problems of clinical correlation. *Epidemiol Infect* 109:519–537.
- Xu D, Li S, Chen Z, Du L (2011) Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in different respiratory specimens. *Eur J Pediatr* 170:851–858.
- Yoo SJ, Oh HJ, Shin BM (2007) Evaluation of four commercial IgG- and IgM-specific enzyme immunoassays for detecting *Mycoplasma pneumoniae* antibody: comparison with particle agglutination assay. *J Korean Med Sci* 22:795–801.

AGRADECIMIENTOS

*Cualquiera que hayan sido nuestros logros,
Alguien nos ayudó siempre a alcanzarlos*

Althea Gibson

Sin duda este ha sido el capítulo de la tesis que más me ha costado escribir. Son muchos los recuerdos que vienen a mi memoria en este momento...De este largo camino, creo que lo mejor y que más recordaré son las personas a las que he conocido. Cada una de ellas, de alguna manera me ayudaron a terminar esta Tesis brindándome su apoyo, compañía o simplemente una sonrisa.

Quiero agradecer a mis tutores. Al Dr. Ausina, por recibirme en su laboratorio, confiar en mí, y guiar esta Tesis Doctoral. Al Dr. Carlos Rodrigo, por entregarme su sabiduría y ayuda en entender la clínica de los pacientes.

A Jose y Cristina, porque sin duda esta Tesis a llegado a buen término gracias a su ayuda. Por el apoyo en los malos momentos, por sacarme continuamente del círculo de la negatividad y por los buenos momentos compartidos en congresos y cenas, muchas gracias a los dos.

A Silvia, por toda la ayuda y apoyo en estos años. Por solucionar los problemas que se veían más imposibles de resolver, por tener siempre un “Tú no te preocupes” preparado, por tan buenos momentos, por organizar las salidas y paseos y ante todo por su amistad!.

A Gema por su amistad, por ser mi médico personal y por ser “extranjera” como yo.

A Alicia e Irene, por la compañía, las risas y los buenos momentos. En especial a Alicia por las miles de veces que la molesté con el famoso EndNote. Gracias chicas!

A Meissi, por compartir tantas conversaciones de la vida y por entender mejor que nadie lo que afecta estar lejos de la familia.

A Miguel Pérez y Miguel Ángel, por la simpatía y cariño que siempre me han dado. A Miguel Pérez en especial por toda la ayuda en congelar, ordenar y buscar muestras, y por el apodo de “Miss Loret”.

A Nerea y Elena, por la amistad incondicional que han tenido y por recibirnos con los brazos abiertos a nuestro regreso de UK. Por tantos buenos momentos vividos tomando pisco sour, terremotos y sus respectivas réplicas...Elena, gracias por todos los favores que te he pedido y el tiempo que te he quitado por ello. Nerea, por ser mi compañera de despacho por tanto tiempo, por tu amistad y cariño, por aprender mi idioma y enseñarme tantas palabras del tuyo...por tantas “conversaciones de pasillo” que nos ayudaron a desahogarnos. Por compartir tantos momentos, desde las idas a la UAB en el Máster, hasta la presentación de esta Tesis. Parece mentira que se hace realidad el momento del que tantas veces no quisimos hablar...pero estoy segura que esta amistad seguirá para siempre.

A María José, por compartir tantos momentos de alegrías y penas, por las tardes de estudio de inglés que se transformaban en eternas charlas sobre la vida. Por acompañarme cuando Francisco estaba en India, y hacer más fáciles esos largos días

de invierno. Querida, sabes que “sos” como una hermana más para mí...Te quiero muchísimo, te estaré esperando en Chile! Eso no lo dudes!!!.

A todos mis compañeros de laboratorio. Son muchos y no quisiera dejar de dar las gracias a todos, a los adjuntos, técnicos, becarias y secretarias del Servicio de Microbiología. En especial, quiero agradecer a Belén por compartir tantas idas al laboratorio, por esperarme cuando iba tarde, por su amistad y ayuda. Estoy segura que nadie sabe conducir por las curvas de la Vallensana mejor que tú! Gracias por todo Belén!. A Albert por su ayuda incondicional en la búsqueda de historias en el SAP y a Elisa por su ayuda en las técnicas moleculares. A Sonia Molinos por su ayuda y apoyo cuando más lo necesité en las urgencias médicas.

A los buenos amigos de Barcelona, Susy, Pancho, César, Lío, Felipe y Marce, Alfredo y Mónica, por estar en los buenos y malos momentos, por las fiestas, las onces chilenas que tanto añorábamos, las copas varias y la buena conversa. A Isabel Brito, por su compañía en las clases de inglés y su cariño.

Al grupo latino de Canterbury, Pablo, Constanza y Carol por compartir tan buenos momentos en el frío invierno inglés y por todo el apoyo en los momentos difíciles.

A mis amigas del colegio, Pía e Isabel, con las que he mantenido una amistad por tanto tiempo. Porque a pesar de estar tan lejos, han hecho posible que esta amistad siga adelante.

A todos los pacientes que han participado y aportado lo más importante de nuestros estudios y a los pediatras y enfermeras que a lo largo de estos años han participado en los diferentes proyectos, y me han ayudado con los datos e historias clínicas.

En especial quiero agradecer a mis Padres y a mis hermanos Rocío y Francisco, por esperar pacientemente al otro lado de la Cordillera de los Andes mi regreso. Porque gracias a ellos soy quién soy. Por la paciencia que han tenido, por las tantas veces que les dije “éste si que es el último año”....gracias!!!!. A mi hermana Carolina, por acompañarnos y ayudarnos en todo. Ánimo con lo que queda!! Te estaremos esperando en casa...

A mi Abuelita Adela, por todo el apoyo y cariño, a pesar de estar tan lejos la he sentido como si estuviera al lado mío siempre.

Y finalmente, quiero agradecer a la persona que más paciencia ha tenido, la que me ha entregado su amor incondicional, a Francisco. Gracias cariño! Por ser el mejor compañero en esta aventura, por quererme tal como soy, con mis mañas. Por apoyarme y darme ánimo cuando pensaba que las cosas ya no podían estar peor, ha sido tu constante motivación la que me ha permitido luchar día a día para alcanzar este objetivo, por encontrarme siempre la mejor y sobre todo por formar parte de, sin duda, el mejor título que podré obtener en esta vida...ser madre de esos pequeños que vienen en camino y que serán nuestra mayor alegría.

