

Instituto de Medicina Tropical

"Pedro Kourí"

Vice-Dirección de Microbiología,
Departamento de Virología

***"Virus respiratorios emergentes en Cuba en el
período 2005-2010"***

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en
Ciencias Médicas

Autor: Dra Belsy Acosta Herrera

La Habana
2012

Instituto de Medicina Tropical

"Pedro Kourí"

Vice-Dirección de Microbiología,
Departamento de Virología

***"Virus respiratorios emergentes en Cuba en el
período 2005-2010"***

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en
Ciencias Médicas

Autor: Dra. Belsy Acosta Herrera

Asesores: Prof. Clara Savón Valdés, DrC

Prof. Odalys Valdés Ramírez, DrC

La Habana

2012

"Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano"

Isaac Newton

AGRADECIMIENTOS

He escuchado a mis colegas decir que llegar hasta aquí resulta bien difícil y sobre todo que es directamente proporcional al esfuerzo que se realiza y depende del lugar que le demos en nuestras vidas. Coincido con ellos, pero añadiría que cuando nos corresponde escribir este acápite es como si comenzáramos de nuevo la escritura de un documento tan importante como lo es la propia tesis. Ninguna norma pudiera restringir su número de páginas, pues es imposible llegar a este momento sin recibir la ayuda desinteresada de muchas personas y como siempre me dijo mi madre desde pequeña: "Hija, si hay algo en la vida que nunca puedes dejar de ser, es agradecida".

Es precisamente a ella a quien debo agradecer el ejemplo que me ha dado para ser cada día mejor, lo que me permite llegar hasta aquí.

Quisiera agradecer además mi esposo, que conocí cuando apenas comenzaba en esta prestigiosa institución y supo que necesitaría mucha paciencia para estar a mi lado, pero no dudó seguirme y apoyarme en este largo pero bello camino.

Y aunque la más pequeña de mi hogar, mi hija Gabriela no colabora con las tareas domésticas, no puedo dejar de agradecerle el aliento y la fuerza que día a día me brinda con sus resultados académicos y estoy segura que comprende el por qué de algunas de mis ausencias necesarias.

Mi familia es muy numerosa por lo que resulta imposible mencionar a cada uno de ellos, algunos de mis vecinos forman parte de ella, sepan que les estoy eternamente agradecida.

El IPK, es el único centro laboral en mi vida como trabajadora de la salud, por lo que tengo que agradecerle toda la preparación profesional que hoy he alcanzado. Primero mis hermosos años de residencia compartiendo con colegas de la carrera de Medicina y los excelentes trabajadores de la subdirección docente (profesores, trabajadores de la biblioteca, dibujo, video y directivos). Luego llegué a la Subdirección de Microbiología para comenzar mi andar por la virología y son tantos los que me han acompañado en los momentos de ciencia, de risa y de llanto !!!!

En primer lugar debo mencionar a los profesores Gustavo Kourí, Alina Llop, Pedro Más, Angel Goyenechea y Lupe a los que varias generaciones los conocemos como fuentes inagotables de conocimientos

microbiológicos y de la vida en general y que debo agradecerles la oportunidad que me han dado de aprender de ellos.

En virología, agradezco a todos los profesores virologos (Susana, Licel, Angelita, Chiqui, Sonia, Mayling, Marité, Delfina, Luisitos, Vivian, Ariel, Rosmary, Rosita, Bettys) y técnicos (Cuca, Yahisel) el compartir durante tanto años el trabajo de la virología cubana, les doy mil gracias por acompañarme en el trabajo y en otros buenos momentos.

Desde el año 2000, el grupo de respiratorio de virología (Ale, Clarita, Odalys, Guelsys, Grehete, Baby, Puchy, Angel y más recientemente Amely y Mayra) es mi segunda casa y familia a la que no me unen lazos de consanguinidad pero si de amistad y gran solidaridad humana. Este se conoce por ser divertido, en el mejor sentido de la palabra pero son todos excelentes científicos y trabajadores incansables. Gracias a todos pues sepan que les toca un buen pedazo de este pastel.

Otros amigos (Cary, Ana Margarita, Fraga, Maité, Orestes, Vilma, Dulce, Idalmys, Fefa) también merecen mi agradecimiento por todo el apoyo.

A Gema, Mercedes, Nieves, Pilar, Inma, Paco, Lola y toda la familia española, gracias por brindarme desinteresadamente amistad, solidaridad, buenos momentos y muchas enseñanzas.

A Lizet Sánchez, María Eugenia Toledo, Gloria del Barrio y Sonia Resik; gracias por dedicar tiempo a una excelente revisión de este trabajo y realizar sugerencias oportunas.

A Beatriz y Kleich quiero agradecerles por su contribución con el análisis estadístico de los resultados y sus recomendaciones acertadas.

Algunas personas queridas que hoy no están (mi padre, Arbelio, mi abuela) que les llegue también mi más sincero agradecimiento.

Otras muchas personas podrían sentirse olvidadas, por favor, sepan que ha sido involuntario y nunca podría terminar con mi ejercicio de defensa pues este acápite lo he hecho al finalizarlo. A todas aquellas que me han dedicado un minuto de su tiempo para llevar adelante este trabajo, MIL GRACIASSSSSSSSSSSSS desde todas las partes de mi corazón.

Belsy Acosta

A mi madre por su ejemplo,
A mi esposo por compartir el amor y la paciencia mutua,
A mi hija por darme fuerzas día a día.

LISTADO DE ABREVIATURAS

IRA: infecciones respiratorias agudas

OMS: Organización Mundial de La Salud

TR-RCP: transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa

RCP: reacción en cadena de la polimerasa

MPVH: metapneumovirus humano

CoVH SARS: coronavirus humano causante del síndrome agudo respiratorio severo

CoVH: coronavirus humano

BoVH: bocavirus humano

AdVH: adenovirus humanos

MINSAP: Ministerio de Salud Pública

LNR: Laboratorios Nacionales de Referencia

IPK: Instituto Pedro Kourí

SFAI: síndrome febril agudo inespecífico

EIE: Enfermedades Infecciosas Emergentes

EUA: Estados Unidos de América

CDC: Centro para el Control de Enfermedades de los EUA (CDC, siglas del inglés, Centre for Diseases Control)

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

VSRH: virus sincitial respiratorio humano

VEB: virus Epstein-Barr

CMV: citomegalovirus

SBG: síndrome de bajo gasto

ITRS: Infecciones del tracto respiratorio superior

ETI: Enfermedad tipo Influenza

ITRI: Infecciones del tracto respiratorio inferior

UCI: Unidades de Cuidados Intensivos

IRAG: Infección Respiratoria Aguda Grave

PAIEPI: Programa de Atención Integral a las Enfermedades Prevalentes en la Infancia

VPI: virus parainfluenza

RV: rinovirus

EV: enterovirus

ENF: exudado nasal y faríngeo

AB: aspirado bronquial

Ag: antígenos

IF: inmunofluorescencia

FC: fijación del complemento

IH: inhibición de la hemaglutinación

nm: nanómetros

kb: kilobases

ADN: ácido desoxiribonucleico

Ac: anticuerpos

mediadores de la neutralización (hexonas), o de la inhibición de la hemaglutinación (fibras) (59).

LCR: líquido cefalorraquídeo

ARN: ácido ribonucleico

Hep-2: células de línea de carcinoma laríngeo

HeLa: células epiteliales humanas de carcinoma cervical

ECP: efecto citopático

NS: proteínas no estructurales

F: glicoproteína de fusión

G: glicoproteína de unión

SH: proteína pequeña hidrofóbica

M: proteína de la matriz

NP: nucleoproteína

P: fosfoproteína

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

HA: hemaglutinina

NA: neuraminidasa

PB: proteína polimerasa básicas

PA: proteína polimerasa ácida

NeuAc: ácido siálico N-acetilneuramínico

NeuGc: Ácido siálico N-Glicolilneuramínico

CNI: Centro Nacional de Influenza

TR: enzima transcriptasa reversa

FRET: (siglas del inglés, fluorescence resonance energy transfer)

MEM: Medio Esencial Mínimo

CI: control interno

dNTPs: deoxinucleótidos

ISCHIII: Instituto de salud Carlos III

VPP: valor predictivo positivo

VPN: valor predictivo negativos

VP: verdaderos positivos

VN: verdaderos negativos

FP: falsos positivos

FN: falsos negativos

UTM: medio de transporte universal para virus (siglas del inglés Universal Transport Medium)

GISAID: Iniciativa Global para Compartir Datos de Influenza Aviar (siglas del inglés, Global Initiative Share Avian Influenza Data)

BLAST: herramientas para búsqueda de alineamientos locales básicos (siglas del inglés, Basic Local Alignment Search Tool)

DNE: Dirección Nacional de Epidemiología

APP: Antecedentes patológicos personales

NR: No referidos

IC: Intervalo de Confianza

SE: semana epidemiológica

SÍNTESIS

La investigación sobre la circulación en Cuba de virus respiratorios emergentes abarcó tres estudios. El primero de ellos fue un estudio descriptivo de serie de casos que evidenció que un brote pediátrico ocurrido en el año 2005, estuvo constituido por dos eventos clínicos independientes: un brote de miocarditis fatal donde se identificó el serotipo 5 de los adenovirus en el 75% de los casos y un brote distinguido por el predominio de síntomas gastrointestinales. Para este último se identificó el *adenovirus D* en 9 pacientes. Un segundo estudio descriptivo de serie de casos demostró que dos nuevos virus: metapneumovirus humano y bocavirus humano, circulan en niños cubanos ≤ 5 años de edad asociados significativamente a infecciones del tracto respiratorio inferior ($p=0,00$) y superior ($p=0,00$), respectivamente, incrementando el número de agentes que ocasionan infecciones respiratorias agudas de diferente severidad. El tercer estudio de corte transversal permitió diseñar un algoritmo de diagnóstico molecular en dos fases para la identificación del virus emergente influenza A (H1N1) pdm09. El mismo permitió confirmar a este agente en 1805 muestras clínicas y definir dos picos de actividad en su circulación. Su detección se asoció significativamente al diagnóstico clínico de infección respiratoria leve ($p=0,00$) y grave ($p=0,00$), a la condición de ser viajero ($p=0,01$) y al estudio de brotes ($p=0,00$). Los resultados de la investigación evidenciaron la circulación en Cuba de virus respiratorios emergentes asociados a eventos clínicos y epidemiológicos diversos utilizando las herramientas diagnósticas moleculares.

INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Antecedentes	2
I.2 Hipótesis de trabajo	4
I.3 Objetivos	4
I.4 Novedad científica	5
I.5 Valor teórico y práctico	5
I.6 Valor social	5
II. MARCO TEÓRICO	7
II.1 Enfermedades Infecciosas Emergentes y Re-emergentes.	7
II. 1. 1 Definición	7
II. 1. 2 Causas del origen de las Enfermedades Infecciosas Emergentes y Re-emergentes.	7
II. 1. 3 Ejemplos de Enfermedades Infecciosas Emergentes y Re-emergentes.	8
II.2 Miocarditis	9
II. 2. 1 Definición	9
II. 2. 2 Etiología	9
II. 2. 3 Diagnóstico	10
II. 2. 4 Epidemiología	11
II.3 Infecciones Respiratorias Agudas	12
II. 3. 1 Definición.	12
II. 3. 2 Clasificación	12
II. 3. 3 Etiología	13

II. 3. 4	Diagnóstico	14
II. 3. 5	Epidemiología	15
II. 4	Adenovirus	16
II. 4. 1	Características generales	16
II. 4. 2	Manifestaciones clínicas	16
II. 4. 3	Diagnóstico	17
II. 4. 4	Epidemiología	18
II. 5	Virus sincitial respiratorio humano	19
II. 5. 1	Características generales	19
II. 5. 2	Manifestaciones clínicas	19
II. 5. 3	Diagnóstico	19
II. 5. 4	Epidemiología	20
II. 6	Metapneumovirus humano	20
II. 6. 1	Características generales	20
II. 6. 2	Manifestaciones clínicas	21
II. 6. 3	Diagnóstico	21
II. 6. 4	Epidemiología	22
II. 7	Bocavirus humano	22
II. 7. 1	Características generales	22
II. 7. 2	Manifestaciones Clínicas	23
II. 7. 3	Diagnóstico	23
II. 7. 4	Epidemiología	24
II. 8	Virus influenza	24
II. 8. 1	Características generales	24
II. 8. 2	Manifestaciones Clínicas	26
II. 8. 3	Diagnóstico	27
II. 8. 4	Epidemiología	28
II. 9	Diagnóstico Molecular	30
II. 9. 1	Reacción en Cadena de la Polimerasa	30
II. 9. 2	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real:	31

II. 9. 3	Secuenciación de ácidos nucleicos	32
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
III. 1	Diseño general de la investigación	33
III. 2.	Identificación del agente etiológico viral de un brote de SFAI.	33
III. 2. 1	Universo de estudio.	33
III. 2. 1 a)	Marco muestral.	34
III. 2. 1 b)	Procesamiento de las muestras clínicas.	34
III. 2. 1 c)	Extracción de ácidos nucleicos.	35
III. 2. 1 d)	Detección del genoma viral.	36
III. 2. 1 e)	Ensayo de TR-RCP anidada múltiple para la detección de influenza A, influenza B, influenza C, VSRH A, VSRH B y AdVH.	36
III. 2. 1 f)	Ensayo de TR-RCP anidada múltiple para la detección de VPI tipo 1-4, CoVH OC43, CoVH 229E, RV y EV.	37
III. 2. 1 g)	Controles.	37
III. 2. 1 h)	Detección de los productos de amplificación.	38
III. 2. 2	Secuenciación de ácidos nucleicos.	39
III. 2. 2 a)	Ensayo de RCP semi-anidada para secuenciación nucleotídica de los AdVH.	39
III. 2. 2 b)	Purificación de los productos de amplificación.	39
III. 2. 2 c)	Reacción de secuenciación nucleotídica.	39
III. 2. 2 d)	Análisis de las secuencias nucleotídicas.	40
III. 3	Identificar la circulación del metapneumovirus humano y el bocavirus humano en niños ≤ 5 años de edad con infección respiratoria aguda mediante un ensayo de TR-RCP anidado múltiple optimizado.	40
III. 3. 1	Desarrollo del ensayo de TR-RCP anidado múltiple para el diagnóstico de VSRH A y B, MPVH y BoVH.	41
III.3. 1 a)	Optimización del ensayo de TR-RCP anidado múltiple para el diagnóstico de VSRH A, VSRH B, BoVH y MPVH	41
III. 3. 1 b)	Controles	42
III. 3. 1 c)	Detección de los productos de amplificación.	42

III. 3. 1 d) Evaluación de la validez diagnóstica del ensayo de TR-RCP anidado múltiple optimizado.	43
III. 3. 2 Estudio de la circulación de BoVH y MPVH mediante el ensayo de TR-RCP múltiple anidado optimizado para el diagnóstico de VSRH A, VSRH B, MPVH y BoVH.	44
III. 3. 2 a) Universo de estudio.	44
III. 3. 2. b) Marco muestral.	45
III. 3. 2 c) Procesamiento de las muestras clínicas.	45
III. 3. 2 d) Extracción de ácidos nucleicos.	45
III. 3. 2 e) Detección del genoma viral de VSRH A, VSRH B, BoVH y MPVH mediante el ensayo de TR-RCP anidado múltiple optimizado.	45
III. 3. 2. f) Controles	46
III. 3. 2 g) Detección de los productos de amplificación.	46
III.4 Desarrollar una estrategia de laboratorio para el diagnóstico y el monitoreo de la circulación de un virus influenza con potencial pandémico.	46
III. 4. 1 Elaboración de un algoritmo para el diagnóstico de virus influenza con potencial pandémico.	46
III. 4. 1 a) Extracción de ácidos nucleicos.	46
III. 4. 1 b) Detección del genoma viral de virus influenza A (H1N1) pdm09.	47
III. 4. 1 c) TR-RCP anidada para la amplificación de un segmento del gen de la NP de los virus influenza A.	47
III. 4. 1 d) TR-RCP para la amplificación de un segmento del gen de la proteína M de los virus influenza A.	47
III. 4. 1 e) TR-RCP anidada múltiple para la amplificación de un segmento del gen de la HA de los virus influenza A estacionales A (H3) y A (H1).	48
III. 4. 1 f) TR-RCP para la amplificación de un segmento del gen de la HA del virus influenza A (H1N1) pdm09.	49

III. 4. 1 g) Controles.	49
III. 4. 1. h) Detección de los productos de amplificación.	49
III. 4. 1. i) Secuenciación de ácidos nucleicos.	50
III. 4. 1. j) Detección del producto amplificado.	50
III. 4. 1. k) Purificación de los productos de amplificación.	50
III. 4. 1. l) Reacción de secuenciación nucleotídica.	50
III. 4. 1. m) Análisis de las secuencias nucleotídicas.	51
III. 4. 1. n) Diagnóstico diferencial con otros virus respiratorios.	51
III. 4. 1. ñ) TR-RCP en tiempo real para el diagnóstico de influenza A (H1N1) pdm09.	51
III. 4. 2 Estudio de la circulación del virus influenza con potencial pandémico.	52
III. 4. 2 a) Universo de estudio.	52
III. 4. 2. b) Marco muestral.	53
III. 4. 2. c) Procesamiento de las muestras clínicas.	54
III. 4. 2. d) Diagnóstico del virus influenza con potencial pandémico.	54
III. 5 Procedimiento para la recolección y análisis de la información de los estudios descritos en los acápites III. 2. 1, III. 3. 2 y III. 4. 2.	55
III. 6 Consideraciones éticas.	55
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
IV. 1 Identificación del posible agente viral causante de un brote de SFAI.	57
IV. 2 Identificación de la circulación de MPVH y BoVH en niños ≤ 5 años de edad con IRA mediante un ensayo de TR-RCP anidado múltiple optimizado.	64
IV. 2. 1 Desarrollo del ensayo de TR-RCP anidado múltiple para el diagnóstico de VSRH A y B, MPVH y BoVH.	64
IV. 2. 2 Identificación de la circulación de MPVH y BoVH en niños ≤ 5 años de edad con IRA	69
IV. 3 Desarrollo de una estrategia de laboratorio para el diagnóstico y estudio de la circulación de un virus influenza con potencial pandémico.	75

IV. 3. 1 Elaboración de un algoritmo para el diagnóstico de virus influenza con potencial pandémico.	75
IV. 3. 2 Detección y estudio de la circulación del virus influenza pandémico.	82
V. DISCUSIÓN GENERAL	90
VI. CONCLUSIONES	96
VII. RECOMENDACIONES	97
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
ANEXOS	

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

Desde el siglo pasado, las enfermedades transmisibles constituyen una causa importante de morbimortalidad. En el último tercio del siglo XIX se descubrieron muchos de sus agentes causales, sus reservorios, fuentes de infección y mecanismos de transmisión, lo que condujo a desarrollar y adoptar medidas preventivas que permitieron, junto con el desarrollo económico y social, disminuir su incidencia y mortalidad particularmente en los países desarrollados. Se pensó que con el saneamiento, el desarrollo de vacunas, el uso de medicamentos antimicrobianos y otras medidas, las enfermedades transmisibles iban a dejar de ser un problema grave de salud pública (1). Sin embargo, hoy siguen siendo la segunda causa de muerte general y la primera causa de años perdidos ajustados a discapacidad a nivel mundial (2).

Las infecciones respiratorias agudas (IRA), en particular las que afectan el tracto respiratorio inferior, predominan a nivel mundial como causa de muerte. Los virus constituyen los principales agentes etiológicos (3). En la población pediátrica, según estimaciones de la Organización Mundial de La Salud (OMS), ocurren dos millones de fallecimientos anuales (2). Estas infecciones además, originan pérdidas millonarias a los Estados por concepto de ausencias laborales, escolares, costos de consultas médicas, hospitalización y medicamentos, tanto en la atención primaria como en los servicios de urgencias hospitalarios (4).

En los últimos años, el desarrollo y aplicación de las herramientas moleculares al diagnóstico y monitoreo de las infecciones virales experimenta una fase de crecimiento sin precedentes (5). En particular, el diseño y perfeccionamiento de las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos como las técnicas de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (TR-RCP), reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y RCP en tiempo real, permitieron ampliar el número de agentes virales implicados en la etiología de las IRA (6, 7). Desde el comienzo del presente siglo, las familias *Paramyxoviridae* y *Coronaviridae* se incrementaron con el descubrimiento del metapneumovirus humano (MPVH) (8) del coronavirus humano causante del síndrome agudo respiratorio severo (CoVH SARS) (9) y de dos coronavirus humanos identificados en Holanda (CoVH NL63) (10) y Hong Kong (CoVH HKU1) (11). Entre los años 2005 y 2007, se identificaron tres nuevos virus respiratorios: el bocavirus humano (BoVH) perteneciente a la familia

Parvoviridae (12) y dos virus (KIV y WUV) (13, 14) reconocidos como miembros de la familia *Polyomaviridae*. Por otra parte, las herramientas moleculares han posibilitado también el estudio de la evolución de los virus conocidos (15, 16). En los últimos años, los estudios de caracterización molecular de los adenovirus (AdVH), reportan la emergencia de nuevos serotipos, la circulación de serotipos conocidos con diferente tropismo, mayor virulencia, recombinaciones entre serotipos, entre otros, representando un cambio global en relación con la significación clínica y epidemiológica de estos agentes (17-19).

Por último, las herramientas de diagnóstico molecular han permitido también la notificación de la emergencia de brotes del virus de la influenza aviar A (H5N1) en aves de corral de varios países, 570 casos de infección en humanos por este agente con una mortalidad de un 58,7% y la identificación del agente causal de la primera pandemia del siglo 21 (20-22).

En Cuba, las IRA constituyen la primera causa de atención médica a los distintos niveles del sistema nacional de salud. La mortalidad por Influenza y neumonía, constituye la quinta causa de muerte en niños menores de 5 años y la sexta causa en la población en general (23). Desde el año 2000, el Ministerio de Salud Pública (MINSAP), implementó un Programa Integral de Atención y Control de las IRA, el cual establece un grupo de objetivos centrales para el enfrentamiento a estas infecciones, y donde la vigilancia de laboratorio constituye un pilar fundamental (24).

Los Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR) para la vigilancia de los virus influenza y otros virus respiratorios del Instituto Pedro Kourí (IPK) contribuyen al conocimiento de la participación de estos agentes en la etiología de casos esporádicos y brotes de IRA. Esto ha sido posible mediante el empleo de métodos convencionales de diagnóstico virológico y la aplicación de las herramientas de diagnóstico molecular al estudio de algunos de los agentes (25-27). Sin embargo, en un número considerable de pacientes, la etiología de diferentes tipos de IRA u otras enfermedades infecciosas en los cuáles algunos virus respiratorios podrían estar implicados, no está esclarecida.

En este contexto que se inserta el presente trabajo, identificaremos la circulación de algunos virus emergentes causantes de IRA. Al mismo tiempo, su relación etiológica con eventos clínicos y epidemiológicos de importancia para la salud pública nacional e internacional mediante el desarrollo y aplicación práctica de métodos de diagnóstico molecular en los LNR.

I.2 Hipótesis de trabajo

Los virus respiratorios emergentes circulan en Cuba asociados a diferentes cuadros clínicos y eventos epidemiológicos.

I.3 Objetivos

General:

Proporcionar evidencias sobre la circulación de los virus respiratorios emergentes en Cuba en el período 2005-2010 mediante ensayos de diagnóstico molecular.

Específicos:

- 1- Identificar la posible etiología viral de un brote de síndrome febril agudo inespecífico en pacientes pediátricos.
- 2- Identificar la circulación de metapneumovirus humano y bocavirus humano en niños ≤ 5 años de edad con infección respiratoria aguda mediante un ensayo de TR-RCP anidado múltiple optimizado.
- 3- Desarrollar una estrategia de laboratorio para el diagnóstico y estudio de la circulación de un virus influenza pandémico.

I.4 Novedad científica

- Por primera vez en Cuba se identifica a los AdvH *especie C* serotipo 5 en la etiología de un brote severo de miocarditis aguda.
- Se demuestra la circulación de dos virus respiratorios emergentes asociados con cuadros clínicos de diferente severidad en pacientes pediátricos, de lo que no se registran precedentes.
- La identificación inusual de la *especie D* de AdvH como causa de un brote de gastroenteritis aporta evidencias que sugieren la posible circulación de variantes de este agente en nuestro país.
- Los resultados presentados sobre la circulación del primer virus pandémico del presente siglo en Cuba, aportan conocimientos a nivel nacional e internacional sobre las características de este agente nuevo en relación con otros virus pandémicos que le precedieron.

I.5 Valor teórico y práctico

- Los resultados obtenidos contribuyen a conocer la participación de los diferentes virus respiratorios en la etiología de diferentes cuadros clínicos y eventos epidemiológicos.
- El presente trabajo está enfocado en el estudio etiológico de la principal causa de morbilidad y una de las primeras causas de mortalidad a nivel mundial.
- El desarrollo e introducción de herramientas de diagnóstico molecular posibilitó fortalecer las capacidades diagnósticas de los LNR para la vigilancia de las IRA de etiología viral y sienta las bases para el desarrollo de investigaciones futuras sobre estos virus.
- Los resultados obtenidos orientan hacia la necesidad de actualizar las estrategias actuales de prevención y control de las IRA para el enfrentamiento de futuras emergencias de salud.
- Los resultados presentados en esta investigación cuentan con reconocimientos entre los que se destacan: dos Logros de la Academia de Ciencias de Cuba, un Resultado Relevante institucional, dos Premios en el Forum Provincial de Ciencia y Técnica, un Premio Anual de la Salud en la categoría de artículo científico, un Premio Anual en la categoría de investigaciones de sistemas y servicios de Salud. Al mismo tiempo, los mismos forman parte de siete publicaciones y ocho presentaciones en siete eventos científicos. Estos resultados también han formado parte de tres Trabajos de Diploma, una Tesis de Especialista en Microbiología y una Tesis de Maestría en Virología (Anexo 1).

I.6 Valor social

- La identificación oportuna del agente involucrado en la etiología de lo que se denominó síndrome febril agudo inespecífico (SFAI), así como de la circulación del virus influenza A (H1N1) pdm09, permitió el mejor

manejo de los casos de infección por estos agentes y la implementación de acciones efectivas de prevención y control que posibilitaron mitigar el impacto social de estos eventos sanitarios.

I. MARCO TEÓRICO

II. 1 Enfermedades Infecciosas Emergentes y Re-emergentes.

II. 1. 1 Definición

Las enfermedades infecciosas son causadas por la presencia y actividad en los seres vivos de uno o más agentes patogénicos incluyendo los virus, bacterias, hongos, helmintos, protozoos y proteínas anormales llamadas priones. Estas enfermedades son transmitidas por una gran variedad de vías incluyendo el contacto directo o indirecto; ingestión (en agua o alimentos), transmisión de fluidos humanos; inhalación de partículas en el aire y transmisión por vectores (mosquitos, pulgas, roedores, garrapatas, entre otros). La extensión de la amenaza global de estas enfermedades para la salud pública depende de las tasas de prevalencia y de incidencia de las infecciones conocidas, unido a las infecciones emergentes y re-emergentes (28).

El concepto de Enfermedades Infecciosas Emergentes (EIE) fue establecido en 1992 por el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (EUA). Las mismas se definen como: "las enfermedades infecciosas descubiertas en los últimos años o aquellas en las cuales la incidencia en humanos o distribución geográfica ha aumentado en las dos últimas décadas o que amenazan aumentar en el futuro" (29, 30).

Las infecciones re-emergentes son aquellas que han sido previamente conocidas, pero que, aunque se consideraban controladas o erradicadas, han reaparecido con una mayor virulencia del microorganismo, con nuevas características sociales o en un contexto epidemiológico nuevo (29, 30).

II. 1. 2 Causas del origen de las EIE y Re-emergentes.

Las causas específicas de la emergencia y re-emergencia de las enfermedades infecciosas son muchas y varían ampliamente entre enfermedades y aún en la misma enfermedad entre diferentes localidades (31).

Entre las causas más frecuentes se encuentran las atribuidas a:

➤ **Factores sociales:**

-El crecimiento de las poblaciones.

-Las migraciones humanas y el movimiento de millones de personas desplazadas por guerras, inestabilidad civil y desastres naturales.

-La urbanización rápida y desordenada.

-Las crisis económicas y sociales que debilitan los sistemas de salud pública.

-El incremento de los viajes, el comercio y el turismo a nivel internacional los cuales proveen transporte eficiente para patógenos y sus vectores.

-Los cambios en el comercio global de ganado y alimentos, incluyendo las técnicas de mercadeo, flete y almacenaje (31).

➤ **Conducta humana:**

-Los cambios en el comportamiento sexual humano han aumentado la prevalencia de las enfermedades de transmisión sexual.

-El uso de drogas.

-Los cambios en los hábitos alimentarios.

-El desarrollo tecnológico que determina formas de vida moderna (calefacción, aire acondicionado).

-El uso indiscriminado de insecticidas.

-Los procedimientos médicos tales como transplantes de tejidos y órganos, uso de drogas inmunosupresoras, así como el uso amplio y mal uso de los agentes antimicrobianos.

-El bioterrorismo (31).

➤ **Factores medioambientales:**

-Los cambios ambientales causados por las actividades humanas como la deforestación, la reforestación, la construcción de carreteras, construcción de represas, sistemas intensivos de agricultura y producción animal, extensión descontrolada de las áreas urbanas, pobre sanidad pública y contaminación.

-El calentamiento global.

-Las inundaciones y las sequías.

-Los desastres naturales (31).

➤ **Factores microbianos:**

-La adaptación y las modificaciones de los agentes microbianos (31).

II. 1. 3 Ejemplos de EIE y Re-emergentes.

La OMS y el Centro para el Control de Enfermedades de los EUA (CDC, siglas del inglés, Centre for Diseases Control) han descrito más de 100 EIE y re-emergentes que afectan a los humanos o los animales que recientemente han aumentado o que amenazan aumentar en alcance geográfico, actividad epidémica y

gravedad (32). En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de los agentes patógenos causantes de EIE y Re-emergentes.

Tabla 1. Ejemplos de agentes patógenos causantes de Enfermedades Infecciosas Emergentes y Re-emergentes.

Tipo de agente	Nombre del agente	Enfermedad
virus	virus de inmunodeficiencia humana (VIH)	sida
virus	virus influenza	Influenza
virus	CoVH-SARS	Síndrome Agudo Respiratorio Severo
virus	MPVH	Infección respiratoria aguda
virus	BoVH	Infección respiratoria aguda Gastroenteritis
virus	virus dengue	Dengue
virus	virus hantaan	Fiebre hemorrágica con síndrome renal Síndrome pulmonar por hantavirus
bacteria	<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
bacteria	<i>Micobacterium Tuberculosis</i>	Tuberculosis
protozoo	<i>Plasmodium spp.</i>	Paludismo
protozoo	<i>Leishmania spp.</i>	Leishmaniosis

Fuente: Morens y cols., 2004

II. 2 Miocarditis

II. 2. 1 Definición

Las miocarditis se definen como una entidad anatomoclínica resultante de los procesos inflamatorios agudos o crónicos que afectan al músculo cardíaco. A nivel patológico se caracteriza por la presencia de infiltrados inflamatorios locales, necrosis y degeneración de los miocitos (33).

II. 2. 2 Etiología

De acuerdo a la etiología, suelen dividirse en primarias o idiopáticas y secundarias. De las formas primarias, también denominadas postviral ó linfocítica, en base al tipo celular predominante en el estudio histológico, no se conoce con certeza el mecanismo etiológico. Sin embargo, las secundarias se producen como consecuencia de un agente específico ó en el contexto de una enfermedad conocida.

Dentro de las causas identificadas se incluyen numerosos agentes infecciosos, enfermedades sistémicas y agentes tóxicos (tabla 2) (34, 35). Aunque los virus son considerados los agentes etiológicos del 75% de los casos de miocarditis aguda, un estudio reciente demostró que en el 50% de los casos de miocarditis no se identificaron agentes etiológicos a pesar de la sospecha de la posible causa viral (36).

Tabla 2. Causas más frecuentes de miocarditis.

Causas	Ejemplos
virus	coxsackievirus, AdVH, influenza, virus sincitial respiratorio humano (VSRH), VIH, echovirus, citomegalovirus, dengue, virus Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), virus varicella zoster, virus herpes simple, virus hepatitis A, virus hepatitis C, poliovirus, virus sarampión, virus parotiditis, virus rubéola, virus rabia, parvovirus B19, entre otros.
bacterias	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Neisseria Gonorrhea</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Brucella</i> , <i>Neisseria Meningitidis</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Micoplasma pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Treponema pallidum</i> .
hongos	<i>Actinomyces</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Blastomyces</i> , <i>Candida</i> , <i>Coccidioides</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Histoplasma</i> .
protozoos	<i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i>
helmintos	<i>Ascaris lumbricoide</i> , <i>Schistosoma</i> , <i>Trichinella spiralis</i>
rickesias	<i>Rickettsia rickettsii</i> , <i>Coxiella burnetti</i>
toxinas	Antraciclina, Cocaína, Interleucina 2
hipersensibilidad	Sulfamidas, Cefalosporinas, Diuréticos, Digoxina, Antidepresivos Tricíclicos, Dobutamina
enfermedades autoinmunes	Enfermedad de Churg-Strauss, Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Miocarditis de Células Gigantes, Diabetes Mellitus, Sarcoidosis, Lupus Eritematoso Sistémico, Tirotoxicosis, entre otras.

Fuente: Tobin, 2001, Maron y cols., 2006

II. 2. 3 Diagnóstico

En la mayoría de las ocasiones el diagnóstico se realiza en pacientes con cuadros de insuficiencia cardíaca de instauración subaguda que han evolucionado a una miocardiopatía dilatada. En el estudio de estos pacientes al realizar una biopsia endomiocárdica se detectan alteraciones anatomopatológicas compatibles con miocarditis activa (37).

Sin embargo, la miocarditis que se puede encontrar en el área de urgencias y en los servicios de Medicina Intensiva tiene un carácter más agudo y una presentación polimorfa. Es frecuente el antecedente de una enfermedad febril con sintomatología general y respiratoria varios días antes de la manifestación principal de

la misma, aunque puede faltar, no ser recordada o ser falsamente atribuida (por la alta prevalencia de este tipo de cuadros) (38). Con posterioridad sobreviene una o varias de las manifestaciones siguientes:

- Insuficiencia cardíaca: en forma exclusiva de edema agudo de pulmón ó de choque cardiogénico que resulta la más frecuente en los pacientes pediátricos. La exploración física variará según la severidad del cuadro, pero generalmente se encontrará taquicardia (desproporcionada al grado de fiebre), galope ventricular a la auscultación y grados variables de insuficiencia respiratoria y síndrome de bajo gasto (SBG). Este último se corresponde a una falla en el balance entre la bomba cardíaca central y el control de los componentes periféricos, que incluyen: a) el tono de la circulación periférica y b) los reguladores neurohumorales del tono vascular, con la llegada insuficiente de sangre oxigenada a los tejidos periféricos, para satisfacer las necesidades metabólicas (39).

Los datos clínicos asociados al SBG son: disminución o ausencia del pulso, piel fría y pálida en las extremidades con cianosis distal o acrocianosis, aumento de la frecuencia cardíaca, tensión arterial sistémica normal o disminuida, oliguria, saturación de oxígeno en sangre venosa menor a 40% (37).

- Presíncope/síncope: generalmente como expresión clínica de arritmias, bien del tipo de taquicardias ventriculares ó de bloqueos de conducción.

- Dolor torácico: presente en grados variables y junto con alteraciones electrocardiográficas sugerentes de isquemia miocárdica (onda Q pequeña o ausente, supradesnivelación del segmento ST, onda T invertida o aplanada, intervalo QT prolongado), puede conducir al error diagnóstico de un infarto agudo del miocardio.

- Arritmias: como manifestación inicial ó como complicación de la enfermedad.

- Muerte súbita: siendo diagnosticada en el estudio necrópsico (37).

La biopsia endomiocárdica, es la única técnica de diagnóstico que permite la confirmación de una miocarditis aguda. En 1987 se publicaron los criterios de Dallas para el diagnóstico anatomopatológico de la miocarditis. Esta clasificación carece de consideraciones patogénicas (víricas, inmunológicas), clínicas, evolutivas (aguda, subaguda, crónica) y pronósticas, centrándose en criterios exclusivamente morfológicos (40).

La biopsia endomiocárdica es un proceder invasivo y se asocia con riesgo de morbilidad, así como con errores de muestreo que reducen su sensibilidad diagnóstica. El aislamiento viral o cultivo de otros patógenos a partir del tejido miocárdico de fallecidos es difícil; pero las técnicas de biología molecular como la hibridación *in situ* o la RCP, hoy hacen posible la identificación específica de los agentes etiológicos más frecuentes (41).

II. 2. 4 Epidemiología

La incidencia de la miocarditis es estimada en 1-10 casos por cada 100 000 personas; sin embargo, la incidencia de resultados positivos en las biopsias endomiocárdicas en pacientes con sospecha de miocarditis

varía ampliamente en el rango entre 0%-80%. Se estima que del 1%-5% de los pacientes con infección viral aguda pueden presentar compromiso del miocardio (38).

La miocarditis se presenta en forma de casos esporádicos pero existen publicaciones sobre la ocurrencia de brotes locales de miocarditis asociados a incrementos en la circulación de agentes patógenos específicos (42, 43).

II. 3 Infecciones Respiratorias Agudas

II. 3. 1 Definición.

Se definen como un conjunto de enfermedades agudas (menos de 15 días de evolución) del tracto respiratorio causadas por un agente infeccioso transmitido de persona a persona (44).

II. 3. 2 Clasificación

Se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su localización y a la estructura anatómica que afectan:

➤ Infecciones del tracto respiratorio superior (ITRS). Refiriéndose a las que afectan la nariz, los senos paranasales, los oídos, las amígdalas, las adenoides, la faringe y la epiglotis.

Ejemplos: rinitis, sinusitis, otitis media, faringitis, adenoiditis, amigdalitis, epiglotitis, rinofaringitis, faringoamigdalitis, catarro común o Enfermedad tipo Influenza (ETI), entre otros.

➤ Infecciones del tracto respiratorio inferior (ITRI). Refiriéndose a las que afectan la laringe, la tráquea, los bronquios, los bronquiolos y el parénquima pulmonar y resultan ser graves en una proporción de los casos (45).

Ejemplos: laringitis, traqueítis, bronquitis, laringotraqueobronquitis, traqueobronquitis, bronquiolitis, neumonía y bronconeumonía (46) .

Otra clasificación muy utilizada está referida a la severidad de las IRA tomando en cuenta los parámetros clínicos presentes en los pacientes hospitalizados en las Unidades de Ciudadanos Intensivos (UCI) (47). Con relación a este aspecto, para hacer más uniforme la información resultante de la vigilancia de las IRA a nivel regional y detectar eventos epidemiológicos inesperados asociados a estas infecciones, el Programa regional de vigilancia de la Influenza de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha propuesto a los países emplear una definición única de Infección Respiratoria Aguda Grave (IRAG) adaptada del Programa global de vigilancia de la Influenza de la OMS:

➤ Caso de IRAG: Todo paciente \geq de 5 años de edad con aparición súbita de fiebre $\geq 38^{\circ}\text{C}$, tos, dolor de garganta, disnea o dificultad para respirar con necesidad de hospitalización y cuya etiología no está definida en el momento del ingreso (48).

Para evaluar la dificultad respiratoria, se utiliza la frecuencia respiratoria como parámetro:

- En adultos, se considera aumentada si la frecuencia respiratoria es mayor a 26 respiraciones por minuto.
- En los niños, de acuerdo con los criterios del Programa de Atención Integral a las Enfermedades Prevalentes en la Infancia (PAIEPI) de la OMS se considera aumentada la frecuencia respiratoria:
 - Antes de los 2 meses de edad: frecuencia respiratoria superior a 60 respiraciones por minuto,
 - 2 a 11 meses de edad: frecuencia respiratoria superior a 50 respiraciones por minuto,
 - 12 meses a 5 años de edad: frecuencia respiratoria superior a 40 respiraciones por minuto.

La definición de IRAG para los niños menores de 5 años se ha adoptado del PAIEPI de la OMS:

➤ Niño menor de 5 años en el que se sospeche clínicamente la presencia de neumonía y requiera de ingreso hospitalario (48).

II. 3. 3 Etiología

De acuerdo a la etiología existen dos tipos de clasificaciones de las IRA: a) por un lado las infecciones respiratorias bacterianas, virales, parasitarias y fúngicas; b) por otro se clasifican en específicas, refiriéndose a las infecciones causadas por un agente en particular, como la tosferina (causada por la *Bordetella pertussis*), la difteria (causada por el *Corynebacterium diphtheriae*), e inespecíficas refiriéndose a los síndromes clínicos que pueden ser ocasionados por diferentes agentes y son las más frecuentes (46).

Los patógenos principales causantes de las IRA son los virus. Una gran variedad de ellos están involucrados en su etiología y los más frecuentes se muestran en la tabla 3 (3).

Tabla 3. Virus más frecuentes causantes de IRA.

Familia viral	Virus
<i>Orthomyxoviridae</i>	influenza A, B y C
<i>Paramyxoviridae</i>	virus parainfluenza 1-4 (VPI), VSRH, MPVH
<i>Picornaviridae</i>	rinovirus (RV), enterovirus (EV)
<i>Adenoviridae</i>	AdVH
<i>Coronaviridae</i>	coronavirus humano OC43 (CoVH OC43), coronavirus humano 229E (CoVH 229E)
<i>Herpesviridae</i>	VEB, CMV

Fuente: Monto, 2002.

II. 3. 4 Diagnóstico

En la práctica médica, la sospecha de IRA viral está basada en la alta incidencia, los datos epidemiológicos, las manifestaciones clínicas y radiológicas, las particularidades del recuento de glóbulos blancos y de la forma leucocitaria, la evolución y la ausencia de respuestas favorables en aquellos casos con sospecha clínica de una posible infección bacteriana que han recibido antibióticos. Sin embargo, los signos y síntomas de estas infecciones no son patognomónicos. Un mismo síndrome clínico puede ser producido por más de un agente viral como se muestra en la tabla 4 (49).

Tabla 4. Síndromes clínicos y sus agentes virales causales más frecuentes.

Síndromes clínicos	Agentes virales
catarro común	RV, influenza, AdVH, coronavirus, VPI
faringitis	AdVH, VEB, EV
laringitis	VPI, AdVH, influenza,
traqueobronquitis	VPI, influenza, AdVH
bronquiolitis	VSRH, MPVH, RV, AdVH, influenza, VPI
neumonía	VSRH, influenza, AdVH, RV, MPVH, VPI

Fuente: Rodrigo y cols., 2004.

La identificación del agente etiológico requiere de su determinación por el laboratorio de microbiología. El diagnóstico seguro depende de varios factores:

- a) Tipo de muestra: en las ITRS las muestras idóneas son el exudado nasal y faríngeo (ENF) y el aspirado faríngeo. En cambio en las ITRI son las obtenidas por procedimientos invasivos [aspirado bronquial (AB), lavado broncoalveolar y cepillado bronquial] y el esputo. Las muestras de necropsia (tejido de pulmón) de los fallecidos a causa de una IRAG son indispensables para identificar el agente etiológico.
- b) Calidad de la muestra: la colecta debe realizarse tomando todas las medidas de asepsia y antisepsia para evitar contaminaciones y utilizar un medio de transporte específico para garantizar la viabilidad del agente.
- c) Agente etiológico: el tiempo de excreción viral, la respuesta inmune específica que induce, la carga viral, la capacidad para multiplicarse en los diferentes sistemas de asilamiento viral, varía para diferentes agentes.
- d) Embalaje seguro y transporte rápido en condiciones óptimas (4 °C) al laboratorio.
- e) La capacidad del laboratorio de disponer de herramientas diagnósticas sensibles y específicas para la identificación de un amplio espectro de agentes virales (50, 51).

El diagnóstico etiológico viral de las IRA puede llevarse a cabo directamente por la identificación del virus o por el reconocimiento de la respuesta específica del hospedero a la infección. El diagnóstico rápido puede

realizarse mediante la detección de antígenos (Ag) virales específicos directamente a partir de las muestras clínicas respiratorias empleando la inmunofluorescencia (IF) y los ensayos inmunoenzimáticos o la detección de su genoma mediante los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos como la RCP, RCP en tiempo real, secuenciación de ácidos nucleicos, entre otros (50). Actualmente se encuentran disponibles diferentes protocolos de dichos ensayos que permiten la detección simultánea de varios virus respiratorios en una mezcla de reacción, proporcionando el diagnóstico virológico en menos de 48 horas (52-54).

El aislamiento viral en uno o más de los sistemas biológicos existentes (cultivo celular, huevos embrionados y animales de experimentación) seguido de la identificación mediante las técnicas de fijación del complemento (FC), inhibición de la hemaglutinación (IH), IF, ensayos inmunoenzimáticos, neutralización y RCP constituye la prueba de oro para la identificación de los agentes cultivables. Por otra parte, la detección de Anticuerpos (Ac) específicos y sus niveles en el suero (monosueros o sueros pares), confirman la infección y aportan información sobre el tipo de infección y la etapa en que esta se encuentra. Entre las técnicas serológicas más empleadas se incluyen: IH, neutralización, FC, IF y los ensayos inmunoenzimáticos (55, 56).

II. 3. 5 Epidemiología

Según datos de la OMS, alrededor de cuatro millones de personas mueren cada año por IRA a nivel mundial, el 98% de ellas debido a las ITRI. Las tasas de mortalidad son elevadas en los lactantes, los niños entre 1 y 5 años de edad y los ancianos, principalmente en los países en vías de desarrollo. Del mismo modo, estas afecciones constituyen la causa más frecuente de consulta o admisión, particularmente en los servicios pediátricos (2).

Las IRA de etiología viral, poseen una distribución mundial tanto en forma endémica como epidémica. Son afecciones estacionales en las zonas templadas, con una incidencia máxima durante el otoño, el invierno e inicios de la primavera. En las zonas tropicales, suelen ser más frecuentes en los meses húmedos. Sin embargo, estos patrones pueden variar para los diferentes agentes (57).

Los virus respiratorios se diseminan entre los humanos por aerosoles, por el contacto directo con secreciones infectadas o contacto indirecto a través de fómites contaminados, y la inoculación posterior en la mucosa nasal, faríngea o conjuntival. Los virus que se excretan en las heces, como los EV y los AdVH, pueden transmitirse por vía fecal-oral. El período de incubación varía según el agente pero generalmente es corto (1-5 días).

La susceptibilidad a la infección es universal pero resultan más graves en los lactantes, los niños, los ancianos y las personas con alteraciones cardíacas, pulmonares o del sistema inmune (57).

II. 4 Adenovirus

II. 4. 1 Características generales

Los AdVH fueron descubiertos en el año 1953 a partir del tejido de adenoide extirpado quirúrgicamente y cultivado durante varias semanas (58). En los años siguientes se aislaron distintos serotipos de AdVH hasta llegar a los 51 serotipos descritos en la actualidad. Estos agentes pertenecen a la familia *Adenoviridae* la cuál está compuesta de cuatro géneros. Los AdVH capaces de infectar a los humanos pertenecen al género *Mastadenovirus*. Como miembros de este género están reconocidas seis especies de AdVH denominadas como AdVH humanos de la A a la F, y dos sub-especies B1 y B2 (tabla 5) (59, 60).

Tabla 5. Especies, sub-especies y serotipos de AdVH humanos.

Especie y sub-especie	Serotipos
A	12, 18, 31
B1	3, 7, 16, 21, 50
B2	11, 14, 24, 35
C	1, 2, 5, 6
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51
E	4
F	40, 41

Fuente: Wold William, 2007.

Son virus no envueltos con un diámetro entre 70 a 90 nanómetros (nm) y de simetría icosaédrica. La cápside esta compuesta de 252 capsómeros, 12 de los cuales constituyen pentonas y 240 hexonas. El núcleo está constituido por el complejo de la nucleoproteína. El genoma está representado por una simple molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena lineal de 35 kilobases (kb). Los determinantes antigénicos localizados en la superficie del virión poseen reactividad específica de tipo y están involucrados en la respuesta de Ac mediadores de la neutralización (hexonas), o de la inhibición de la hemaglutinación (fibras) (59).

II. 4. 2 Manifestaciones clínicas

Los AdVH se distinguen clínicamente del resto de los virus respiratorios en que pueden afectar a múltiples órganos distintos del aparato respiratorio, produciendo conjuntivitis, gastroenteritis, hepatitis, miocarditis, cistitis hemorrágica aguda y meningoencefalitis, tanto en personas inmunocompetentes como en pacientes inmunocomprometidos (59, 61).

Aproximadamente, el 50% de las infecciones causadas por los AdvH en la población general son asintomáticas durante épocas no epidémicas. En los pacientes inmunocompetentes se caracterizan por ser leves y autolimitadas. Sin embargo, algunas investigaciones recientes demuestran cambios importantes con relación a las infecciones sintomáticas por los AdvH, incluyendo alteraciones en su distribución geográfica (18, 19, 62).

Los diagnósticos clínicos más frecuentes son conjuntivitis, ITRS e ITRI. Según datos de la literatura médica hasta el 7% de las neumonías que requieren ingreso son atribuidas a los AdvH (61, 63). La fiebre faringoconjuntival que afecta principalmente a los niños es la afección clínica por AdvH mejor descrita. Aparece en brotes pequeños en los meses de verano y se caracteriza por fiebre, conjuntivitis, faringitis, rinitis y adenitis cervical. En su etiología se implica fundamentalmente al serotipo 3 de la sub-especie B1 (64).

Los AdvH de la especie D, serotipos 8, 19 y 37 son los agentes causales de la queratoconjuntivitis epidémica que afecta a la población adulta a nivel mundial (65). Esta especie resulta ser la mayor en cuanto al número de serotipos que la integran y son la causa más frecuente de infecciones sistémicas en los pacientes inmunocomprometidos (66, 67).

II. 4. 3 Diagnóstico

En ausencia de un brote característico, las infecciones por los AdvH son indistinguibles de las producidas por otros patógenos. Entre las técnicas para el diagnóstico de la infección por los AdvH se encuentran: la detección directa de Ag, la microscopía electrónica, el aislamiento viral, los ensayos de detección del ADN viral y las técnicas serológicas (68).

La IF utilizando Ac monoclonales contra la proteína del hexon presente en las células infectadas de las muestras de ENF, AB y otras, constituye uno de los métodos de diagnóstico rápido más empleado, pero posee la desventaja de ser menos sensible que el aislamiento viral y los ensayos de RCP (69). La microscopía electrónica permite reconocer a los AdvH por su morfología característica y se utiliza principalmente en el diagnóstico de las infecciones entéricas (70).

La RCP es una técnica altamente sensible y específica y permite obtener un diagnóstico rápido. Diversos ensayos de RCP cualitativo se emplean para el diagnóstico de las IRA causadas por los AdvH; sin embargo la gran sensibilidad de los mismos permite detectar el ácido nucleico por períodos prolongados y dificulta la interpretación clínica de este resultado (71, 72). Los sistemas de RCP en tiempo real cuantitativos, son de utilidad para la detección y el monitoreo de las infecciones por los AdvH en los pacientes inmunocomprometidos (73). La secuenciación nucleotídica de segmentos de la proteína del hexon, el penton

o la fibra, permiten caracterizar molecularmente las diferentes especies, sub-especies y serotipos de AdVH existentes (74, 75).

Los AdVH pueden ser aislados en diferentes líneas celulares a partir de las muestras de heces, secreciones del tracto respiratorio superior e inferior, exudado conjuntival, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre total y biopsias del tejido infectado. Al igual que en otras infecciones virales, la colecta de la muestra en los inicios de la enfermedad proporciona mayores posibilidades de recobrado viral, aunque la excreción viral puede prolongarse hasta una semana en las infecciones respiratorias y dos semanas en las infecciones conjuntivales o en la fiebre faringoconjuntival (59).

La infección induce una respuesta de inmunoglobulinas de tipo IgG e IgM específica. El uso de los ensayos para la detección de Ac IgM no es frecuente, debido a que en una proporción significativa de los casos los niveles de IgM no son detectables. El diagnóstico retrospectivo de la infección puede realizarse mediante la demostración de la seroconversión o el incremento de cuatro veces del título de Ac de un segundo suero colectado en la fase de convalescencia con respecto al primer suero colectado en la fase aguda de la infección. Dentro de los ensayos que pueden ser utilizados con este objetivo están la FC, la IF, la IH, la neutralización y los ensayos inmunoenzimáticos (59).

II. 4. 4 Epidemiología

Los AdVH poseen distribución mundial. Debido a la resistencia a diversos agentes físicos y químicos pueden transmitirse fácilmente a través del contacto directo o indirecto, a través del agua u objetos contaminados y secreciones respiratorias. Su estabilidad a pH bajo (como el existente en las secreciones gástricas) permite su transmisión por la vía fecal-oral (59, 76).

La susceptibilidad a las infecciones por estos agentes es universal pero las infecciones severas son frecuentes en hospederos inmunocomprometidos (pacientes con sida, transplantados, pacientes con cáncer), pacientes con antecedentes de enfermedades crónicas y en los niños menores de 5 años de edad (77, 78).

Las infecciones por los AdVH pueden ser esporádicas, endémicas y epidémicas, ocurriendo durante todo el año pero con picos de incidencia durante el invierno, primavera e inicios del verano en gran parte de los países (76). La mayoría de las infecciones ocurren durante la infancia y producen inmunidad específica de serotipo (79). En las comunidades cerradas pueden ocurrir brotes de ITRS e ITRI, principalmente en unidades militares, escuelas y campamentos de verano (77, 80, 81).

II. 5 Virus sincitial respiratorio humano

II. 5. 1 Características generales

El VSRH pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*, género *Pneumovirus* para el cual se han identificado los subgrupos A y B. Es un virión pleomórfico o esférico con un diámetro de 150 a 300 nm, un genoma compuesto por ácido ribonucleico (ARN) de polaridad negativa, lineal y no segmentado de 16 a 20 kb, que se encuentra en el interior de una nucleocápside helicoidal (82).

II. 5. 2 Manifestaciones clínicas

El VSRH es capaz de causar ITRS e ITRI. La infección primaria se produce entre las 6 semanas y los 2 años de vida y con frecuencia es sintomática, aunque el espectro de las manifestaciones clínicas varía desde una infección leve de las vías respiratorias altas a una bronquiolitis o neumonía grave. La reinfección en los niños, los adultos y los ancianos es frecuente debido a que la inmunidad de mucosa es incompleta y de corta duración (83). En la actualidad se considera a este patógeno como el causante del 50% al 90% de las hospitalizaciones por bronquiolitis, del 5% al 40% de las neumonías y de un 10% a un 30% de los cuadros de traqueobronquitis en los niños menores de 5 años de edad (84).

La bronquiolitis es la manifestación más conocida de la infección por el VSRH debido a su impacto en los lactantes. En general, se caracteriza por un breve periodo prodrómico con síntomas respiratorios de las vías altas, seguido de sibilancia, 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 requerir hospitalización de duración variable (85). Los lactantes con enfermedad cardíaca o respiratoria de base son susceptibles a padecer formas severas de la infección e ingreso en la UCI. Los niños y adultos inmunocomprometidos también son vulnerables a la infección por el VSRH y en este tipo de pacientes la mortalidad es alta (86).

II. 5. 3 Diagnóstico

El método más usado para detectar Ag del VSRH en muestras clínicas respiratorias es la IF, aunque los ensayos inmunoenzimáticos también se utilizan con esta finalidad (87). El virus puede ser aislado en cultivo celular empleando líneas celulares heteroploides como las células de línea de carcinoma laríngeo (Hep-2) o las células epiteliales humanas de carcinoma cervical (HeLa), en las cuales produce un efecto citopático (ECP) generalmente después de 3 a 5 días de la inoculación, caracterizado por la formación de sincitios. Los métodos de TR-RCP se introdujeron en la práctica para el diagnóstico y la vigilancia de este agente. La variante de TR-RCP múltiple y TR-RCP en tiempo real es actualmente la herramienta más utilizada para el diagnóstico del

VSRH (88, 89). El diagnóstico serológico es el menos usado pero resulta útil en la identificación retrospectiva de las infecciones por el VSRH (90).

II. 5. 4 Epidemiología

Las infecciones por el VSRH continúan siendo uno de los problemas de salud más importantes en la infancia a nivel mundial por su elevada frecuencia (46). Los humanos son la única fuente de infección del virus, y el mismo se disemina por contacto directo con secreciones respiratorias de los individuos infectados o indirectamente, mediante el contacto con objetos o superficies contaminadas. La transmisión intrahospitalaria a partir del personal sanitario infectado, que con frecuencia es asintomático, es frecuente (85).

Posee un patrón estacional definido en las zonas templadas, donde las epidemias ocurren anualmente y tienen lugar durante los meses de invierno (pico máximo de noviembre a enero) e inicios de la primavera, pero nunca en verano. Sin embargo, el aislamiento ocasional del VSRH durante los meses de verano, hace pensar que este virus está presente en la comunidad durante todo el año (91). En las zonas tropicales, se detecta un incremento marcado de la circulación del VSRH durante los meses cálidos y las epidemias ocurren en los meses de lluvia (92).

II. 6 Metapneumovirus humano

II. 6. 1 Características generales

En el año 2001, investigadores holandeses aislaron un virus previamente no identificado, a partir de muestras respiratorias de 28 niños con síntomas de infección respiratoria, 27 de ellos menores de 5 años de edad. La identidad de este agente nuevo era desconocida, pero el hallazgo de filamentos similares a partículas virales en la microscopía electrónica, sugería la presencia de un virus. Este agente era capaz de producir infecciones respiratorias en animales de experimentación y podía ser recuperado de los mismos. Sin embargo, las técnicas de IF y RCP para los virus respiratorios conocidos, no conseguían identificarlo. Finalmente, mediante una RCP empleando cebadores que se unen al azar a secuencias inespecíficas del ADN detectaron una secuencia genética única no similar a ninguno de los virus conocidos. Al nuevo agente se le identificó como miembro de la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*, género *Metapneumovirus* y se denominó metapneumovirus humano (8).

La partícula viral es muy similar a la del VSRH, posee forma de esfera ó pleomórfica y filamentosa con un diámetro que oscila entre 150 nm a 600 nm. Es un virus envuelto con proyecciones o espículas en su superficie. El genoma está compuesto por ARN de polaridad negativa, lineal, no segmentado y

aproximadamente 2 kb más corto que el del VSRH pues carece de los genes que codifican para las proteínas no estructurales NS1 y NS2 (82, 93).

El genoma codifica para 9 proteínas: glicoproteína de fusión (F), glicoproteína G de unión (G), proteína pequeña hidrofóbica (SH), proteína de la matriz (M), nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), polimerasa viral (L) y las proteínas M2-1 y M2-2. La proteína F es el determinante antigénico principal, inductora de la respuesta inmune neutralizante y protectora contra los dos grupos genéticos de este virus. Se conoce que el MPVH posee un solo serotipo con dos genotipos A y B que a su vez se subdividen en varios subgenotipos (A1, A2a, A2b y B1, B2) en función de las secuencias de los genes que codifican para las proteínas P, F y G. Frente a estos genotipos existen protección y reactividad cruzada (93).

II. 6. 2 Manifestaciones clínicas

El MPVH es un agente causal de IRA adquirida en la comunidad en los lactantes, niños y adultos (94). El mismo es la causa de ITRS e ITRI con sintomatología variada; en el rango de una infección subclínica a neumonía severa. En los lactantes y niños menores de 2 años es considerado el segundo agente etiológico de bronquiolitis y neumonía después del VSRH (95, 96).

Las infecciones severas ocurren en pacientes inmunocomprometidos (97). Sin embargo, en niños mayores de 2 años y adultos saludables, la infección por el MPVH se presenta generalmente como una ITRS sin fiebre. En los ancianos con enfermedades crónicas, se presentan cuadros respiratorios graves (98). Actualmente se plantea que la infección por el MPVH puede tener un papel en la exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en los adultos y las crisis de asma en los niños (99, 100). La coinfección por el MPVH y el VSRH es frecuente y se asocia a la IRAG (101, 102).

II. 6. 3 Diagnóstico

La multiplicación *in vitro* del MPVH es compleja, depende de la presencia de tripsina y puede demorar entre 14 a 21 días la observación del ECP característico (formación de sincitios); a lo que se le atribuye la identificación tardía de este nuevo agente, a pesar de demostrarse que ha estado circulando desde hace más de 40 años (8). La detección rápida de Ag del MPVH en las muestras clínicas mediante IF también es utilizada en los laboratorios de diagnóstico (103).

Las pruebas serológicas (ensayos inmunoenzimáticos e IF) permiten un diagnóstico retrospectivo y se utilizaron para conocer la prevalencia de la infección por el MPVH en varios países (104, 105).

Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos como la TR-RCP convencional y la TR-RCP en tiempo real constituyen los métodos diagnósticos más empleados para detectar la infección por el MPVH. Los genes

de las proteínas M, P, F y L son los de elección para el diseño de los juegos de cebadores empleados en dichos ensayos, debido al mayor porcentaje de identidad nucleotídica entre los 5 subgenotipos existentes (106-108).

II. 6. 4 Epidemiología

Posterior al descubrimiento del MPVH en el año 2001, se demostró que este agente es un patógeno humano distribuido mundialmente (109-111). El perfil epidemiológico de las infecciones por el MPVH es similar al de las infecciones por el VSRH. Las mismas se detectan en todas las edades, con la ocurrencia de las formas más severas en los niños menores de dos años, en pacientes inmunocomprometidos y en los ancianos. La incidencia de estas infecciones oscila entre un 5% a un 10 % en niños hospitalizados por IRA, y de un 12% a un 20% en pacientes ambulatorios, por lo que este patógeno tiene un papel importante en la etiología de las IRA (112, 113).

Las infecciones primarias por el MPVH suelen ocurrir en edades tempranas (2 primeros años de vida), y varios estudios de seroprevalencia muestran que el 100% de los niños a la edad de 10 años se infectaron con el MPVH (104, 114, 115). El período de incubación se estimó en de 4 a 6 días basado en un evento de transmisión simple, aunque es necesario realizar más estudios para definir este intervalo de tiempo. Las vías de transmisión del MPVH son similares a las descritas para el VSRH (112).

Estas infecciones poseen una distribución estacional en regiones templadas muy similar al VSRH (116). Durante las estaciones de primavera y verano en Hong Kong ocurrieron brotes de infección por este agente (117). Aunque muchos estudios limitan la vigilancia a la temporada respiratoria típica, algunos reportes sugieren que el MPVH pudiera estar circulando durante todo el año con alzas en determinados períodos (112, 118).

II.7 Bocavirus humano

II. 7. 1 Características generales

El BoVH se identificó por primera vez en muestras clínicas respiratorias de pacientes con diagnóstico de IRA en el año 2005, mediante un procedimiento basado en la amplificación del ADN al azar, seguido del clonaje molecular y la posterior secuenciación nucleotídica. Las secuencias obtenidas permitieron identificar al virus como un agente nuevo con una gran homología con los dos únicos miembros del género Bocavirus de la familia *Parvoviridae*: el virus diminuto canino y el parvovirus bovino. A este agente se le nombró bocavirus humano (12).

El BoVH se caracterizó como un miembro de la familia *Parvoviridae*, subfamilia *Parvovirinae*, género Bocavirus. Es un virus pequeño, no envuelto, con una nucleocápside icosaédrica y un diámetro de 18 a 26

nm. Su genoma tiene un tamaño de 5 299 nucleótidos y consta de una sola molécula de ADN lineal de polaridad positiva. Está organizado en tres marcos de lectura abiertos, dos de ellos codificadores de dos proteínas no estructurales (NS-1 y NP-1) y el otro codifica para las dos proteínas de la cápside viral (VP1 y VP2) (12, 119).

II. 7. 2 Manifestaciones Clínicas

A partir del estudio inicial donde el BoVH se detectó como el agente más frecuente en muestras negativas a otros virus respiratorios y procedentes de pacientes con ITRS e ITRI, otros investigadores publicaron sobre la frecuencia elevada de coinfecciones entre el BoVH y otros virus respiratorios y su detección en pacientes asintomáticos (120-122). Existen controversias sobre el papel patogénico del BoVH debido a la imposibilidad de comprobar los postulados de Koch por la ausencia de un sistema de cultivo *in vitro* y un modelo animal para su identificación. No obstante, en varios estudios, el BoVH se detectó como el único agente infeccioso en enfermedades del tracto respiratorio superior (rinitis, rinofaringitis) e inferior (bronquiolitis, neumonía) y en pacientes con exacerbaciones de las crisis de asma, episodios de sibilancia, descompensaciones de la EPOC, entre otros diagnósticos (123-125).

En la actualidad se plantea que las manifestaciones clínicas respiratorias atribuibles a la infección por el BoVH son indistinguibles de las producidas por el VSRH y el MPVH, aunque la severidad de las infecciones suele ser menor (126, 127).

Por último, se detectó el genoma de BoVH en las muestras de heces de pacientes con gastroenteritis. Sin embargo, son necesarias investigaciones adicionales para esclarecer su papel en la etiología de esta enfermedad (128-130).

II. 7. 3 Diagnóstico

Hasta el momento no existe un sistema de cultivo celular *in vitro* para la multiplicación del BoVH. El diagnóstico de la infección por este virus está basado fundamentalmente en la detección del genoma viral presente en las muestras respiratorias, suero y heces, usando diferentes técnicas de RCP que emplean juegos de cebadores específicos para la amplificación de un segmento de los genes de las proteínas NP1, NS1 y VP1/VP2 del virus (131, 132). Varios autores publicaron estudios sobre la detección de Ac específicos contra las proteínas de la cápside VP1 y VP2 del BoVH en muestras de suero empleando ensayos inmunoenzimáticos (133, 134).

II. 7. 4 Epidemiología

El primer estudio sobre el BoVH mostró una prevalencia de la infección de 3.1% en niños suecos con IRA (12). Posteriormente, el virus se detectó en pacientes con IRA en diferentes países de Europa, Asia, África, América y Australia (135-137).

El BoVH produce IRA con una mayor frecuencia en niños entre seis meses y 2 años de edad (119, 124, 138). Un estudio de seroprevalencia realizado en Japón mostró la presencia de Ac específicos contra el BoVH en el suero de personas con edades comprendidas entre niños menores de 1 año y 41 años. La seroprevalencia fue menor en el grupo de 6 a 8 meses de edad (139).

Hasta el momento se desconoce la vía de transmisión del BoVH. No obstante, es de esperar que como el número de copias de este virus es elevado en las secreciones del tracto respiratorio, la transmisión pudiera ocurrir muy similar a la del resto de los virus respiratorios. Se conoce además, que el genoma del BoHV es detectado en las heces de niños con gastroenteritis aguda, por lo que la transmisión de este virus pudiera ocurrir también por la vía fecal-oral (122, 130).

Los primeros estudios evidenciaron que el BoVH circula con un predominio en los meses de otoño y comienzo del invierno, aunque en algunos países puede extenderse hasta la primavera y en otros como Corea se detectó una alta incidencia al finalizar la primavera y en los meses de verano (135-137). A pesar de los numerosos estudios publicados, la verdadera prevalencia y estacionalidad de la infección primaria por el BoVH todavía no está esclarecida (119, 122).

II. 8 Virus influenza

II. 8. 1 Características generales

Los virus influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Los miembros de esta familia son virus envueltos y se dividen en 5 géneros de acuerdo a su estructura genómica y diferencias antigénicas en el gen de la nucleoproteína (NP) y el de la proteína de la matriz (M): género virus influenza A, género virus influenza B, género virus influenza C, género del virus Thogoto y género del virus Isa. Los géneros de los virus influenza A, B y C tienen como principal reservorio al ser humano. Sin embargo, el género de los virus influenza A está presente en varias especies de animales como aves, cerdos, caballos, perros, gatos, ballenas y focas, constituyendo, sobre todo las aves, la fuente de los nuevos subtipos humanos. Este último género se clasifica en subtipos, en base a la variabilidad antigénica de las dos glicoproteínas localizadas en la superficie de la partícula viral: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). Actualmente se conocen 16 subtipos de

HA denominados H1 a la H16, y 9 de NA, llamados N1 a la N9. Los virus influenza B y C poseen un solo tipo de HA y NA (140).

Las partículas virales son envueltas, pleomórficas, con formas que van desde esféricas hasta filamentosas. Tienen un diámetro entre 80 nm y 120 nm y simetría helicoidal. Tres proteínas virales HA, NA y M2 se encuentran insertadas en la bicapa lipídica, proyectándose las dos primeras a manera de espículas a partir de la superficie. Formando una capa por debajo de la envoltura se encuentra la proteína M1, la cual mantiene una estrecha relación tanto con la propia envoltura como con el complejo de la ribonucleoproteína, el cual está integrado por la NP, que a su vez empaqueta el genoma viral y el complejo de la polimerasa constituido por las proteínas polimerasa básicas 1 y 2 (PB, PB2) y la proteína polimerasa ácida (PA) (140, 141).

El genoma viral está constituido por una molécula de ARN única, segmentada (8 segmentos para los virus influenza A y 7 segmentos para los virus influenza B y C) con polaridad negativa y una longitud aproximada de 10 kb-13 kb. Codifica para al menos 11 proteínas; 8 de las cuales son estructurales y tres son no estructurales: NS1, NS2 y NEP (siglās del inglés, nuclear export protein) (tabla 6) (140, 141).

Tabla 6. Segmentos del genoma de los virus influenza A.

Segmento del genoma	Longitud en pares de bases (pb)	Proteína que codifica
1	2341	PB2
2	2341	PB1
3	2233	PA
4	1778	HA
5	1565	NP
6	1413	NA
7	1027	M1 - M2
8	890	NS1 - NS2/NEP

Fuente: Palese P y Shaw M, 2007

La HA es el determinante antigénico principal del virus e induce la producción de Ac neutralizantes. Las funciones principales de esta glicoproteína son el reconocimiento y la fijación al receptor celular, además de la fusión de membranas durante la penetración. La respuesta inmune dirigida contra esta molécula, establece una presión selectiva, que impulsa constantemente la aparición de variantes nuevas, resultando en cepas virales nuevas (142).

Los virus influenza se replican mayormente en las células epiteliales superficiales del tracto respiratorio alto y bajo, pero también pueden afectar a otras células del sistema respiratorio, como las células alveolares, las células de las glándulas mucosas y los macrófagos (141). La infectividad de los virus influenza es afectada por dos parámetros concenientes al receptor: la especie de ácido siálico (N-acetilneuramínico [NeuAc] o N-Glicolilneuramínico [NeuGc]) y el tipo de enlace que lo une a la galactosa, que puede ser α 2,6 o α 2,3. Los virus influenza humanos reconocen preferentemente el ácido siálico NeuAc unido a la galactosa mediante el enlace α 2,6, que predomina en las células epiteliales del tracto respiratorio alto, mientras que los virus influenza aviares y equinos muestran mayor afinidad por el ácido siálico con un enlace α 2,3, aunque sus tejidos expresan ambas especies de ácido siálico (NeuAc y NeuGc) (143).

Las células epiteliales de la tráquea del cerdo contienen ambos tipos de ácido siálico y ambos enlaces lo que explica la susceptibilidad de estos animales a uno u otro grupo de virus. Debido a esto, se plantea que actúan como “recipientes mezcladores” propiciando el reordenamiento genético entre virus de diferentes especies lo que les confiere un papel determinante en el origen de los virus de influenza pandémica (144, 145).

II. 8. 2 Manifestaciones Clínicas

Los virus influenza son los agentes causales de la enfermedad infecciosa aguda de las vías respiratorias conocida como Influenza, gripe o catarro común (146, 147). La presentación clínica puede variar en las distintas edades. En niños pequeños es inespecífica, acompañándose de fiebre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ con mayor frecuencia que otras infecciones víricas y siendo éste a veces el único síntoma, sobre todo en los lactantes menores de 6 meses (148). Otros síntomas habituales en los niños pequeños son tos no productiva, rinitis y malestar general, pudiendo asociarse a irritabilidad, vómitos, letargia, dificultad respiratoria, disnea y episodios de apnea (149).

También puede presentarse como una ITRS afebril en los niños menores de 2 años de edad y en otras ocasiones puede manifestarse como cuadros de laringotraqueobronquitis, bronquitis o bronquiolitis (indistinguibles del cuadro clínico ocasionado por el VSRH u otros agentes) (150, 151). Todos estos síntomas son inespecíficos por lo que el diagnóstico definitivo de la infección por los virus influenza se realiza en los laboratorios de microbiología (152).

La infección por los virus influenza en los adolescentes y adultos se presenta habitualmente con un inicio brusco de fiebre ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), escalofríos, cefalea, mialgia, artralgia, odinofagia, tos seca y malestar general. La fiebre puede durar de 1 a 3 días aunque puede prolongarse hasta 5 días (153).

La OMS en su Programa Global para la vigilancia de la Influenza ha propuesto una definición clínica de la enfermedad que se conoce como Enfermedad tipo Influenza (ETI) e incluye los siguientes criterios:

- Aparición súbita de fiebre $\geq 38^{\circ}\text{C}$
- Tos o dolor de garganta
- Ausencia de otras causas (46).

La ETI puede ser producida por varios agentes virales por lo que es necesario la identificación específica a nivel de los laboratorios de microbiología hospitalaria o los LNR reconocidos por la OMS como Centros Nacionales de Influenza (CNI). Estos últimos son los principales contribuyentes al conocimiento de la circulación esporádica, epidémica o pandémica de los virus influenza y otros virus respiratorios (46).

Las complicaciones asociadas a la infección por los virus influenza pueden clasificarse en pulmonares y extrapulmonares. Las complicaciones pulmonares son las más frecuentes y están representadas por la neumonía viral primaria, la neumonía bacteriana que sigue a la ITRS y la neumonía mixta (viral-bacteriana). La neumonía mixta es la más común y severa de las tres. El diagnóstico dependerá, de los hallazgos del laboratorio clínico y microbiológico además de los exámenes radiográficos (154, 155).

Otras complicaciones menos frecuentes son las extrapulmonares y dentro de ellas se encuentran: la encefalitis, el síndrome de Reyé, el síndrome de Guillain-Barré, la mielitis transversa, la miocarditis, la miositis, entre otras (156).

Los mayores índices de morbilidad y hospitalización atribuibles a la Influenza se presentan en las edades extremas de la vida, pero la mortalidad alcanza casi el 90% en individuos por encima de los 65 años de edad. La infección resulta más severa en los pacientes con enfermedad crónica subyacente (asma, EPOC, diabetes, cardiopatía, etc.). Otros factores de riesgo son: la obesidad, el hábito de fumar, la inmunosupresión y el embarazo (157-159).

II. 8. 3 Diagnóstico

Está basado en la demostración de la presencia del virus o sus Ag en las células infectadas; el aislamiento y su tipificación; así como la detección de seroconversión mediante los ensayos de inmunoserodiagnóstico (142).

La IF es el método de diagnóstico rápido más empleado por los LNR debido a su menor costo, y a la disponibilidad de numerosos estuches comerciales (69, 160).

El aislamiento viral mediante cultivo celular es una técnica muy sensible, con la ventaja de que permite la posterior caracterización antigénica, genética y el desarrollo de pruebas de susceptibilidad a los antivirales. Para los virus influenza humanos se recomienda realizar este proceder en los laboratorios de microbiología con nivel II de seguridad biológica (161).

Existen dos sistemas biológicos susceptibles para realizar el aislamiento de los virus influenza: los cultivos celulares y los huevos embrionados (162). Aunque el aislamiento en cultivo celular (con la subsiguiente identificación del virus por técnicas inmunológicas o genéticas) constituye la prueba de oro para el diagnóstico virológico, los procedimientos para la obtención del aislamiento de los virus influenza requieren un promedio de 5 días lo que limita su beneficio desde el punto de vista clínico y epidemiológico. Similar inconveniente presenta el aislamiento en huevos embrionados, sin embargo, tiene utilidad para la producción anual de vacunas. Este procedimiento para los virus influenza considerados con potencial pandémico, como el virus influenza aviar A (H5N1) u otros, requiere de un laboratorio de nivel III de seguridad biológica (161).

Desde el año 1977, dos subtipos del virus influenza A [A (H3N2) y A (H1N1)] cocirculan en las poblaciones humanas alrededor del mundo, y varios eventos locales de casos humanos infectados por los virus influenza A de origen aviar o porcino se notificaron desde el año 1997 hasta la actualidad (163-165). A esto se le adiciona la circulación frecuente en humanos de dos linajes antigénicos y genéticamente diferentes de los virus influenza B (166, 167). Esta cocirculación de los múltiples tipos y subtipos de los virus influenza ocasiona algunas dificultades para el diagnóstico y la identificación mediante los ensayos de IF disponibles y el aislamiento viral. Por esta razón, los ensayos de diagnóstico molecular para la detección de los virus influenza A y B en las muestras respiratorias o la identificación de un aislamiento, constituyen las herramientas más sensibles para la vigilancia e investigación de eventos inusuales atribuibles a los virus influenza (161, 168).

La mayoría de los ensayos de diagnóstico molecular que se emplean para los virus influenza se basan en la amplificación del ácido nucleico viral. Entre estos se encuentran los ensayos de TR-RCP, TR-RCP múltiple, TR-RCP en tiempo real, microarreglos de ADN y secuenciación nucleotídica (169, 170). Los cebadores empleados en los mismos que amplifican segmentos del genoma altamente conservados que codifican para las proteínas NP y M, permiten la identificación de los tipos específicos del virus (influenza A, B y C), mientras que los dirigidos a las regiones altamente variables del genoma que codifican para las glicoproteínas HA y NA, se emplean para establecer el subtipo del virus influenza A (161, 171).

II. 8. 4 Epidemiología

La epidemiología de los virus influenza está definida en gran medida por la variación antigénica constante del virus, lo cual le permite evadir la respuesta inmune del hospedero. Existen dos mecanismos que explican dicha variación antigénica y que le permiten a este virus reinfectar humanos y causar enfermedad: el cambio antigénico menor o deriva antigénica y el cambio antigénico mayor o salto antigénico. El primero de ellos ocurre como consecuencia de mutaciones espontáneas y puntuales que continuamente van apareciendo en el genoma de los virus influenza A y B, resultado de errores durante la actividad de la polimerasa viral y la

ausencia de su actividad correctora. Estos cambios pequeños van acumulándose gradualmente, sobre todo en las proteínas HA y NA, debido a la intensa presión que sobre dichas proteínas ejerce el sistema inmune, lo que permite la selección de mutantes que escapan a la acción de los anticuerpos neutralizantes preexistentes, capaces de afectar a los individuos parcialmente inmunes. Las variaciones que se producen como consecuencia de los cambios antigénicos menores son la causa principal de las epidemias anuales, lo que hace necesario revisar y actualizar anualmente la composición de la vacuna contra los virus influenza. Las variantes resultantes de este mecanismo, típicamente prevalecen por 2 a 5 años antes de ser reemplazadas (142, 172).

El salto antigénico consiste en un cambio mayor dentro de los virus influenza A, produciendo una nueva HA y ocasionalmente también una nueva NA que da origen a un nuevo subtipo del virus influenza A. Además, los cambios pueden ocurrir en un subtipo ya circulante, pero con una combinación de HA y NA provenientes de un reservorio animal, diferente de los subtipos que afectan a los humanos, por lo que la mayoría de las personas no tiene inmunidad frente a él y son susceptibles a enfermarse por el nuevo virus. La propagación y la gravedad de la infección son mayores y dan lugar a una pandemia, evento sanitario de mayor impacto social y económico. Los cambios antigénicos mayores son el resultado del reordenamiento genético entre virus humanos con virus aviáres o porcinos. El más frecuente ocurre entre virus aviáres y humanos, y ocasionó tres pandemias en el siglo XX (173, 174).

La primera pandemia reconocida es la llamada “Gripe española” que ocurrió entre el año 1918 a 1919 producida por un virus influenza A (H1N1) de origen aviar. La misma es considerada la de mayor impacto sanitario, social y económico en la historia de esta enfermedad y ocasionó entre 20 y 50 millones de muertes (175). La segunda, emergió en febrero del año 1957 en Guizhou, provincia de China y se le conoce como “Influenza Asiática”. El subtipo viral fue caracterizado como virus influenza A (H2N2) y se originó como consecuencia del reordenamiento genético entre virus humanos y aviáres del linaje Eurasiático (176). Dicho virus circuló en todo el mundo hasta el año 1968, cuando fue a su vez desplazado por el subtipo H3N2, resultante también del reordenamiento entre virus humanos y aviáres que ocasionó la tercera pandemia (177). Desde este momento, se han mantenido circulando en la población humana ocasionado las epidemias anuales, los virus influenza estacionales: influenza A (H1N1), A (H3N2) y el virus influenza B (178).

En marzo del año 2009, un brote inusual de enfermedad respiratoria se notificó en México y Estados Unidos. El agente causal se identificó como un virus influenza A (H1N1) de origen porcino. El origen del nuevo virus resultó de cuatro eventos de recombinaciones de segmentos de genes de virus de influenza porcina, aviar y humana; pero la mayor proporción de los genes derivaron de virus de influenza porcina (179). El 25 de abril la

Directora General de la OMS declaró Emergencia de Salud Pública de preocupación internacional por la identificación de la circulación en humanos de un virus influenza nuevo (180).

El período de incubación para los virus influenza estacionales es de 1 a 3 días y el período de transmisibilidad ocurre desde el período de incubación hasta 3 a 5 días a partir del inicio del cuadro clínico en los adultos. En los niños menores de 5 años de edad puede extenderse hasta 7 días. Una sola persona infectada puede transmitir el virus a través del contacto directo mediante pequeñas gotitas aerosolizadas al estornudar, toser e incluso durante el hablar y respirar, a un gran número de individuos susceptibles y extenderse rápidamente la infección. También es posible la transmisión a través del contacto indirecto mediante fómites contaminados con secreciones respiratorias de individuos enfermos similar a otros virus respiratorios (178).

En los climas templados las infecciones por los virus influenza tienen un marcado carácter estacional. En estas áreas, el virus circula a bajos niveles a lo largo del año, con un incremento durante los meses de invierno (en el hemisferio Norte de noviembre a marzo y en el hemisferio Sur de abril a septiembre). En el trópico, la circulación de los virus influenza es menos definida y aunque las infecciones esporádicas o los brotes por estos agentes pueden aparecer durante todo el año, se asocian los picos de incidencia mayor con la temporada de lluvias. Estos picos están relacionados con índices elevados de ausentismo escolar y laboral, altas tasas de consultas médicas por IRA y de hospitalización en los niños menores de 5 años, sólo superadas por las del grupo de ancianos mayores de 85 años (146, 181, 182).

II. 9 Diagnóstico Molecular

Los métodos moleculares de diagnóstico que permiten la detección de ácidos nucleicos, están basados en la búsqueda y el reconocimiento del genoma viral en la muestra clínica o en el cultivo viral. La mayoría de los que se emplean en el diagnóstico de los virus respiratorios emergentes se basan en los ensayos de amplificación de un segmento de un gen que codifica para alguna de las proteínas virales: RCP y TR-RCP simple, TR-RCP múltiple, TR-RCP en tiempo real y secuenciación nucleotídica (50, 183, 184).

II. 9. 1 Reacción en Cadena de la Polimerasa

La RCP es el prototipo de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. La misma se basa en el empleo de pequeños oligonucleótidos denominados cebadores y una enzima ADN polimerasa termoestable capaz de amplificar el segmento delimitado por los cebadores, que suele ser de 100 a 1000 pares de bases (pb) de longitud. El proceso transcurre en 25 a 40 ciclos, cada uno consistente en tres pasos que ocurren a diferentes temperaturas: desnaturalización del ADN, alineamiento o fijación de los cebadores al molde del ADN y extensión de la cadena del ADN. Este es realizado en un equipo automático llamado termociclador que

controla los ciclos y su tiempo a las diferentes temperaturas. Como la ADN polimerasa solo utiliza ADN como molde, la detección de los virus con genoma de ARN, requiere la inclusión de un paso previo de transcripción reversa, mediante la enzima transcriptasa reversa (TR), desarrollándose el ensayo de amplificación denominado TR-RCP. La detección final de los productos de amplificación puede ser realizada mediante diferentes formas aunque la más utilizada es la electroforesis en gel de agarosa (56).

Sobre estas plataformas se han desarrollado las RCP secuenciales (RCP anidada) que consiste en la aplicación de una segunda RCP sobre el producto de una primera reacción de amplificación. La misma permite aumentar la especificidad y la sensibilidad del ensayo con respecto a otras técnicas como la RCP simple, el cultivo celular, la inmunofluorescencia y los ensayos inmunoenzimáticos (185).

La RCP posee entre sus ventajas que permite obtener resultados en un tiempo menor con mayor sensibilidad, no requiere de la presencia de virus viables y permite la detección de varios agentes en una sola reacción empleando múltiples juegos de cebadores a través de los sistemas de RCP y TR-RCP múltiples. Esta variante múltiple posibilita los análisis de un número mayor de muestras para varios agentes al unísono; ahorrando muestra clínica y recursos, acortando el tiempo para el diagnóstico y permitiendo detectar la presencia de coinfecciones. Entre las desventajas se encuentra que es un proceder caro, laborioso, que requiere de un personal altamente entrenado, puede producir contaminaciones cruzadas y no permite la detección de cepas virales muy divergentes (183, 186). Existen numerosos estudios sobre la aplicación práctica de los ensayos de RCP y RCP múltiple al diagnóstico de las IRA (187, 188).

II. 9. 2 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real:

Se ha denominado RCP en tiempo real a aquellos ensayos en los cuales los procesos de amplificación y detección viral se producen de manera simultánea en un mismo tubo cerrado sin necesidad de algún procedimiento posterior. En estos, el producto de la reacción es detectado mediante el incremento de una señal fluorescente generada durante la propia reacción la cual es proporcional a la cantidad del producto formado y se visualiza en una computadora. En la actualidad existen diferentes plataformas instrumentales capaces de ejecutar eficientemente el proceso de amplificación y detección del mismo simultáneamente. Estos termocicladores, a diferencia de los empleados en los ensayos de RCP poseen un lector de fluorescencia y son capaces de medir constantemente la señal emitida en cada muestra de manera individual. Las tecnologías empleadas por estos equipos son básicamente de dos tipos: agentes intercalantes, con afinidad por la doble cadena de ADN como es el SYBR Green y las sondas de hibridación específicas entre las que se encuentran las sondas de hidrólisis (también llamadas TaqMan), las sondas FRET (siglās del inglés, fluorescence resonance energy transfer) y las denominadas Molecular beacons (189, 190).

La RCP en tiempo real posee entre sus ventajas la rapidez en la obtención del resultado, lo que la hace más eficiente y aumenta la capacidad diagnóstica del laboratorio. Otra ventaja es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye. Además, permite realizar la cuantificación del ácido nucleico presente en la muestra y la determinación de mutaciones puntuales de importancia clínica o terapéutica (191, 192). Por otra parte, las sondas marcadas con moléculas fluorogénicas de diferente longitud de onda para diferentes juegos de cebadores, posibilitan el desarrollo de los sistemas múltiples de detección (54, 107). En los últimos años existe un incremento de la utilización de los ensayos de RCP en tiempo real para la identificación de los virus respiratorios más frecuentes y de los considerados virus emergentes (193, 194).

II. 9.3 Secuenciación de ácidos nucleicos

La secuenciación de ácidos nucleicos en microbiología es un conjunto de métodos cuya finalidad es determinar el orden de los nucleótidos en un gen determinado, incluso de todos los genes que componen el genoma de un agente microbiano. En la actualidad, este proceso involucra el producto de una RCP empleada para la obtención de un segmento diana que se desea secuenciar como molde, el cual es llevado a una reacción de secuenciación, que posteriormente puede ser analizada mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida mediante procesos automatizados. Los resultados, son finalmente procesados por programas informáticos que permiten la obtención y caracterización de la secuencia investigada (184).

El análisis de la secuencia nucleotídica de una cepa viral proporciona información que no es posible obtener por otras técnicas. Actualmente existen bases de datos disponibles en Internet de libre acceso como el GenBank para el depósito y comparación de secuencias, lo cual potencia aun más las posibilidades de esta herramienta. Mediante la secuenciación es posible identificar con seguridad el tipo viral, los subtipos, los serotipos y las especies de virus conocidos o emergentes (195-197). El análisis filogenético de las secuencias permite establecer patrones de evolución y diseminación, entre otras investigaciones epidemiológicas (198, 199).

La determinación de la secuencia nucleotídica y el estudio posterior de las posiciones de los aminoácidos en varias proteínas virales ofrece información sobre las funciones biológicas como la unión a los receptores celulares, la actividad enzimática, el potencial antigénico y la susceptibilidad a las drogas antivirales (200, 201). Los cambios en la secuencia aminoacídica pueden determinar entre otras consecuencias, alteraciones en la virulencia de las cepas y originar resistencia a las drogas antivirales disponibles (202). Estos al mismo tiempo pueden determinar cambios en el manejo de los casos y las medidas de prevención y control por los sistemas de salud para aminorar su impacto sanitario (203).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. 1 Diseño general de la investigación

En la presente investigación se realizaron tres estudios para identificar la circulación en Cuba de virus respiratorios emergentes:

- 1) Estudio descriptivo de serie de casos para identificar el agente etiológico viral de un brote de síndrome febril agudo inespecífico (SFAI).
- 2) Estudio descriptivo de serie de casos para detectar la circulación de dos nuevos virus respiratorios (MPVH y BoVH) en niños ≤ 5 años de edad con IRA mediante un ensayo de TR-RCP múltiple desarrollado en el LNR.
- 3) Estudio de corte transversal para desarrollar una estrategia de laboratorio para el diagnóstico y el monitoreo de la circulación de un virus influenza con potencial pandémico

III. 2. Identificación del agente etiológico viral de un brote de SFAI.

Para identificar la posible etiología viral de un brote de SFAI, se realizó un estudio descriptivo de serie de casos empleando métodos de diagnóstico molecular

III. 2. 1 Universo de estudio.

Estuvo constituido por todas las muestras clínicas recibidas en los LNR durante un brote de SFAI, ocurrido en La Habana, en el período comprendido entre el 2 de julio y el 3 de agosto del año 2005. Para la selección de las muestras se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

- Toda muestra clínica colectada de acuerdo a la definición de caso establecida, enviada a los LNR durante las primeras 72 horas posteriores al inicio de los síntomas acompañada de un modelo de colecta de muestra para estudio microbiológico completado con los datos: nombre y apellidos, edad, sexo, dirección particular, fecha del comienzo de los primeros síntomas, fecha de colecta de la muestra, tipo de muestra, número de

historia clínica, impresión diagnóstica de SFAI, resumen de datos clínicos y epidemiológicos del caso, unidad de salud de procedencia. (hospital y provincia) y datos generales del médico de atención.

- Volumen de la muestra suficiente para las determinaciones a realizar, la cual debe estar correctamente identificada y transportada al laboratorio a 4 °C en sistema de triple embalaje.

Se definió como caso sospechoso de SFAI: Paciente con aparición súbita (menos de 72 horas) de fiebre ≥ 38 °C acompañada de vómitos, diarrea, signos de bajo gasto cardíaco (taquicardia, pulsos periféricos débiles, cianosis distal, llene capilar enlentecido y piel pálida). Además, los casos fallecidos a causa de un choque cardiogénico con antecedentes de haber presentado la sintomatología mencionada previamente.

III. 2. 1 a) Marco muestral.

Se estudiaron 64 muestras clínicas procedentes de 44 pacientes. La distribución del total de las muestras estudiadas se muestra en la tabla siguiente.

Tabla 7. Distribución de las muestras estudiadas según el tipo.

Tipo de muestra	Número de muestras
Tejido de pulmón	8
Tejido de corazón	8
Tejido de hígado	6
Tejido de bazo	2
Tejido de cerebro	2
Tejido de riñón	1
ENF	21
Suero	2
Heces	8
LCR	6
Total	64

Fuente: Registro de datos de los LNR, IPK

III. 2. 1 b) Procesamiento de las muestras clínicas.

Las muestras de necropsia consistentes en un fragmento de tejido de aproximadamente 2 cm², embebido en 5 mL de solución salina fisiológica estéril en un frasco estéril se procesaron realizando un corte de cada uno de los tejidos de manera individual de aproximadamente 1 cm² por 2 mm de espesor. Posteriormente se desintegraron en morteros estériles con arena lavada y Medio Esencial Mínimo (MEM), (Gibco-BRL),

penicilina 200U/mL, y estreptomicina 200 µg/mL, (BioWhittaker); anfotericin B 200U/mL, (Sigma) y albúmina Bovina 0.25%, (Merck). El producto de este procedimiento se dispensó en tubos de 1,5 mL (Eppendorff) y se sometió a centrifugación (centrífuga Eppendorff) a 1 800 gravedades (g) durante 15 minutos a 4 °C. Seguidamente, se colectó toda la fase líquida en dos tubos de congelación de 2 mL (Greiner) y el sedimento se eliminó. Uno de los tubos se utilizó para realizar la extracción de ácidos nucleicos de manera inmediata y el otro se conservó en congelación a -70 °C para los análisis adicionales.

Los ENF se colectaron en 3 mL de medio de transporte para virus confeccionado en los LNR, compuesto por medio MEM (Gibco-BRL), penicilina 200U/mL, y estreptomicina 200 µg/mL, (BioWhittaker); anfotericin B 200U/mL, (Sigma) y albúmina Bovina 0.25%, (Merck). Las muestras se agitaron mecánicamente y luego se dispensaron por duplicado en tubos de congelación de 2 mL (Greiner). Una de ellas se procesó de manera inmediata para realizar la extracción de ácidos nucleicos y el resto se conservó en congelación a -70°C.

Las muestras de suero y LCR se colectaron en un tubo de 1,5 mL (Eppendorff) conteniendo cada una aproximadamente 500 µL. Una alícuota de cada muestra se procesó de manera inmediata para realizar la extracción de ácidos nucleicos y las restantes se conservaron en congelación a -70 °C.

Para el procesamiento de las heces se realizó una suspensión al 10% (peso/volumen) en medio MEM (Gibco-BRL) con sulfato de neomicina al 0,2% (Sigma). Se agitó vigorosamente mediante agitador mecánico durante 1 minuto y se realizó centrifugación (centrífuga Eppendorff) a 10 000 g durante 10 minutos. Se tomó 900 µL del sobrenadante y se mezcló con 100 µL de cloroformo (Sigma). Esta mezcla se agitó durante 5 minutos y se centrifugó como en el paso anterior. Al finalizar este procedimiento, el sobrenadante se colectó y se dispensó en tubos de congelación de 2 mL (Greiner) por duplicado. Una alícuota se procesó de manera inmediata para realizar la extracción de ácidos nucleicos y el resto se conservó en congelación a -70 °C.

III. 2. 1 c) Extracción de ácidos nucleicos.

El ácido nucleico total (ADN/ARN) fue extraído de una alícuota de 200 µL de cada una de las muestras clínicas, utilizando el método de tiocionato de guanidinio, descrito previamente por Casas y colaboradores (204). Cada alícuota se adicionó en un tubo de 1,5 mL (Eppendorff) que contenía 600 µL de tampón de lisis [tiocianato de guanidinio 5M (Merck), citrato de sodio 1M (Sigma), ditioneitol 1M (Sigma), sarkosyl 3% (Merck), glicógeno 20 mg/mL (Sigma)] y 100 copias de un producto clonado y amplificado empleado como control interno (CI) descrito por Coiras y colaboradores (205) y donado a los LNR del IPK por el laboratorio de gripe y virus respiratorios del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) de Madrid, España. Se realizó agitación vigorosa durante 10 segundos empleando un vortex. Posteriormente, se dejó reposar por 10 minutos a

temperatura ambiente y seguidamente se adicionó 600 μL de isopropanol preenfriado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para proceder a realizar una agitación vigorosa durante 10 segundos. Inmediatamente, se realizó una centrifugación (centrífuga Eppendorf) a 16 000 g durante 20 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$, se descartó toda la fase líquida y se le adicionó al sedimento 1 mL de etanol al 70 % frío para luego ser agitado ligeramente. Se procedió a realizar una centrifugación en iguales condiciones descritas previamente y se desechó toda la fase líquida. Se dejó secar el sedimento en el interior del gabinete de seguridad destinado para el proceder de extracción de ácidos nucleicos. Finalmente, el sedimento seco se resuspendió en 30 μL de agua destilada estéril libre de nucleasas (Sigma).

III. 2. 1 d) Detección del genoma viral.

Para la detección del genoma viral, todas las muestras clínicas se procesaron en los LNR mediante dos protocolos de TR-RCP anidadas múltiples para la amplificación de un segmento del ácido nucleico de los virus influenza A, influenza B, influenza C, VSRH y AdvH y VPI tipo1-4, CoVH OC43, CoVH 229E, la detección genérica de RV y EV (205, 206).

III. 2. 1 e) Ensayo de TR-RCP anidada múltiple para la detección de influenza A, influenza B, influenza C, VSRH A, VSRH B y AdvH

La TR-RCP anidada múltiple, previamente descrita por Coiras y colaboradores (205), se realizó en un solo paso empleando el estuche comercial OneStep RT-PCR, (Qiagen), modificación del protocolo original realizada por la autora que empleaba el estuche Access RT-PCR (Promega).

La mezcla de la reacción se realizó en un volumen final de 45 μL . La misma estuvo compuesta por 10 μL de tampón 5X, 0,1 μM de la mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 μL de la mezcla de las enzimas Transcriptasa reversa - Taq polimerasa (Enzyme Mix), agua destilada estéril libre de nucleasas contenidos en el estuche OneStep RT-PCR (Qiagen), y 20 pmol/ μL de cada cebador (Anexo 2). A cada uno de los tubos que contenía la mezcla de la reacción se le adicionaron 5 μL del ácido nucleico (ADN/ARN) extraído previamente. La reacción TR-RCP se desarrolló a $48\text{ }^\circ\text{C}$ durante 45 minutos, seguida por un paso de inactivación de la enzima TR a $95\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos, y 45 ciclos de amplificación consistentes en: $94\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 segundos, $50\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 minutos y $72\text{ }^\circ\text{C}$ por 1 minuto, seguida por una extensión final de $72\text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos usando un equipo termociclador Mastercycler personal (Eppendorf).

La RCP anidada se realizó siguiendo el protocolo descrito por Coiras y colaboradores (205). La mezcla de la reacción consistió en 10 μL de tampón 5X [2 mM de MgCl_2 (Perkin-Elmer), 60 mM Tris-HCl (pH 8.5), 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], 0,2 μM de cada dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, y dTTP) (Promega), 20 pmol/ μL de cada

cebador específico (Anexo 2), 1.25 U de AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin-Elmer) y agua destilada estéril libre de nucleasas (Sigma) para un volumen final de 48 µL. A cada tubo de reacción conteniendo dicha mezcla se le adicionó 2 µL del producto de la primera reacción de TR-RCP. La mezcla de la RCP anidada se colocó en el mismo equipo termociclador desarrollándose la reacción con las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización del ADN a 95 °C durante 4 minutos seguido de 35 ciclos de amplificación consistentes en: 94 °C durante 30 segundos, 55 °C por 1 minuto y 72°C durante 30 segundos, seguida por una extensión final a 72°C por 5 minutos.

III. 2. 1 f) Ensayo de TR-RCP anidada múltiple para la detección de VPI tipo 1-4, CoVH OC43, CoVH 229E, RV y EV.

La composición de la mezcla de la reacción de TR-RCP, previamente descrita por Coiras y colaboradores (206), fue similar a la descrita en el acápite III. 2. 1 e) con la excepción del empleo de los cebadores específicos para los agentes de interés que aparecen en el Anexo 3. La reacción de amplificación se desarrolló a 48 °C durante 45 minutos, seguida por un paso de inactivación de la enzima TR a 94 °C durante 3 minutos y 45 ciclos de amplificación consistentes en: 94 °C durante 30 segundos, 55 °C por 1,5 minutos y 72 °C por 1 minuto, y una extensión final de 72°C por 5 minutos usando el equipo termociclador Mastercycler personal (Eppendorf).

La RCP anidada se realizó siguiendo el protocolo descrito por Coiras y colaboradores (206). La mezcla de la reacción se preparó con igual composición de la reacción anidada descrita en el acápite III. 2. 1 e) exceptuando los cebadores empleados que se muestran en el Anexo 3. La reacción anidada se realizó en las mismas condiciones de amplificación que el ensayo anidado del acápite III. 2. 1 e).

III. 2. 1 g) Controles.

Para el desarrollo de ambos protocolos descritos anteriormente se utilizaron controles positivos y un control negativo.

-Controles positivos: Los controles positivos consistieron en 10 copias de productos de genes clonados en el vector pGEM-T (Promega) obtenidas a partir de cepas prototipos de los virus influenza A, B y C, VSRH A y B y AdVH serotipo 1, para el primer ensayo (acápites III. 2. 1 e); VPI 1, 2, 3 y 4a, CoVH 229E, echovirus 30 y RV serotipo 30 para el segundo ensayo (acápites III. 2. 1 f) gentilmente donados al LNR del IPK por el laboratorio de gripe y virus respiratorios del ISCIII.

-Control negativo: El control negativo consistió en agua destilada estéril libre de nucleasas (Sigma) que se procesó siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la detección de genoma viral en las muestras clínicas.

III. 2. 1 h) Detección de los productos de amplificación.

Para la detección de los productos de amplificación se tomaron 8 μ L de cada uno de los productos de las reacciones anidadas y se mezclaron con 2 μ L de tampón estabilizador de muestra 6X (EDTA 500 mM, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0.01%). Estos productos amplificados se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en TBE 1X (Tris 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 M) mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) (Sigma). La electroforesis se realizó a 90V durante 1 hora, empleando como marcador de peso molecular el DNA ladder 100 bp (Promega), con un rango entre 100 pb y 1000 pb. La visualización de los productos de amplificación se realizó por exposición del gel a la luz ultravioleta en un transiluminador (Spectroline® Bi-O-Vision™). La longitud de los productos amplificados se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Longitud de los productos de amplificación para cada uno de los virus investigados y el control interno en las reacciones anidadas.

Virus	Longitud (pb)
Influenza A	301
Influenza B	226
Influenza C	111
VSRH A	363
VSRH B	611
AdVH	181
VPI 1	439
VPI 2	297
VPI 3	390
VPI 4a y 4b	174
CoVH 229E	630
CoVH OC43	587
EV	226
RV	110
CI	887

Fuente: Coiras y cols., 2003, Coiras y cols., 2004

Los procedimientos para preparación de las mezclas de reacción, extracción de ácidos nucleicos, reacciones de amplificación y chequeo de los productos de amplificación se realizaron tomando en cuenta todas las recomendaciones establecidas para evitar las contaminaciones (207).

Criterios para la interpretación del resultado:

- Muestra negativa: Solo se visualizó el producto de amplificación correspondiente con la longitud del CI (tabla 8).

- Muestra positiva: Se visualizaron productos de amplificación correspondiente con la longitud del CI y uno o más de los virus estudiados (tabla 8).
- Muestra inhibida: No se visualizó producto de amplificación correspondiente al CI.

III. 2. 2 Secuenciación de ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas que resultaron positivas a los AdvH después del procesamiento de dos alícuotas diferentes y en dos momentos diferentes; se procesaron mediante secuenciación nucleotídica con el objetivo de confirmar la identidad del producto amplificado e identificar los serotipos y especies de los AdvH detectados.

III. 2. 2 a) Ensayo de RCP semi-anidada para secuenciación nucleotídica de los AdvH.

Previo a realizar la reacción de secuenciación nucleotídica, se procesaron 2 μL del producto de la primera reacción de TR-RCP (acápite III. 2. 1 e) de las muestras positivas a los AdvH, mediante dos reacciones de RCP semi-anidadas publicadas previamente (74). La mezcla de las reacciones se preparó siguiendo el procedimiento para la reacción anidada descrita en el acápite III. 2. 1 e). En este caso se emplearon los cebadores: ADV2-positivo y ADV1-negativo, para una de las reacciones semi-anidadas y ADV1-positivo, y ADV2-negativo para la otra, ambos con una concentración de 20 pmol/ μL (Anexo 2) publicados previamente (208). La mezcla de las RCP semi-anidadas se colocó en el equipo termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) y la reacción se desarrolló con las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización del ADN a 95 °C durante 4 minutos seguido de 35 ciclos de amplificación consistentes en: 94 °C durante 1 minuto, 50 °C por 1 minuto y 68 °C durante 1 minuto, seguida por una extensión final a 68 °C por 5 minutos. La detección de los productos amplificados se llevó a cabo realizando el procedimiento descrito en el acápite III. 2. 1 h). La longitud de los segmentos amplificados fue de 369 pb en la reacción semi-anidada 1 y 272 pb en la reacción semi-anidada 2.

III. 2. 2 b) Purificación de los productos de amplificación.

El ADN amplificado en ambas reacciones de RCP semi-anidada se purificó manualmente empleando el estuche comercial QIAquick PCR purification kit, (Qiagen) siguiendo las instrucciones del productor. Para evaluar la calidad y estimar la concentración de los productos purificados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% siguiendo la metodología descrita en la sección III. 2. 1 h).

III. 2. 2 c) Reacción de secuenciación nucleotídica.

Los productos purificados fueron secuenciados en ambos sentidos empleando los juegos de cebadores descritos en el acápite III. 2. 2 a) a una concentración de 0,5 pmol/ μL y cuyas características aparecen en el

Anexo 2. La secuenciación nucleotídica se realizó con la colaboración del laboratorio de gripe y virus respiratorios del ISCIII y el departamento de medicina preventiva, salud pública y microbiología de la facultad de medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, España. La secuenciación se realizó en un secuenciador automático ABI Prism 3700 (Applied Biosystems) empleando el estuche Big Dye Terminator Cycle Sequencing, versión 3.1 (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

III. 2. 2 d) Análisis de las secuencias nucleotídicas.

Las secuencias obtenidas se analizaron empleando el programa CHROMAS versión 1.3. El ensamblaje de las secuencias de las cadenas positivas y negativas, así como la edición de las mismas se realizó manualmente usando el programa Bioedit versión 7.0.1. El alineamiento y comparación con las secuencias de las cepas prototipos de los AdVH publicadas en la base de datos GenBank, se llevó a cabo mediante el programa CLUSTAL X versión 1.83. El análisis filogenético se realizó usando programas del paquete MEGA versión 4. La construcción de árboles filogenéticos se realizó mediante el método de Neighbor-joining. La distancia evolutiva fue estimada mediante el método de dos parámetros de Kimura (209). La significación estadística de la topología del árbol filogenético se evaluó calculando el re-muestreo (del inglés, bootstrap) con 1000 réplicas usando el programa MEGA, versión 4. Para la asignación del serotipo específico se tomaron en cuenta la distancia más corta entre la secuencia analizada y la secuencia de la cepa prototipo así como los valores más altos de similitud obtenidos posterior a la comparación entre dichas secuencias.

Para el análisis comparativo de las secuencias se emplearon secuencias de las cepas prototipos de los diferentes serotipos y especies de AdVH disponibles en la base de datos de secuencia del GenBank con los siguientes números de acceso: X67709, J01917, X76549, X84646, J01966, X67710, X76551, X74663, X74657, AY288105, AB018424, X73487, AY288106, AB018425, AY288107, X74662, AY288108, AY288109, X98359, AY288110, AY288111, AY288112, AY288113, AY288114, AY288115, AY288116, AY288117, AY288118, AY288119, AY288120, X74661, AY288121, AY288122, AB018426, AB018427, AY288123, X98360, AY288124, AY288125, L19443, X51783, AY288126, AY288127, AY288128, AY288129, AY288130, AY288131, V20821, AY288132, AJ250788.

III. 3 Identificar la circulación del metapneumovirus humano y el bocavirus humano en niños ≤ 5 años de edad con infección respiratoria aguda mediante un ensayo de TR-RCP anidado múltiple optimizado.

Para realizar este estudio se desarrolló un ensayo de TR-RCP anidado múltiple para la identificación específica del MPVH y el BoVH. En este ensayo se incluyó además al VSRH A y B, el cual es considerado

el principal agente etiológico de las IRA en los dos primeros años de vida, específicamente de bronquiolitis y neumonía en los lactantes (210, 211). Por otro lado, según investigaciones previas sobre el MPVH y el BoVH, estos nuevos virus poseen un tropismo, características clínicas y epidemiológicas similares al VSRH (126). Para cumplimentar el estudio de la circulación de dichos agentes en niños ≤ 5 años de edad con diagnóstico clínico de IRA en el período 2009- 2010 se realizó un estudio descriptivo de serie de casos

III. 3. 1 Desarrollo del ensayo de TR-RCP anidado múltiple para el diagnóstico de VSRH A y B, MPVH y BoVH.

III. 3. 1 a) Optimización del ensayo de TR-RCP anidado múltiple para el diagnóstico de VSRH A, VSRH B, BoVH y MPVH

Para la optimización del ensayo se seleccionaron los cebadores específicos para VSRH A, VSRH B y BoVH publicados previamente y descritos en el Anexo 4 (205, 212). Para la detección específica de un segmento del gen que codifica para la proteína M del MPVH se emplearon tres cebadores diseñados por López-Huerta y colaboradores (213) descritos en el Anexo 4.

La mezcla de la reacción para la TR-RCP se realizó empleando el estuche comercial OneStep RT-RCP, (Qiagen) y siguiendo las instrucciones del productor. La composición de la misma fue similar a la del protocolo de TR-RCP descrito en el acápite III. 2. 1 e) a excepción de los cebadores que aparecen descritos en el Anexo 4. Para la optimización se realizaron curvas de temperatura (50°C, 53°C y 55°C) y tiempo de hibridación (1, 2 y 3 minutos), concentración de los cebadores (0.5, 10 y 20 pmol/ μ L), temperatura (68°C y 72°C) y tiempo de extensión (30 segundos, 1 y 2 minutos). A las mezclas de la reacción se le adicionaron 5 μ L del ácido nucleico (ADN/ARN) previamente extraído utilizando el método de tiocionato de guanidinio, publicado previamente por Casas y colaboradores (204) y descrito en el acápite III. 2. 1 c). Las reacciones de amplificación se realizaron en el equipo termociclador Mastercycler personal (Eppendorf)..

Los cebadores que se emplearon en la reacción anidada aparecen descritos en el Anexo 4. En este estudio se diseñó un cuarto cebador mediante alineamientos múltiples de este cebador con secuencias del MPVH disponibles en la base de datos del GenBank empleando el programa Macaw versión 2.0.5 (NCBI, Bethesda, MD). Las secuencias empleadas están publicadas con los números de acceso: AY145294, AY297748, AY297749, JPS03-240, AY530095, AY145295, AY145287, AY525843, AF371337, AY145289, AY304361, AY145291, NC_004148 AY295946. Para demostrar que este cebador cumplía con los criterios óptimos definidos para evaluar un cebador, se analizó el contenido de Guanina y Citosina, su longitud y la

temperatura de hibridación empleando el programa Primer Select, versión 3.04 del paquete de programas DNASTar.

La mezcla de la reacción se realizó en un volumen final de reacción de 48 μL , con composición similar al protocolo de la reacción anidada descrita en la sección III. 2. 1 e). Para optimizar el ensayo anidado, se realizaron curvas de concentración de los cebadores (5, 10, 20 y 30 pmol/ μL), tiempo (1 y 2 minutos), temperatura (51°C, 53°C y 55°C) de hibridación y tiempo (30 segundos, 1, 2 y 3 minutos) de extensión. Para realizar la reacción de amplificación se adicionaron 2 μL del producto de amplificación de la TR-RCP. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo termociclador Mastercycler personal (Eppendorf).

III. 3. 1 b) Controles

Se utilizaron controles positivos y un control negativo.

-Controles positivos: Consistieron en 10 copias de productos de genes clonados en el vector pGEM-T (Promega) de cepas prototipos de VSRH A, VSRH B y MPVH, y un plásmido de ADN que contiene el producto de la primera reacción de amplificación del BoVH, purificados y titulados mediante espectrometría de masa por el laboratorio de gripe y virus respiratorios del ISCIII y donados a los LNR de virus influenza y otros virus respiratorios del IPK.

-Control negativo: Consistió en agua destilada estéril libre de nucleasas (Sigma) que se procesó siguiendo el mismo procedimiento utilizado para las muestras clínicas.

III. 3. 1 c) Detección de los productos de amplificación.

La detección de los productos de amplificación se realizó mediante el procedimiento descrito en el acápite III. 2. 1 h). La longitud de los productos de amplificación se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 9. Longitud de los productos de amplificación para cada uno de los virus investigados y el control interno en la reacción anidada.

Virus	Tamaño del fragmento (pb)
VSRH A	363
VSRH B	611
MPVH	486
BoVH	243
CI	887

Fuente: Coiras y cols., 2003, Pozo y cols., 2007

Para todos los procedimientos se tomaron en cuenta las recomendaciones establecidas para evitar las contaminaciones (207).

Criterios para la interpretación del resultado.

- La interpretación de los resultados se realizó teniendo en cuenta los criterios descritos en el acápite III. 2. 1 h).
- Las muestras clínicas fueron definidas como positivas para VSRH A, VSRH B, BoVH y MPVH, cuando se detectaron productos de amplificación de la longitud correspondiente para los segmentos de estos agentes (tabla 9) mediante los ensayos de TR-RCP anidado múltiple (205), RCP anidado (212) y TR-RCP semianidado (213) originales y el protocolo recién optimizado, al realizarse en momentos diferentes y a partir de dos alícuotas diferentes de la misma muestra clínica.

III. 3. 1 d) Evaluación de la validez diagnóstica del ensayo de TR-RCP anidado múltiple optimizado.

La validez del ensayo se evaluó a partir de la determinación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica. El análisis de la sensibilidad del ensayo optimizado se realizó comparando los valores de sensibilidad obtenidos para el nuevo ensayo con los valores obtenidos mediante los ensayos individuales para cada patógeno (TR-RCP anidados para VSRH A y B, TR-RCP semi-anidado para MPVH y RCP anidado para BoVH) publicados previamente (205, 212, 213), empleando en estos, las condiciones descritas en los protocolos originales. En cada ensayo se utilizó un control positivo para cada virus y el control negativo descritos en el acápite III. 3. 1 b). Con este propósito, se seleccionaron 183 muestras clínicas de ENF clínicas recibidas en los LNR del IPK como parte de la vigilancia de las IRA de posible etiología viral, durante el período comprendido entre septiembre del año 2005 y octubre del año 2007 que fueron procesadas siguiendo el procedimiento descrito en el acápite III. 2. 1 b) para este tipo de muestras clínicas. A partir de las mismas, el ácido nucleico (ADN/ARN) total fue extraído utilizando el método de tiocionato de guanidinio, publicado previamente por Casas y colaboradores (204) y descrito en el acápite III. 2. 1 c).

Para la selección de las muestras se tuvieron en cuenta los criterios siguientes.

Criterios de inclusión:

- Toda muestra clínica colectada durante las primeras 72 horas del inicio de los síntomas de un paciente ≤ 5 años de edad con diagnóstico clínico de bronquiolitis o neumonía, acompañada de un modelo de colecta de muestra para el estudio microbiológico completado con los datos: nombre y apellidos, edad, sexo, dirección particular, fecha del comienzo de los primeros síntomas, fecha de colecta de la muestra, tipo de muestra, número de historia clínica, unidad de salud de procedencia. (hospital y provincia) y datos generales del médico de atención.
- Volumen de muestra suficiente para las determinaciones a realizar conservada adecuadamente a -70°C .

La sensibilidad se evaluó además mediante el análisis de diluciones seriadas en base 10 (10^{-1} a 10^{-8}) comenzando por 1.5×10^6 copias genómicas de los plásmidos controles positivos para cada patógeno, previamente cuantificados descritos en el acápite III. 3. 1. b).

La especificidad del protocolo optimizado se evaluó también mediante el procesamiento de un panel de muestras positivas a otros patógenos virales respiratorios que incluyeron: influenza A y B, VPI 1-3, CoVH 229E y CoVH OC43, RV y AdVH.

La reproducibilidad se determinó mediante la realización de dos ensayos de TR-RCP anidado múltiple para VSRH, BoVH y MPVH, empleando dos muestras positivas para cada uno de los agentes y analizadas por triplicado en cada ensayo.

Se determinaron los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) del ensayo optimizado empleando las fórmulas:

$$\text{VPP} = \frac{\text{Verdaderos Positivos (VP)}}{\text{VP} + \text{Falsos Positivos (FP)}} \qquad \text{VPN} = \frac{\text{Verdaderos Negativos (VN)}}{\text{Falsos Negativos (FN)} + \text{VN}}$$

III. 3. 2 Estudio de la circulación de BoVH y MPVH mediante el ensayo de TR-RCP múltiple anidado optimizado para el diagnóstico de VSRH A, VSRH B, MPVH y BoVH.

Para la detección de la circulación en Cuba de los virus emergentes BoVH y MPVH, se realizó un estudio descriptivo de serie de casos mediante la aplicación del ensayo de TR-RCP múltiple anidado optimizado previamente como se describió en el acápite III. 3. 1.

III. 3. 2 a) Universo de estudio.

El universo estuvo constituido por todas las muestras clínicas recibidas en los LNR, durante el período comprendido entre el 1 de diciembre del año 2009 y el 30 de diciembre del año 2010. Se realizó una selección aleatoria de las muestras en la base de datos para la entrada de muestras y los resultados del laboratorio teniendo en cuenta los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

- Paciente ≤ 5 años de edad con diagnóstico clínico de IRA de posible etiología viral de acuerdo con la clasificación de la OMS descrita en el acápite II. 3. 2 (46).
- Muestra clínica (ENF, AB) colectada y enviada a los LNR durante las primeras 72 horas del inicio de los síntomas y acompañada de un modelo de colecta de muestra para estudio microbiológico completado (Anexo 5).

- Volumen de muestra suficiente para las determinaciones a realizar.

III. 3. 2. b) Marco muestral.

Se estudiaron 1001 muestras clínicas procedentes de 1001 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión.

III. 3. 2 c) Procesamiento de las muestras clínicas.

Las muestras clínicas consistieron en ENF (981) y AB (20) colectados en medio de transporte universal para virus (UTM, siglas del inglés Universal Transport Medium) transportadas en sistema de triple embalaje a 4 °C, correctamente identificadas. Las muestras se dispensaron en dos alícuotas en tubos de congelación de 2 mL (Greiner). Una de las alícuotas se procesó de manera inmediata y la otra se conservó a -70 °C.

III. 3. 2 d) Extracción de ácidos nucleicos.

El ácido nucleico total ARN/ADN se obtuvo mediante extracción automática a partir de una alícuota de 140 µL de la muestra clínica empleando el extractor automático QIAcube (Qiagen). Para realizar este procedimiento se utilizaron los materiales gastables y reactivos contenidos en los estuches comerciales recomendados para la extracción de ácidos nucleicos en dicho equipo: QIAamp Viral RNA minikit (Qiagen) y QIAamp Viral DNA mini kit (Qiagen). La preparación de los reactivos se realizó teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante. El tampón de lisis del estuche incluyó 100 copias correspondientes al CI, descrito por Coiras y colaboradores (205).

III. 3. 2 e) Detección del genoma viral de VSRH A, VSRH B, BoVH y MPVH mediante el ensayo de TR-RCP anidado múltiple optimizado.

La totalidad de las muestras clínicas se procesaron mediante el protocolo de TR-RCP anidado múltiple para la detección de VSRH A, VSRH B, BoVH y MPVH optimizado en el acápite III. 3. 1 a).

La TR-RCP, se realizó en un solo paso empleando el estuche comercial OneStep RT-PCR (Qiagen) y siguiendo las instrucciones del productor. La composición de la mezcla de la reacción fue similar a la de la reacción de TR-RCP descrita en el acápite III. 2. 1 e) a excepción de los cebadores. Los cebadores específicos (Anexo 4), se emplearon a la concentración óptima de acuerdo a los resultados obtenidos en la curva de concentración de los mismos descrita en el acápite III. 3. 1. a). A cada tubo de la reacción se le adicionaron 5 µL del ácido nucleico (ADN/ARN) extraído previamente. Para llevar a cabo la TR-RCP se emplearon las condiciones óptimas obtenidas al evaluar los resultados de las curvas de tiempo y temperatura de hibridación y extensión, descritas en el acápite III. 3. 1. a).

La composición de la mezcla de la reacción de RCP anidada fue similar a la descrita en el acápite III. 2. 1 e) a diferencia de los cebadores. Los cebadores específicos (Anexo 4), se emplearon a la concentración óptima de

acuerdo a los resultados obtenidos en la curva de concentración de los mismos descrita en el acápite III. 3. 1. a). A cada tubo de la mezcla de reacción se adicionó 2 µL del producto de la primera reacción de TR-RCP. La reacción anidada se desarrolló en las condiciones de amplificación definitivas resultantes de la evaluación de los parámetros de optimización descritos en el acápite III. 3. 1. a).

Las reacciones de amplificación se llevaron cabo en el termociclador Mastercycler personal (Eppendorf).

III. 3. 2. f) Controles

Para el desarrollo de ambos protocolos descritos anteriormente se utilizaron controles positivos y un control negativo descritos en el acápite III. 3. 1 b).

III. 3. 2 g) Detección de los productos de amplificación.

La detección de los productos amplificados se realizó mediante el procedimiento descrito en el acápite III. 2. 1 h).

Todos los procedimientos se realizaron tomando en cuenta las recomendaciones establecidas para evitar las contaminaciones (207).

Criterios para la interpretación del resultado.

- La interpretación de los resultados se realizó teniendo en cuenta los parámetros descritos en el acápite III. 3. 1 c). El tamaño de los fragmentos a amplificar para cada uno de los agentes aparece en la tabla 9.

III. 4 Desarrollar una estrategia de laboratorio para el diagnóstico y estudio de la circulación de un virus influenza con potencial pandémico.

III. 4. 1 Elaboración de un algoritmo para el diagnóstico de virus influenza con potencial pandémico.

Para el diagnóstico de un virus influenza pandémico se diseñó y estableció un algoritmo diagnóstico mediante la selección de varios ensayos de diagnóstico molecular.

III. 4. 1 a) Extracción de ácidos nucleicos.

El ácido nucleico total (ADN/ARN) fue extraído de una alícuota de 200 µL de cada una de las muestras clínicas (ENF, AB y muestras de tejido de pulmón obtenidos mediante necropsia) utilizando el método de tiocionato de guanidinio descrito en el acápite III. 2. 1 c) (204).

Un segundo procedimiento de extracción de ácidos nucleicos (ADN/ARN) se empleó como parte del algoritmo diagnóstico. El mismo consistió en extracción automatizada empleando el extractor automático QIAcube (Qiagen) descrito en el acápite III. 3. 2. d). Por último, la extracción de ARN a partir de muestras de

pulmón homogenizadas mediante el equipo automático TissueLyser se realizó empleando el estuche comercial para muestras de tejidos RNeasy minikit, (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

III. 4. 1 b) Detección del genoma viral de virus influenza A (H1N1) pdm09.

Para la detección del genoma viral del virus pandémico, se diseñó un algoritmo mediante el análisis de la especificidad de los protocolos de diagnóstico molecular disponibles en los LNR (205, 214, 215), considerando las recomendaciones de la OMS (216).

La secuencia del virus prototipo influenza A/California/07/2009 (H1N1) pdm09 con los números de acceso FJ966974 (gen de la HA), FJ966975 (gen de la proteína M) y FJ966979 (gen de la proteína NP) publicadas en la página Web de la Iniciativa Global para Compartir Datos de Influenza Aviar (GISAID, siglas del inglés, Global Initiative Share Avian Influenza Data) y la base de datos EpiFlu, se utilizó para desarrollar los alineamientos múltiples de secuencias empleando la secuencia de los cebadores específicos disponibles en el laboratorio para amplificar un segmento de los genes de las proteínas NP, M y HA de los virus influenza A, mediante el programa CLUSTAL X (version 1,83).

III. 4. 1 c) TR-RCP anidada para la amplificación de un segmento del gen de la NP de los virus influenza A.

La TR-RCP anidada múltiple, descrita por Coiras y colaboradores en el 2003 (205) se designó para ser utilizada en la identificación de los virus influenza A.

La composición de la mezcla y las condiciones de las reacciones de TR-RCP y RCP anidada se describieron en el acápite III. 2. 1 e).

III. 4. 1 d) TR-RCP para la amplificación de un segmento del gen de la proteína M de los virus influenza A.

El ensayo de TR-RCP para el gen de la proteína M que se designó, se publicó previamente por la OMS (215, 216) y fue desarrollado por el Centro Colaborador de la OMS para la referencia y la investigación sobre Influenza del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Tokio, Japón. El protocolo se realizó empleando el estuche comercial OneStep RT-PCR, (Qiagen) siguiendo las instrucciones del productor. A diferencia del protocolo original, el volumen final para la mezcla de la reacción fue de 45 µL. La composición de la mezcla fue similar a la del protocolo de TR-RCP descrito en el acápite III. 2. 1 e) a diferencia de los cebadores. Los cebadores M30F2/08 positivo: 5`- ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG-3` y M264R3/08 negativo: 5`- TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG-3` se emplearon a una concentración de 15 pmol/µL. A cada tubo de la reacción que contenía la mezcla se le adicionó 5 µL del ácido nucleico extraído previamente. La reacción de amplificación se desarrolló a 50 °C durante 30 minutos, seguida por un

paso de inactivación de la enzima TR a 95 °C durante 15 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificación consistentes en: 94 °C durante 30 segundos, 50 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto, seguida por una extensión final de 72 °C por 10 minutos usando el termociclador Mastercycler personal (Eppendorf).

III. 4. 1 e) TR-RCP anidada múltiple para la amplificación de un segmento del gen de la HA de los virus influenza A estacionales A (H3) y A (H1).

El protocolo designado empleó cebadores para la amplificación del gen completo de la HA (214). Los mismos estuvieron representados por PHA1+ positivo: 5'- GGG GTT AGC AAA AGC AGG RG-3' complementario a los primeros 9 nucleótidos del ARN de los virus influenza A y PHA1-negativo: 5'-CAW CCR KCI AYC AKI CCW KIC CAI CC-3' complementario a los últimos 13 nucleótidos. Ambos fueron utilizados a una concentración de 5 pmol/μL. La mezcla de la reacción se realizó empleando el estuche comercial OneStep RT-PCR, (Qiagen) siguiendo las instrucciones del productor. A cada tubo de reacción que contenía la mezcla se le adicionaron 5 μL del ácido nucleico extraído previamente. La reacción de TR-RCP se desarrolló a 50 °C durante 45 minutos, seguida por un paso de inactivación de la enzima TR a 95 °C durante 15 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificación consistentes en: 94 °C durante 30 segundos, 50 °C por 30 segundos y 72 °C por 2 minutos, seguida por una extensión final de 72 °C por 5 minutos usando el equipo termociclador Mastercycler personal (Eppendorf).

En la RCP anidada, se emplearon dos juegos de cebadores específicos para la amplificación de un segmento de la subunidad HA1 del gen que codifica para la glicoproteína HA de los virus influenza A(H1): H1+SSEQ positivo: 5'-CAATATGTATAGGCTACCATGC-3' localizado entre los nucleótidos 56 y 77 de la subunidad HA1; H1-ASEQ negativo: 5'-CCCTCAATRAAACCRGCAAT-3' localizado entre los nucleótidos 1045 y 1064 de la subunidad HA1 y para los virus influenza A(H3): H3+SSEQ positivo: 5'-GACACCATGCAGTGCCAA-3' localizado entre los nucleótidos 124 y 141 de la subunidad HA1 de la HA; H3-ASEQ negativo: 5'-CCCTCCCAACCATTTTCTAT-3' localizado entre los nucleótidos 1092 y 1111 de la subunidad HA1 de la HA publicados previamente (214). La composición de la mezcla de la reacción fue similar a la de la RCP anidada descrita en el acápite III. 2. 1 e), a excepción de los cebadores mencionados anteriormente. Los mismos se emplearon a una concentración de 10 pmol/μL. Para llevar a cabo la reacción de amplificación anidada, se tomaron 2 μL de la reacción de TR-RCP. Esta se realizó a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación consistentes en: 94 °C durante 30 segundos, 52 °C por 2 minutos y 72 °C por 30 segundos, seguida por una extensión final de 72 °C por 5 minutos usando el equipo termociclador Mastercycler personal (Eppendorf).

III. 4. 1 f) TR-RCP para la amplificación de un segmento del gen de la HA del virus influenza A (H1N1) pdm09.

Para la amplificación específica del virus pandémico se designó un protocolo de TR-RCP optimizado en los LNR del IPK (217). Los cebadores para este ensayo (HApdm09 positivo: 5'-AACGGGAAACTATGCAAATAAGA-3' y HApdm09 negativo 5'-TGCCGTTACACCTTTGTTTCGAG-3') se emplearon a una concentración de 10 pmol/μL. La mezcla de reacción se realizó empleando el estuche comercial OneStep RT-PCR, (Qiagen) siguiendo las instrucciones del productor. A cada tubo que contenía la mezcla de la reacción se le adicionaron 5 μL del ácido nucleico extraído previamente. La reacción de TR-RCP se desarrolló a 48 °C durante 30 minutos, seguida por un paso de inactivación de la enzima TR a 95 °C durante 15 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificación consistentes en: 94 °C durante 30 segundos, 57 °C por 30 segundos y 68 °C por 30 segundos, seguida por una extensión final de 68 °C por 5 minutos usando el equipo termociclador Mastercycler personal (Eppendorf).

III. 4. 1 g) Controles.

Para el desarrollo de los protocolos descritos anteriormente (acápites III. 4.1 c) al III. 4. 1. f) se utilizaron controles positivos y uno negativo.

- Controles positivos: Consistieron en 10 copias de productos clonados en el vector pGEM-T (Promega) de cepas prototipos de virus influenza A (H3), virus influenza A (H1) y virus influenza A (H1N1) pdm09 donados por el Laboratorio Nacional de gripe y virus respiratorios del ISCIII.

- Control negativo: El control negativo consistió en agua destilada estéril libre de nucleasas (Sigma), la cual fue procesada siguiendo el mismo procedimiento utilizado para las muestras clínicas.

Todos los procedimientos se realizaron tomando en cuenta las recomendaciones establecidas para evitar las contaminaciones (207).

III. 4. 1. h) Detección de los productos de amplificación.

La detección de los productos amplificados se realizó mediante el procedimiento descrito en el acápite III. 2. 1 h).

Criterios para la interpretación de los resultados.

- La interpretación de los resultados se realizó teniendo en cuenta los criterios descritos en el acápite III. 2. 1 h). La longitud de los productos amplificados mediante los ensayos descritos en los acápites III. 4. 1 c) al III. 4. 1. f) aparecen en la tabla 10.

Tabla 10. Longitud de los productos de amplificación en los ensayos de TR-RCP anidado múltiple para virus influenza, TR-RCP para el gen de la proteína M, TR-RCP anidado múltiple para el subtipado de los virus influenza A y TR-RCP para el gen de la HA del virus influenza A (H1N1) pdm09.

Virus	Gen	Longitud (pb)
Influenza A	NP	301
Influenza A	M	244
Influenza A H3	HA	1 100
Influenza A H1	HA	980
Influenza A H1 pandémico	HA	292

Fuente: (Coiras y cols., 2003; Ruiz-Carrascoso y cols., 2010; Valdés y cols., 2011; WHO, 2005).

III. 4. 1. i) Secuenciación de ácidos nucleicos.

Para confirmar la identidad del producto amplificado en los ensayos descritos previamente (acápites III. 4. 1 c) al III. 4. 1. e) e identificar al virus pandémico, se estableció que las muestras positivas a virus influenza A subtipadas como A (H1) se procesaran mediante secuenciación nucleotídica adicional. Se emplearon los juegos de cebadores utilizados en las reacciones específicas de amplificación para el gen de la NP (Anexo 2) y el gen de la proteína M (M30F2/08 y M264R3/08). La secuenciación de un segmento del gen de la HA se realizó previa RCP semi-anidada empleando el producto de la reacción de TR-RCP descrita en el acápite III. 4. 1 e). La composición de la mezcla de la reacción fue similar a la de la reacción anidada descrita en el acápite III. 2. 1 e) a excepción de los cebadores: PHA1+ y H1-ASEQ que se utilizaron a una concentración de 10 pmol/ μ L. Las condiciones de amplificación fueron las utilizadas en la RCP anidada descrita en el acápite III. 4. 1 e).

III. 4. 1. j) Detección del producto amplificado.

La detección del producto amplificado de la reacción semi-anidada se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito en el acápite III. 2. 1 h) y la longitud del segmento amplificado fue de 983 pb.

III. 4. 1. k) Purificación de los productos de amplificación.

Se realizó la purificación manual de los productos amplificados mediante el procedimiento descrito en el acápite III. 2. 2 b). Para evaluar la calidad y estimar la concentración de los productos purificados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% siguiendo la metodología descrita en la sección III. 2. 1 h).

III. 4. 1. l) Reacción de secuenciación nucleotídica.

Los productos purificados se secuenciaron en ambos sentidos empleando los juegos de cebadores mencionados en el acápite III. 4. 1. i) a una concentración de 0,5 pmol/ μ L. Para la reacción de secuencia y la

purificación de los productos de secuencia se empleó el estuche comercial Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start, (Beckman Coulter), siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó en un secuenciador automático Beckman Coulter modelo CEQ 8800 utilizando el método LFR-b y el procedimiento de análisis de datos para productos de RCP en el Departamento de Virología del IPK.

III. 4. 1. m) Análisis de las secuencias nucleotídicas.

Las secuencias obtenidas se analizaron primeramente empleando el programa CHROMAS (versión 1.3). El ensamblaje de las secuencias de las cadenas positivas y negativas y su edición se realizó manualmente, usando el programa Bioedit version 7.0.1 obteniéndose las secuencias consenso. Para confirmar la identidad de las mismas se realizó la comparación de la secuencia nucleotídica mediante BLAST (siglas del inglés, Basic Local Alignment Search Tool), con las secuencias disponibles en las bases de datos del GenBank (NCBI, Bethesda, MD), EpiFlu y GISAID (siglas del inglés, Global Initiative Share Avian Influenza Data).

III. 4. 1. n) Diagnóstico diferencial con otros virus respiratorios.

Para el diagnóstico etiológico diferencial con otros virus respiratorios (influenza B, influenza C, AdvH, VPI 1-4, CoVH OC43, CoVH 229E, EV, RV, VSRH A y B, MPVH y BoVH) se emplearon los protocolos y procedimientos descritos en los acápites III. 2. 1 e), III. 2. 1 f), III. 3. 2 e) (205, 206, 212, 213).

III. 4. 1. ñ) TR-RCP en tiempo real para el diagnóstico de influenza A (H1N1) pdm09.

En el algoritmo diagnóstico se incluyó un ensayo de TR-RCP en tiempo real para la detección y caracterización del nuevo virus influenza, normalizado por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta, EUA (CDC, siglas del inglés Center for Diseases Control), recomendado y distribuido por la OMS a los CNI (218). Para la mezcla de la reacción de este ensayo se empleó el estuche comercial de TR-RCP cuantitativo Superscript III Platinum One Step Quantitative, (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del productor y las descritas en el protocolo original. Los cebadores y las sondas de hidrólisis Taqman con marcación doble aparecen descritos en el Anexo 6. Todas las muestras fueron examinadas de manera independiente con cada juego de cebador y sonda específica.

A cada tubo que contenía la mezcla de la reacción se le adicionaron 5 µL del ácido nucleico previamente extraído. La reacción de amplificación se llevó a cabo a 50 °C durante 30 minutos, seguida de un paso de inactivación de la enzima TR a 95 °C durante 2 minutos, y 45 ciclos de amplificación consistentes en: 95 °C durante 15 segundos y 55 °C por 30 segundos en un equipo Applied Biosystem real-time PCR systems modelo 7500 Fast (Applied BioSystem). El producto de la reacción se analizó a través del programa Fast System SDS versión 2.0.1.

Controles del ensayo.

- Control positivo: Consistió en 10 copias de productos clonados en el vector pGEM-T (Promega) a partir de productos de amplificación de los genes de la proteína M y de la HA del virus influenza A (H1N1) pdm09 donados por el Laboratorio Nacional de gripe y virus respiratorios del ISCIII.

- Controles negativos: Consistió en agua destilada estéril libre de nucleasas (Sigma) y una muestra clínica respiratoria negativa para los virus influenza A, las cuales se procesaron siguiendo el procedimiento utilizado para todas las muestras clínicas.

Criterios para la interpretación del resultado.

- Muestra negativa: Solo se visualizó curva de fluorescencia en la reacción de amplificación sobrepasando la línea umbral con los juegos de cebadores específicos para el gen humano RNasa P antes o durante el ciclo 35 de amplificación.
- Muestra positiva a virus influenza A (H1N1) pdm09: Se visualizaron 4 curvas de fluorescencia antes o durante el ciclo 35 en las reacciones de amplificación independientes, empleando los juegos de cebadores específicos para la detección de virus influenza A universal, influenza A porcina universal e influenza A porcina H1 y el juego de cebadores para el gen humano RNasa P.
- Muestra positiva a virus influenza A: Se visualizaron 2 curvas de fluorescencia antes o durante el ciclo 35 en las reacciones de amplificación independientes, empleando los juegos de cebadores específicos para la detección de virus influenza A universal y el juego de cebadores para el gen humano RNasa P.
- Muestra inhibida: No se visualizó curva de fluorescencia en la reacción de amplificación empleando los juegos de cebadores específicos para el gen humano RNasa P.

Todos los procedimientos se realizaron tomando en cuenta las recomendaciones establecidas para evitar las contaminaciones (207).

III. 4. 2 Estudio de la circulación del virus influenza con potencial pandémico.

III. 4. 2 a) Universo de estudio.

El universo estuvo constituido por todas las muestras clínicas respiratorias recibidas en el LNR, en el período comprendido entre el 28 de abril del año 2009 y el 10 de agosto del año 2010 que cumplieron con los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

- Toda muestra clínica colectada durante los primeros 7 días posteriores al inicio de los síntomas a partir de los pacientes que cumplieron con las definiciones de caso establecidas por el MINSAP.
- Muestra clínica correctamente identificada y acompañada de un modelo oficial de colecta de muestra para el estudio microbiológico completado (Anexo 5).
- Muestra transportada al laboratorio a 4°C en el sistema de triple embalaje.

Las definiciones de caso empleadas se corresponden con las elaboradas por la Dirección Nacional de Epidemiología (DNE) del MINSAP para el manejo y clasificación de los casos, presentes en el acápite 11 del “Plan Nacional para el enfrentamiento de la pandemia por influenza A (H1N1)” (219).

- Caso sospechoso de infección por el virus influenza A (H1N1) pdm09: Individuo que reúna al menos dos de los siguientes síntomas: Aparición súbita de fiebre $\geq 38^{\circ}\text{C}$, tos, dolor de garganta, rinorrea o congestión nasal, disnea o dificultad respiratoria grave con necesidad de hospitalización.

- Caso fallecido por una IRAG sin causa aparente que cumpla al menos una de las siguientes condiciones: Contacto con personas que hayan padecido la enfermedad, antecedentes de haber viajado en los últimos 15 días a alguno de los países que han reportado casos confirmados de influenza pandémica.

- Caso de IRAG en niños con < 5 años de edad: Todo niño menor de 5 años edad en el que se sospeche clínicamente la presencia de neumonía y requiera de ingreso hospitalario.

- Caso de IRAG en pacientes \geq de 5 años de edad: Paciente con aparición súbita de fiebre $\geq 38^{\circ}\text{C}$, tos, dolor de garganta, disnea o dificultad para respirar con necesidad de hospitalización, que en el momento del ingreso no tiene definida la etiología (48).

III. 4. 2. b) Marco muestral.

Se estudiaron 14 510 muestras clínicas procedentes de 14 396 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión.

Para cada una de las muestras estudiadas se analizaron las variables que se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Descripción de las variables de estudio.

Variable	Rango de Categorías.	Definición operacional.
Provincia	División político administrativa actual del país.	Corresponde a la ubicación del paciente al momento del diagnóstico clínico.
Historia de viaje anterior	Si, No	Arribo procedente del extranjero en los últimos 15 días previos a la encuesta.
Diagnóstico clínico	Si, No	Evaluated mediante interrogatorio, examen físico y complementarios, según criterio del facultativo que completa la indicación del diagnóstico de laboratorio microbiológico.
Brote	Si, No	Evaluated mediante definición establecida según criterio del epidemiólogo designado.
Embarazo	Si, No	Evaluated mediante interrogatorio y examen físico, según criterio del facultativo que completa la indicación del diagnóstico de laboratorio microbiológico
Fallecido	Si, No	Evaluated mediante examen físico y emisión del certificado de defunción.

Fuente: Registro de datos de los LNR, IPK

III. 4. 2. c) Procesamiento de las muestras clínicas.

Las muestras clínicas consistieron en ENF (13 518) y AB (301) colectados en medio de transporte universal para virus (UTM, siglas del inglés, Universal Transport Médium) comercial. Un tercer tipo de muestra estudiada fue el tejido de pulmón (691) obtenido por necropsia. Esta consistió en un fragmento de tejido de aproximadamente 2 cm² embebido en 5 mL de solución salina fisiológica estéril en un frasco estéril o en medio de transporte universal para virus (UTM, siglas del inglés, Universal Transport Médium). Las mismas se procesaron siguiendo el procedimiento descrito en el acápite III. 2. 1 b). Un segundo procedimiento se utilizó para el procesamiento de las muestras de necropsia al disponer del equipo automático TissueLyser (Qiagen) para desintegrar tejidos, siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Todas las muestras se dispensaron en dos alícuotas en tubos de congelación de 2 mL (Greiner). Una de ellas se procesó de manera inmediata mediante el algoritmo establecido y el resto se conservó a -70 °C para procesamientos posteriores.

III. 4. 2. d) Diagnóstico del virus influenza con potencial pandémico.

El total de las muestras clínicas se procesó mediante el algoritmo que fue elaborado en el acápite III. 4. 1.

III. 5 Procedimiento para la recolección y análisis de la información de los estudios descritos en los acápites III. 2. 1, III. 3. 2 y III. 4. 2.

Los datos clínicos y epidemiológicos se recolectaron a partir del Modelo para la colecta de muestras y la revisión de historias clínicas. Los mismos se introdujeron en una base de datos en Microsoft Excel. Para el análisis estadístico sobre la asociación entre las manifestaciones clínicas de la infección y la positividad a los AdVH en pacientes vivos y fallecidos a causa de un SFAI, la asociación entre el diagnóstico clínico y la positividad a MPVH y BoVH, la asociación entre positividad a estos agentes y grupos de edades, así como entre variables clínicas y epidemiológicas y la confirmación de la infección por el virus influenza A (H1N1) pdm09; se aplicaron las pruebas X^2 de Pearson y Prueba exacta de Fisher (en el caso de existir una celda con una frecuencia esperada menor de 5) (220) mediante el programa Epidat versión 3.1. En todos los estudios se consideró un nivel de significación de $p < 0,05$.

En el estudio descrito en el acápite III. 4. 2 se calculó la tasa de incidencia del virus influenza A (H1N1) pdm09 en todas las provincias del país considerando las recomendaciones de la OMS (221). La información sobre el total de casos por provincia se obtuvo del registro de datos del laboratorio y los estimados poblacionales por provincia se tomaron de los emitidos por la Oficina Nacional de Estadísticas (222). Para calcular, comparar y visualizar los valores de las tasas de incidencia se empleó el programa del Sistema de Información Geográfica SIGEpi versión 1.0.

III. 6 Consideraciones éticas

Los estudios que integran la presente investigación constituyeron algunas de las tareas de dos proyectos de investigación internacionales: “Implementación de un protocolo genérico para la vigilancia de la Influenza” y “Fortalecimiento del diagnóstico virológico para la vigilancia de los virus influenza y otros virus respiratorios en Cuba”. Ambos fueron aprobados por la Comisión Científica Especializada de Microbiología, Consejo Científico Institucional, Comité de ética, autoridades correspondientes del MINSAP y del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente.

Para la obtención de la información contenida en las historias clínicas de los pacientes con diagnóstico de SFAI archivadas en los diferentes hospitales pediátricos de La Habana se contó con la aprobación de los directores de estas instituciones y de los jefes de departamento de archivo, previa presentación de una carta oficial de solicitud por parte del LNR de virus respiratorios del IPK.

Los resultados diagnósticos de la identificación de los virus respiratorios emergentes (MPVH, BoVH e influenza A (H1N1) pdm09) formaron parte de la vigilancia nacional de los LNR y fueron informados a la DNE, médicos de asistencia y pacientes o tutores.

Toda la información obtenida de los pacientes fue anónima, estrictamente confidencial y solo fue utilizada con fines investigativos, garantizando la seguridad del paciente.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Identificación del posible agente viral causante de un brote de SFAI.

En julio del año 2005, el Huracán Dennis afectó la costa Norte de la región Occidental de Cuba. Posterior a este evento meteorológico, los LNR del IPK emitieron una alerta al MINSAP sobre el incremento en la recepción de muestras de pacientes pediátricos de la provincia La Habana con diagnóstico de síndrome febril acompañado de vómitos, diarrea y signos de bajo gasto cardíaco, algunos de ellos fallecidos a consecuencia de choque cardiogénico. Se creó una comisión integrada por pediatras, epidemiólogos y patólogos para la investigación de lo que se denominó brote de SFAI. El análisis anatomopatológico de las muestras de tejido de pulmón y corazón sugirió la posible etiología viral de este síndrome, atribuyéndose como causa de muerte una miocarditis. A los LNR del IPK correspondió la investigación etiológica de dicho brote, la cual incluyó estudios bacteriológicos y virológicos.

Como resultado del procesamiento de 64 muestras clínicas procedentes de 44 pacientes (8 de estos fallecidos) con edades comprendidas entre 5 meses y 14 años, se detectó un segmento del genoma de AdvH en 31 (48,4%) de las muestras procedentes de 23 pacientes (52,2%). Considerando el tipo de muestra, se amplificó un segmento de ADN de los AdvH en 17 (80,9%) muestras de ENF, 4 (50%) de heces, 6 (75%) de tejido de músculo cardíaco y 4 (50%) de tejido pulmonar (tabla 12).

No se detectó otro agente viral mediante la aplicación de los ensayos de RCP para la detección de un segmento del genoma viral de influenza A, B y C, VSRH, VPI tipo 1-4, CoVH OC43, CoVH 229E, RV y EV.

Tabla 12. Distribución de los tipos de muestras procesadas y positividad a los AdVH.

Tipo de muestra	No de muestras procesadas	Muestras positivas a los AdVH No (%)
tejido de pulmón	8	4 (50)
tejido de corazón	8	6 (75)
tejido de hígado	6	0
tejido de bazo	2	0
tejido de cerebro	2	0
tejido de riñón	1	0
ENF	21	17 (80,9)
suero	2	0
heces	8	4 (50)
LCR	6	0
Total	64	31 (48,4)

Fuente: Registro de datos de los LNR, IPK.

En la tabla 13 se muestran los signos y síntomas referidos en el Modelo de colecta de muestra e historia clínica de los pacientes estudiados con el diagnóstico clínico-epidemiológico de SFAI y en los cuales se detectó en las muestras clínicas estudiadas un segmento del ADN de los AdVH.

En el 100% de los pacientes vivos positivos a los AdVH aparece referido la fiebre y una gran proporción de ellos refirió también síntomas generales. La presencia de vómitos, diarreas y oliguria se asoció significativamente con la detección del genoma viral, sugiriendo que en este grupo de pacientes predominaron los síntomas gastrointestinales. La presencia de oliguria en los pacientes vivos pudiera atribuirse a la deshidratación resultante del cuadro diarreico (tabla 13).

En la totalidad de los pacientes fallecidos positivos a los AdVH, se recogió información sobre la presencia de síntomas generales, disnea y signos de bajo gasto cardíaco. Una asociación estadísticamente significativa solo se demostró para la presencia de disnea, no obstante, la tos y la faringitis estuvieron presentes en el 66,6% y 83,3% de los pacientes, respectivamente (tabla 13). Estos resultados sugieren que las manifestaciones respiratorias y las resultantes de la afectación cardiovascular predominaron en el cuadro clínico presente en el grupo de niños fallecidos.

Tabla 13. Signos y síntomas asociados a SFAI en los pacientes cuyas muestras resultaron positivas a los AdvH.

Signos y Síntomas.	Pacientes vivos (%) (n=17)	Pacientes fallecidos (%) (n=6)	Valor de p*
Fiebre	17 (100)	6 (100)	-
Malestar General	15 (88,2)	6 (100)	1,00
Anorexia	11 (64,7)	6 (100)	0,14
Vómitos	17 (100)	2 (33,3)	0,00
Diarreas	17 (100)	2 (33,3)	0,00
Oliguria	14 (82,3)	2 (33,3)	0,04
Tos	6 (35,2)	4 (66,6)	0,34
Disnea	3 (17,6)	6 (100))	0,00
Faringitis	7 (41,1)	5 (83,3)	0,15
Signos de bajo gasto cardíaco	10 (58,8)	6 (100)	0,12

Leyenda: *Prueba exacta de Fisher. Significativo valor de $p \leq 0,05$

Fuente: Registro de datos de los LNR, IPK

Se detectó a los AdvH como único agente en 5 muestras de tejido de pulmón y 6 de músculo cardíaco. La secuenciación de ácidos nucleicos de un segmento de la proteína del hexón de los AdvH amplificado en dichas muestras, permitió la confirmación de la identidad de un segmento de 370 pb. La identificación específica de la especie y serotipo de los AdvH detectados mediante BLAST (siglás del inglés, Basic Local Alignment Search Tool.) del segmento secuenciado a partir de las muestras de tejidos, mostró entre un 98% y un 100% de identidad de la secuencia nucleotídica con secuencias de AdvH especie C serotipo 5, publicadas en la base de datos del GenBank (tabla 14). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en dicha base de datos con los siguientes números de acceso: EU179786 al EU179791.

Tabla 14. Resultados del diagnóstico mediante RCP anidada y secuenciación nucleotídica a partir de las muestras de pacientes fallecidos.

Número de paciente	Tejido de pulmón	Tejido del miocardio	APP*	Tipado (Especie/Género)
1	Negativo	Positivo	NR** miocardiopatía dilatada	<i>Especie C</i> serotipo 5
2	Positivo	Positivo		<i>Especie C</i> serotipo 5
3	Positivo	Positivo	NR**	<i>Especie C</i> serotipo 5
4	Positivo	Positivo	esplenectomía	<i>Especie C</i> serotipo 5
5	Negativo	Positivo	sickleemia	<i>Especie C</i> serotipo 5
6	Positivo	Positivo	beta talasemia	<i>Especie C</i> serotipo 5
7	Negativo	Negativo	epilepsia	Negativo
8	Negativo	Negativo	NR**	Negativo

Leyenda: APP* (Antecedentes patológicos personales), NR** (No referidos).

Fuente: Registro de datos de los LNR, IPK.

Los hallazgos relacionados con la detección e identificación posterior mediante secuenciación nucleotídica del genoma viral de *adenovirus C* serotipo 5 en el tejido del músculo cardíaco de 6 (75%) niños fallecidos con diagnóstico clínico y anatomopatológico de miocarditis viral, confirman a este virus como el agente causal de dicha enfermedad. En la literatura médica se describe que la miocarditis puede ser atribuida a múltiples causas, entre las que se encuentran: trastornos reumatológicos, alérgicos, medicamentos específicos, toxinas y agentes infecciosos (223). La frecuencia de detección de los agentes infecciosos varía ampliamente desde un 10% hasta un 100% (34, 41, 224). Entre los agentes infecciosos involucrados en la etiología de la miocarditis se encuentran los virus, bacterias, rickettsias, hongos y protozoos (224, 225). A pesar de que los EV son considerados los responsables de más del 50% de los casos, en los últimos años, los AdvH se notificaron como una causa frecuente de miocarditis (38, 226). Considerando estos antecedentes, los resultados obtenidos no son sorprendentes.

La presentación clínica caracterizada por descompensación cardíaca aguda que progresó a la muerte en los 8 pacientes estudiados fue severa y 5 (62,5%) de ellos presentaban un antecedente patológico subyacente (tabla

14). Diversos autores publican que la miocarditis viral se caracteriza por presentaciones clínicas diferentes en el rango de un síndrome viral inespecífico, arritmia cardíaca, fallo cardiovascular o muerte, dependiendo de la edad de los pacientes (38, 224). Particularmente, en los pacientes pediátricos, es frecuente el debut con fallo cardíaco agudo y choque cardiogénico, siendo un factor determinante la existencia de enfermedades subyacentes (225, 227). Clínicamente, las infecciones por los AdVH varían en severidad, desde una infección inaparente o ligera a otras de mayor severidad como las que se producen en pacientes inmunocomprometidos (lactantes, pacientes con sida, receptores de trasplante) y en aquellos con enfermedades crónicas de base (78, 228).

En este estudio empleamos dos métodos de amplificación de ácidos nucleicos (RCP y secuenciación nucleotídica) para la identificación del agente causal de la miocarditis en el tejido de músculo cardíaco de casos fatales. La literatura médica consultada plantea que el diagnóstico convencional de la miocarditis aguda en los niños, está basado en el uso de los criterios histológicos de Dallas (40) por el examen histopatológico de las muestras de biopsia del miocardio y su interrelación con los criterios clínicos. Este procedimiento resulta difícil en los casos no fatales y posee una sensibilidad y especificidad limitada (37). El desarrollo de las técnicas de biología molecular y su empleo en la práctica del diagnóstico, posibilita el estudio de la etiología viral de múltiples enfermedades cardiovasculares y en la actualidad, la RCP es considerada la herramienta más sensible para estos propósitos (37, 229).

En Cuba, solo existe un reporte de un brote de miocarditis aguda ocurrido en el año 1972 (230). En el mismo no se produjeron casos fatales y se identificó el virus Coxsackie B como el agente etiológico.

Los resultados presentados constituyen el primer reporte de la detección de los AdVH asociados a un brote de miocarditis aguda fatal en Cuba empleando técnicas de diagnóstico molecular.

La secuenciación nucleotídica de un segmento de 370 pb de la proteína del hexon de los AdVH a partir de 9 (52,9%) de las muestras clínicas de ENF permitió comprobar la identidad del producto amplificado. La comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias publicadas en la base de datos del GenBank, evidenció la existencia de entre un 95% y un 100% de identidad con los virus prototipos de AdVH *especie D*. Los alineamientos múltiples de las secuencias de los serotipos representativos de esta especie (32 serotipos) y la evaluación de la relación filogenética entre los mismos y las secuencias obtenidas a partir de las muestras clínicas no permitieron la asignación del serotipo (figura 1).

Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos de secuencia del GenBank con los números de acceso: EU179756, EU179757, EU179759, EU179763, EU179765, EU179768, EU179770, EU179771 y EU179775.

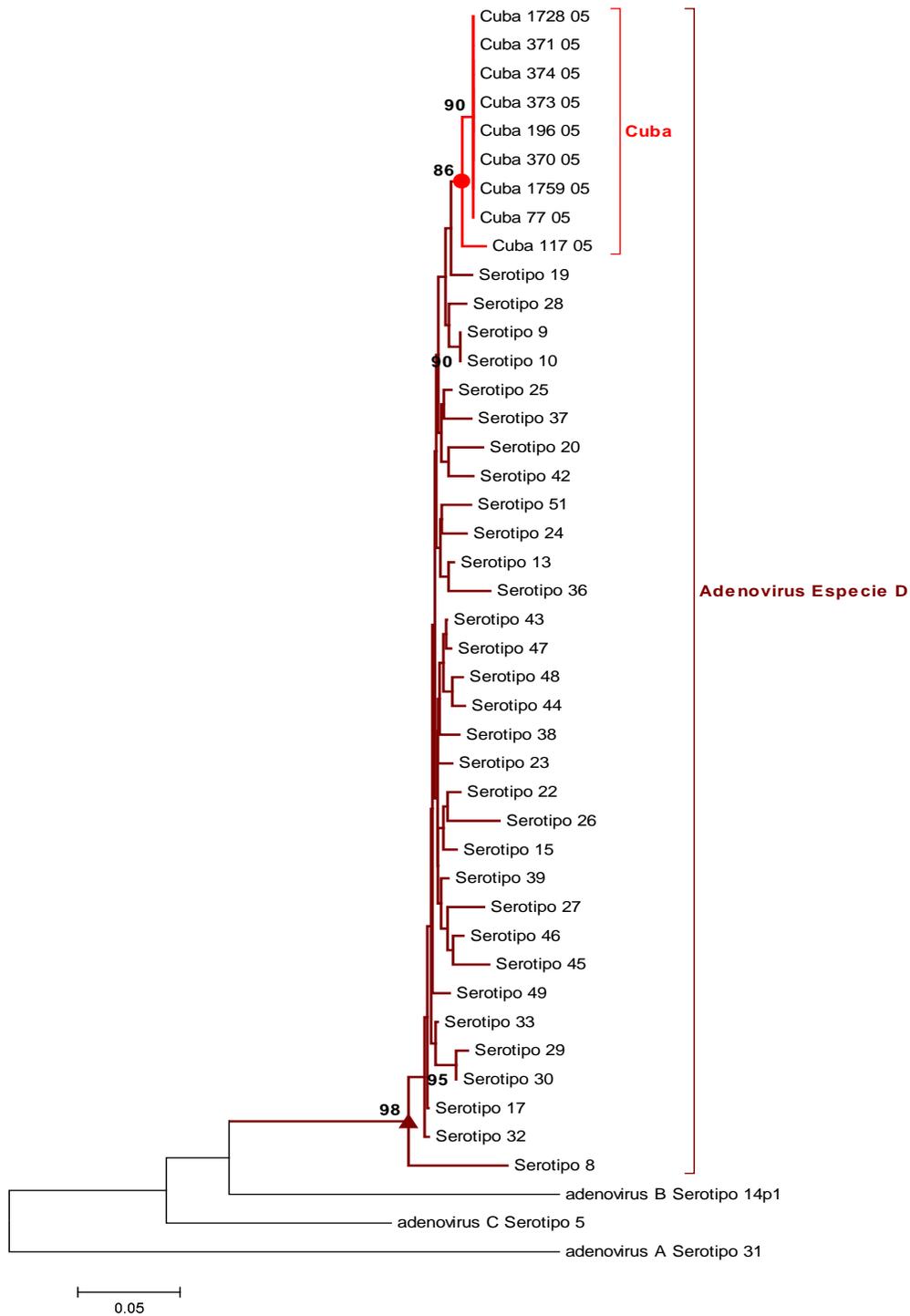


Figura 1. Árbol filogenético basado en alineamientos de las secuencias de los productos de amplificación de un segmento de la proteína del hexón de los AdVH detectados en 9 muestras de ENF de pacientes vivos.

Fuente: Registro de datos de los LNR, IPK

La gran variedad de los AdvH existentes que incluyen 51 serotipos pertenecientes a 6 especies (A-F), se asocian a un gran número de infecciones que afectan varios sistemas y órganos, produciendo casos esporádicos y brotes (77, 228, 229). A pesar de que existen evidencias de la interrelación entre serotipos y enfermedades específicas, se plantea que esta relación no es estricta (59).

La *especie D* es la mayor y comprende un total de 32 serotipos. Los serotipos más frecuentes son los AdvH 8, 19, 22 y 37 y se asocian con queratoconjuntivitis epidémica en varias partes del mundo (65, 230). En los últimos años, esta especie se identificó con una alta prevalencia en los casos de gastroenteritis viral (231), en infecciones severas en los pacientes inmunocomprometidos (232) y con menor frecuencia en los pacientes con enfermedades respiratorias (74). Las bases moleculares que pudieran explicar estas diferencias en la patogenicidad, son desconocidas.

En Cuba, los AdvH circulan en la población pediátrica durante de todo el año, siendo la *especie C* la más frecuente en la etiología de las IRA. Estudios previos sobre la asociación específica entre los síndromes clínicos y los serotipos de los AdvH demostraron que los serotipos 1 y 6 (*especie C*) fueron los predominantes en los niños con IRA (233), los serotipos 3, 6 y 7b (*especie C*) en pacientes con conjuntivitis folicular (234) y el serotipo 37 (*especie D*) se identificó como causa frecuente de queratoconjuntivitis (235).

A pesar de no lograr la identificación específica del serotipo perteneciente a la *especie D* en la presente investigación, los resultados sugieren que la misma podría estar involucrada en la etiología de lo que se denominó brote de SFAI en los pacientes presuntamente inmunocompetentes con sintomatología gastrointestinal. Este hallazgo inusual amplía el rango de asociación de la *especie D* de los AdvH con síndromes de relevancia clínica y epidemiológica en Cuba y en el mundo.

Hace algunas décadas, los AdvH eran considerados como agentes de poca importancia médica (76). A partir de numerosas investigaciones relacionadas con estos agentes, se han producido muchos cambios (236-238). Recientemente, se han incrementado las publicaciones sobre la identificación de serotipos de AdvH emergentes, circulación de serotipos conocidos con diferente tropismo y manifestaciones clínicas de la infección, variantes genéticas con diferente distribución geográfica y virulencia, recombinaciones entre serotipos, entre otros (17, 18, 239).

La identificación inusual de los AdvH de la *especie D* en esta investigación, asociada con un brote de SFAI con manifestaciones gastrointestinales en pacientes presuntamente inmunocompetentes, pudiera sugerir la posible circulación de una variante emergente de este agente capaz de causar eventos epidemiológicos locales. Estudios futuros son necesarios para completar su caracterización.

Analizando de manera integral los resultados alcanzados en el estudio etiológico del brote de SFAI, consideramos que dos eventos epidemiológicos individuales asociados a los AdVH se produjeron en La Habana, en el mes de julio del año 2005.

IV. 2 Identificación de la circulación de MPVH y BoVH en niños ≤ 5 años de edad con IRA mediante un ensayo de TR-RCP anidado múltiple optimizado.

IV. 2. 1 Desarrollo del ensayo de TR-RCP anidado múltiple para el diagnóstico de VSRH A y B, MPVH y BoVH.

Dentro de las investigaciones de la rama biomédica, aquellas relacionadas con el desarrollo e introducción en el laboratorio de herramientas diagnósticas para identificar el agente causal de una enfermedad constituyen una prioridad para los sistemas de salud. En los últimos años, los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos y en particular la RCP se ha convertido en un procedimiento esencial para el diagnóstico microbiológico (243-245).

Los LNR para los virus influenza y otros virus respiratorios del IPK poseen un algoritmo constituido por varios ensayos de diagnóstico molecular que se aplican en la actualidad para la identificación de varios agentes virales causales de IRA (influenza A (H3N2), A (H1N1), B y C, VSRH A y B, AdVH, VPI 1-4, CoVH OC43 y 229E, EV, RV y MPVH) (205, 206, 212-214). La escasez de muestra clínica y de los recursos materiales, dificultan en ocasiones, el cumplimiento de este algoritmo, particularmente en los pacientes pediátricos, en los que la morbilidad y la mortalidad por las IRA resultan elevadas. A esto se le adiciona la lista creciente de virus respiratorios emergentes que se han detectados circulando mundialmente, asociados con mayor frecuencia a las IRAG en las edades tempranas de la vida (7). Estos hechos orientan hacia la necesidad de continuar perfeccionando los algoritmos para el diagnóstico y la vigilancia de los virus respiratorios (243).

El ensayo de RCP múltiple constituye la herramienta más idónea y menos costosa para vencer esta problemática (246). El desarrollo de esta variante debe seguir un esquema que se inicia con la selección de los patógenos específicos que serán incluidos y excluidos en el ensayo, tomando en consideración que aquellos seleccionados para su inclusión deben poseer tropismo, características clínicas y epidemiológicas similares (183).

El presente estudio se inició con la selección de los VSRH A y B, MPVH y BoVH como los agentes a incluir en un ensayo de TR-RCP anidado múltiple. Para la inclusión del VSRH se consideró que el mismo es el agente etiológico principal de la bronquiolitis y de un número elevado de casos de neumonía en los lactantes

(210, 211) y el MPVH junto con el BoVH son dos virus respiratorios emergentes que circulan mundialmente asociados fundamentalmente a bronquiolitis, neumonía y otras IRA en pacientes pediátricos (126). A esto se adiciona, el antecedente de la disponibilidad en los LNR de protocolos de TR-RCP y RCP anidadas independientes, publicados previamente y aplicados al diagnóstico y la vigilancia de las IRA (205, 212, 213).

La selección de los cebadores a utilizar en una reacción de amplificación es otro de los pasos importantes para el desarrollo de un ensayo de RCP y en particular en los ensayos múltiples se deben evaluar con rigor la longitud de los fragmentos a amplificar y la especificidad de los mismos para cada uno de los agentes (247).

En el presente trabajo se emplearon los juegos de cebadores descritos en los protocolos originales. Un cebador diseñado en este estudio para la reacción anidada (MPVH2- Negativo: 5'-TCT TGC AKA TYY TRC TKA TGC T-3'), posee una longitud de 22 nucleótidos, una temperatura de hibridación de 50°C, 56% de contenido de G/C y no mostró formación de dímeros. El alineamiento del mismo con secuencias publicadas en la base de datos del GenBank demostró complementariedad específica para amplificar un segmento del gen de la proteína M de todos los genotipos del MPVH.

Los experimentos realizados para definir la concentración óptima de los cebadores, la concentración de los componentes (dNTPs, enzima polimerasa) y los diferentes parámetros de la reacción de amplificación (tiempo y temperatura de hibridación y extensión), permitieron obtener la composición definitiva de las mezclas de las reacciones y las condiciones de amplificación del ensayo (tabla 15 y 16).

Después de optimizar las condiciones definitivas, el procesamiento de las diluciones seriadas en base 10 (10^{-1} hasta 10^{-8}) de los controles positivos para cada uno de los agentes, demostró que el límite de detección fue equivalente a 10 copias genómicas para VSRH A y B; 10 copias para MPVH y 20 para BoVH. Estos resultados fueron muy similares a los descritos en los protocolos originales (205, 212, 213).

Tabla 15. Composición de la mezcla para las reacciones de TR-RCP y la RCP anidada del ensayo múltiple optimizado.

Reacción de TR-RCP		Reacción RCP anidada	
Mezcla (Estuche <u>OneStep RT-PCR</u> , Qiagen)	1 tubo de reacción	Mezcla	1 tubo de reacción
Agua destilada libre de nucleasas	15 µl	Agua destilada libre de nucleasas (Sigma)	16,7 µl
Buffer 5X	10 µl	Buffer 5X	10 µl
dNTPs/ 0,1 µM	2 µl	dNTPs/ 0,25 µM	0,8 µl
MPVH1 + (20 pmol/µl)	2 µl	MPVH2 + (20 pmol/µl)	2 µl
MPVH1 - (20 pmol/µl)	2 µl	MPVH2 - (20 pmol/µl)	2 µl
BoVH1 + (20 pmol/µl)	2 µl	BoVH2 + (20 pmol/µl)	2 µl
BoVH1 - (20 pmol/µl)	2 µl	BoVH2 - (20 pmol/µl)	2 µl
VSRH AB + (20 pmol/µl)	2 µl	VSRH A2 + (20 pmol/µl)	2 µl
VSRH AB- (20 pmol/µl)	2 µl	VSRH A2 - (20 pmol/µl)	2 µl
CI1 + (20 pmol/µl)	2 µl	VSRH B2 + (20 pmol/µl)	2 µl
CI1 - (20 pmol/µl)	2 µl	VSRH B2 - (20 pmol/µl)	2 µl
Mezcla de enzimas (TR y Taq DNA polimerasa)	2 µl	CI2 + (20 pmol/µl)	2 µl
Volumen final	45 µl	CI2 - (20 pmol/µl)	2 µl
		<u>AmpliTaq DNAPolymerase</u> (1,25 U) (Applied Biosystems)	0,5 µl
		Volumen final	48 µl

Fuente: LNR, IPK

Tabla 16. Condiciones de amplificación para las reacciones de TR-RCP y RCP anidada del ensayo múltiple optimizado.

Reacción de TR-RCP	Reacción RCP anidada
45 °C - 45 minutos	95 °C - 5 minutos
95 °C - 5 minutos	95 °C - 30 segundos
95°C-30 segundos	55°C - 2 minutos
53 °C - 2 minutos	72 °C - 1 minuto
68 °C - 1 minuto	
68°C - 10 minutos	72 °C - 5 minutos
4 °C	4 °C

Diagrama de agrupación de ciclos:

- Un corchete a la izquierda agrupa las condiciones de TR-RCP: 95°C-30 segundos, 53 °C - 2 minutos, 68 °C - 1 minuto, y 68°C - 10 minutos. Este grupo está etiquetado como "45 ciclos".
- Un corchete a la derecha agrupa las condiciones de RCP anidada: 95 °C - 30 segundos, 55°C - 2 minutos, 72 °C - 1 minuto, y 72 °C - 5 minutos. Este grupo está etiquetado como "35 ciclos".

Fuente: LNR, IPK

En la evaluación de la validez del ensayo optimizado mediante el procesamiento de 183 muestras de ENF aplicando los ensayos de amplificación de referencia individuales y el protocolo de TR-RCP anidado múltiple permitió detectar, posterior a la extracción de ácidos nucleicos 40 muestras clínicas inhibidas como consecuencia de la posible presencia de inhibidores en la muestra clínica por lo que solo fueron analizadas 143 muestras. La comparación de los resultados de la concordancia entre ambos ensayos de manera individual para los diferentes agentes se muestra en el Anexo 7. Los mismos se emplearon para el análisis de la sensibilidad, especificidad, índice de validez, VPP y VPN (tabla 17).

Como se observa en la tabla 17, los resultados de la sensibilidad fueron del 100% para los tres agentes y los de las especificidades superiores al 99%. Los mismos son comparables a los publicados por otros autores, incluyendo algunos que evaluaron protocolos de TR-RCP en tiempo real (248-250).

Los resultados del ensayo de especificidad demostraron la ausencia de reacciones inespecíficas en ambos ensayos. Solamente se obtuvieron productos de amplificación específica con la longitud del segmento correspondiente para los virus dianas (VSRH A, VSRH B, MPVH y BoVH), observándose las bandas nítidas y con buena intensidad.

Tabla 17. Resultados de la evaluación de la validez del ensayo de TR-RCP anidado múltiple para MPVH, VSRH y BoVH.

	MPVH		VSRH		BoVH	
	Valor (%)	IC* (95%)	Valor (%)	IC* (95%)	Valor (%)	IC* (95%)
Sensibilidad	100,0	93,75 - 100,0	100,0	98,28 - 100,0	100,0	91,67-100,0
Especificidad	99,26	97,44 - 100,0	99,12	96,97 - 100,0	100,0	99,64 - 100,0
Índice de validez	99,30	97,59 - 100,0	99,30	97,59 - 100,0	100,0	99,65 - 100,0
VPP**	88,89	62,80 - 100,0	96,67	88,58 - 100,0	100,0	91,67 - 100,0
VPN***	100,0	99,63 - 100,0	100,0	99,56 - 100,0	100,0	99,64 - 100,0

Leyenda: IC* (Intervalo de Confianza), VPP** (Valor predictivo positivo), VPN*** (Valor predictivo negativo)

Fuente: LNR, IPK

Varios estudios confirman que los métodos de amplificación de ácidos nucleicos de agentes microbianos (RCP, TR-RCP, TR-RCP en tiempo real) constituyen métodos diagnósticos rápidos, sensibles y de gran valor para la identificación de los virus emergentes; particularmente cuando el cultivo del organismo es lento o no es posible. Los resultados de esta investigación, se suman a la lista de investigaciones previas para corroborar dicho planteamiento (245, 251, 252).

En el presente estudio se logró optimizar un ensayo de TR-RCP anidado múltiple que permite diagnosticar de manera sensible y específica en un mismo tubo de reacción, tres agentes (VSRH, MPVH y BoVH) asociados a un mismo síndrome, acortando el tiempo para el diagnóstico, disminuyendo los costos de las determinaciones y posibilitando detectar la presencia de coinfecciones. La información rápida y segura sobre los agentes etiológicos virales de las IRA al médico de asistencia, permite un mejor manejo de los casos y la implementación de las medidas terapéuticas adecuadas; evitando la prescripción indiscriminada de antibióticos y disminuyendo los costos por hospitalización.

El empleo del ensayo optimizado para la vigilancia de la circulación de dos virus respiratorios emergentes (MPVH y BoVH) en Cuba, posibilitará realizar una alerta temprana a las autoridades nacionales de salud sobre eventos epidemiológicos que surjan relacionados con estos agentes, facilitando la ejecución rápida de un plan de medidas para la prevención y el control efectivo de los mismos.

IV. 2. 2 Identificación de la circulación de MPVH y BoVH en niños ≤ 5 años de edad con IRA

El procesamiento de 1001 muestras clínicas respiratorias colectadas de pacientes con edades comprendidas entre 8 días de nacido y 5 años mediante el ensayo de TR-RCP anidado múltiple para el diagnóstico del VSRH, el BoVH y el MPVH, demostró que el 20,4 % (n=205) de dichas muestras resultaron positivas a uno o más de los virus respiratorios estudiados.

El 70,2% (n=144) de las muestras positivas correspondió a infecciones simples. El virus más frecuente en este tipo de infección fue el VSRH (n=72). El BoVH ocupó el segundo lugar al ser identificado en 47 muestras y el MPVH se detectó como único agente en muestras de 25 pacientes.

La presencia de más de uno de los virus respiratorios diagnosticados se encontró en el 29,7% (n=61) de las muestras clínicas respiratorias. El virus más frecuente detectado en infecciones múltiples fue el VSRH (n=55, 90,1%). La coinfección doble observada con una frecuencia mayor fue entre el VSRH A y B (n=34, 55,7%). En orden de frecuencia otras coinfecciones con el VSRH detectadas fueron: MPVH (n=9, 14,7%) y BoVH (n=4, 6,5%). La detección simultánea del MPVH y el BoVH estuvo presente en 6 muestras (9,8%). En 8 (13,1%) de las muestras positivas a más de un virus respiratorio, se observó la amplificación específica para tres agentes distintos.

Está establecido que la mayoría de las IRA están causadas por un virus, sin embargo hasta en un tercio de los casos no se consigue demostrar ningún agente etiológico (3). 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 el porcentaje de infecciones en las cuales no se había identificado su etiología (8, 11, 12). En este estudio, el empleo del ensayo de TR-RCP anidado múltiple optimizado en los LNR, permitió la identificación en Cuba de la circulación de dos virus respiratorios emergentes (BoVH y MPVH) a partir de su detección en muestras respiratorias de niños con IRA.

En la figura 2 se muestra la distribución de los porcentajes de positividad al VSRH, MPVH y el BoVH respecto al total de las muestras estudiadas. El MPVH se detectó en el 4,7% (n=48) y el BoVH en el 6,4 % (n=65) de las muestras.

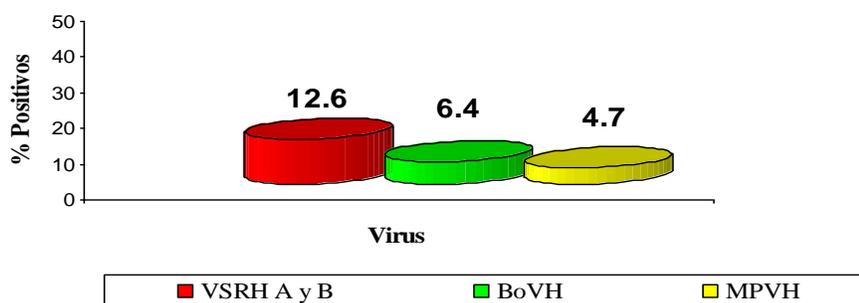


Figura 2. Porcentaje de positividad a los virus respiratorios investigados en muestras de niños con ≤ 5 años de edad y diagnóstico clínico de IRA, diciembre 2009-diciembre 2010.

Fuente: Registro de datos de los LNR, IPK

Desde la detección por primera vez del MPVH en el año 2001 en Holanda, se han publicado varios estudios sobre su identificación en muestras clínicas respiratorias con cifras muy variables (1,5% a 25%) en cuanto a su prevalencia en las IRA pediátricas (253-255). Por otro lado, desde la descripción inicial del BoVH, se notificó la circulación de este virus emergente en todos los continentes con cifras de incidencia que oscilan entre el 1,5% y el 19% (256-258). Para ambos agentes, la metodología y los criterios diferentes de selección de los casos en los estudios publicados determinan que los resultados de las distintas series sean difíciles de comparar.

En algunos estudios solo se investiga la presencia del MPVH en las muestras respiratorias de los niños hospitalizados detectándose los porcentajes más altos (14%-17%) (259, 260), mientras que en otros, sólo se investigan las muestras negativas para otros virus respiratorios y los porcentajes son inferiores (6%-11%) (261, 262). Otro factor a considerar es la edad de los pacientes incluidos en los estudios. Aunque el MPVH puede afectar a personas de todas las edades, su incidencia es máxima en los niños menores de 3 años (98). Por ello, los estudios que incluyen a este grupo de pacientes, encuentran al MPVH en porcentajes superiores (17%-25%) (260, 263) en comparación a los que incluyen niños mayores de 5 años y adultos (1,5%-5,5%) (264, 265). Por último, la circulación estacional del MPVH también puede contribuir a que se obtengan resultados muy diferentes dependiendo de si se estudia solo la temporada epidemiológica de las IRA o no.

El porcentaje de detección del BoVH en este estudio fue similar al encontrado en Australia (5,6%) (266), en el sur de Brasil (6%) (267) y en la India (7,2%) (256). Sin embargo, en Canadá se encontró un porcentaje

inferior (1,5%), al investigar pacientes con IRA hospitalizados y ambulatorios de todas las edades (137). Por otro lado, en Finlandia se detectó un segmento del genoma del BoVH en el 19% de los niños entre 3 meses y 5 años de edad hospitalizados por un episodio de sibilancia (125).

Una característica distintiva del BoVH es la alta frecuencia de coinfección con otros virus respiratorios (268). En los resultados presentados se detectó un segmento del ADN del BoVH en el 29,5% (n=18) de las coinfecciones. En varios países, los estudios realizados encontraron porcentajes de coinfección variables, con valores que oscilan entre un 5% y un 60% de los casos (269, 270). El rango amplio está relacionado con los tipos de estudios realizados, el número de virus investigados y la sensibilidad de los ensayos utilizados. En los últimos años, debido a la investigación sistemática de las muestras respiratorias mediante los ensayos de RCP múltiple para el diagnóstico de los virus respiratorios, la detección de coinfecciones resulta frecuente (271-273).

A pesar de los estudios que avalan la frecuencia de las coinfecciones virales en el diagnóstico etiológico de las IRA, no está completamente dilucidado cual es el papel que juegan los virus detectados simultáneamente en un mismo paciente. Podrían representar infecciones concurrentes, secuenciales o simplemente, un estado de portador asintomático de uno o más agentes virales. Se desconoce si en el caso de las IRA, un virus es capaz de facilitar o antagonizar la infección simultánea de otro virus en el mismo hospedero (271, 274, 275).

El diagnóstico clínico más común en los pacientes estudiados fue la ITRI que representó el 73,6% (n=737) del total de los casos. Dentro de este grupo de pacientes, el diagnóstico de neumonía y bronquiolitis estuvo presente en 190 (25,7%) y 76 (10,3%) niños, respectivamente. En el 26,3% (n=264) de la población estudiada se diagnosticó clínicamente una ITRS. En esta población, el BoVH fue el agente más común. El MPVH fue el segundo virus detectado con mayor frecuencia en niños con diagnóstico clínico de bronquiolitis (tabla 18).

La presencia de un segmento del ADN del BoVH como único agente en niños con diagnóstico de neumonía ($p=0,02$) e ITRS ($p=0,00$) resultó ser estadísticamente significativo. Por otra parte, a pesar de no detectarse asociación estadística significativa, se detectó un segmento del genoma del BoVH en muestras de pacientes con diagnóstico clínico de bronquiolitis y otras infecciones del tracto respiratorio inferior (tabla 18).

Los datos disponibles en la literatura acerca de las manifestaciones clínicas asociadas con la infección por el BoVH destacan la bronquiolitis, la neumonía, la sibilancia y la exacerbación de crisis de asma como diagnósticos clínicos frecuentes (138, 276, 277). Este estudio, forma parte de la vigilancia de laboratorio, por lo que algunos datos clínicos recogidos en el modelo de colecta de muestra para estudio microbiológico podrían estar ausentes para permitimos realizar conclusiones definitivas sobre la asociación de la infección por el BoVH con la diversidad de diagnósticos clínicos encontrados.

Tabla 18. Distribución de la positividad al BoVH y MPVH en niños ≤ 5 años de edad con diferente diagnóstico clínico entre diciembre 2009-diciembre 2010.

Diagnóstico clínico	Muestras procesadas	Total de muestras positivas (%)	BoVH		MPVH	
			No. muestras positivas (%)	Valor de p ^{****}	No. muestras positivas (%)	Valor de p ^{****}
I TRI*	471	46 (9,7)	18 (39,1)	0,27	4 (8,6)	0,00
neumonía	190	20 (10,5)	3 (15,0)	0,02	5 (25,0)	0,80
bronquiolitis	76	47 (61,8)	2 (4,2)	0,37	10 (21,2)	0,00
I TRS**	264	31 (11,7)	24 (77,4)	0,00	6 (19,3)	0,78
Total	1001	144 (14,3)	47 (32,6)		25 (17,3)	

Leyenda * I TRI: Infección del tracto respiratorio inferior.

** I TRS: Infección del tracto respiratorio superior.

*** Están incluidas muestras clínicas positivas a VSRH, MPVH y BoVH en infecciones simples.

**** Prueba exacta de Fisher. Significativo valor de $p \leq 0,05$

Fuente: Registro de datos de los LNR, IPK

En la actualidad, se plantea que el hecho de que el BoVH sea un virus frecuente en las muestras respiratorias de pacientes con IRA, no demuestra que sea el agente causal de los síntomas (278). La frecuencia elevada de infecciones múltiples del BoVH con otros virus respiratorios, hace complicado establecer la asociación causal entre este virus y una enfermedad. En este estudio, en los pacientes en los que el BoVH fue el único virus detectado, se asoció con manifestaciones clínicas similares a las presentes en pacientes con coinfecciones de este agente con otros virus respiratorios, lo que confirma a este agente como causante de diferentes tipos de IRA. Los resultados de investigaciones recientes demuestran la patogenia de las infecciones respiratorias por este virus (123, 279).

En el grupo de pacientes con diagnóstico clínico de bronquiolitis y otros tipos de I TRI, la positividad al MPVH fue significativa ($p=0,00$) (tabla 18). Estos hallazgos sugieren que las manifestaciones clínicas asociadas a la infección por el MPVH no son específicas de este virus. Por el contrario, son indistinguibles a las asociadas con la infección por el VRSH como lo plantean otros investigadores (95, 96).

La distribución por grupos de edades de las muestras procedentes de niños con infección respiratoria simple por el MPVH o el BoVH se representa en la figura 3. Como se evidencia ambos virus se detectaron en las muestras de los niños pertenecientes a todos los grupos de edades.

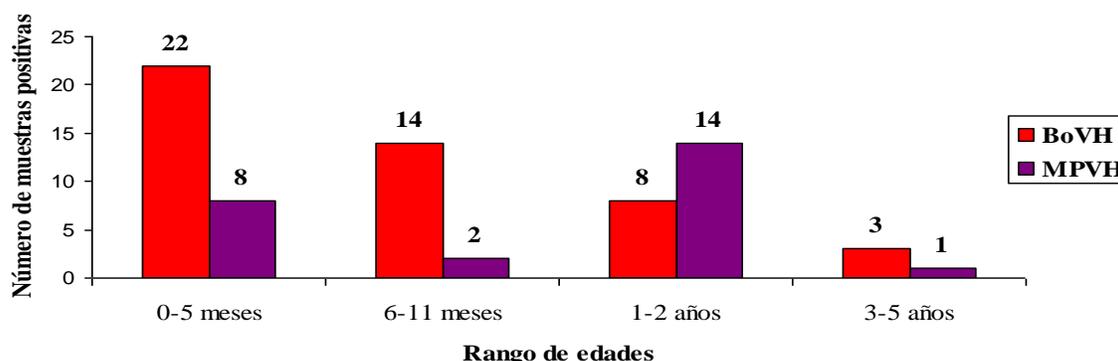


Figura 3. Positividad al BoVH y el MPVH por grupos de edades, diciembre 2009-diciembre 2010.

Fuente: Registro de datos de los LNR, IPK

La positividad para el MPVH se encontró en el grupo de pacientes con edades comprendidas entre 3 meses y 5 años. El porcentaje mayor de positividad (56%) correspondió a niños con edades comprendidas entre 1 y 2 años lo que resultó ser estadísticamente significativo ($p=0,00$).

Los estudios de seroprevalencia publicados, señalan que el MPVH es un virus ubicuo, mucho más frecuente de lo que se pensaba en un principio (105, 114, 115). El estudio inicial de van den Hoogen en Holanda, encontró que el 25% de los niños entre 6 y 12 meses de edad tenían anticuerpos frente a este virus y que a la edad de 5 años el 95% de los niños eran seropositivos al MPVH (8). Resultados similares se han publicado en Israel (115), Canadá (104) y China (105).

Aunque un segmento del genoma del BoVH se detectó en niños de todas las edades (figura 3), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los diferentes grupos de edades. Es de señalar que el 93,6 % de los niños eran menores de 2 años, lo que sugiere que las infecciones por el BoVH son frecuentes en los dos primeros años de la vida.

La mayoría de las investigaciones demuestran que la infección por el BoVH es más frecuente en los niños menores de 3 años (256, 280, 281). Hasta la fecha, se han publicado pocos estudios que incluyen muestras procedentes de adultos, pero los datos disponibles parecen indicar una menor prevalencia de las infecciones por el BoVH en este grupo de edad (137, 282, 283). Un estudio de seroprevalencia en Japón reveló que esta es mínima entre los 6 y 8 meses de edad y aumenta progresivamente hasta alcanzar el 94% a los 6 años de edad (139).

La distribución mensual del porcentaje de positividad para el MPVH y el BoVH en las muestras en las que un único agente fue detectado aparece reflejada en la figura 4. Para el MPVH, se puede apreciar un primer incremento (20%) en la actividad de su circulación en el mes de julio del 2010 y un segundo (20%) en

noviembre del mismo año. Por otro lado, para el BoVH, solo se detectó un incremento en su detección en el mes de noviembre (21%) (figura 4).

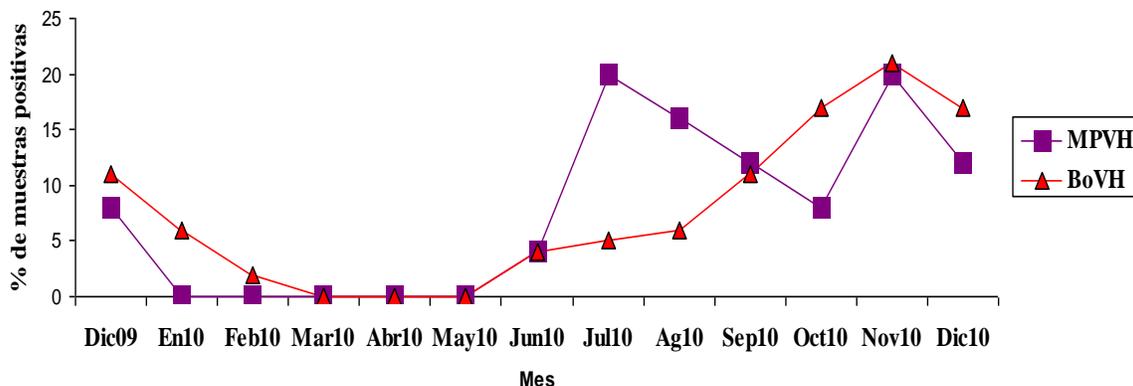


Figura 4. Distribución mensual del porcentaje de positividad para el MPVH y el BoVH entre diciembre 2009 y diciembre 2010.

Fuente: Registro de datos de los LNR, IPK

El 52% (n=13) de la positividad para el MPVH se detectó entre los meses de septiembre a diciembre del año 2010 y un 40 % (n=10) se detectó entre junio y agosto. Con relación a las infecciones por el BoVH, el 65,9% de las muestras positivas (n=31) se detectaron entre los meses de septiembre a diciembre del año 2010, pero casos positivos también se diagnosticaron en enero, febrero, y desde junio hasta agosto del propio año.

En la literatura consultada, solo encontramos una publicación sobre la detección del MPVH en 3 países de la región de América Central en los que el clima es subtropical, pero no se analizó la estacionalidad de este agente (284).

En países con clima templado, el MPVH posee una distribución estacional. En estos países, la mayoría de los casos de infección por el MPVH se detectan al finalizar el invierno y comienzo de la primavera, cocirculando en algunos meses con el VSRH. Sin embargo, pueden encontrarse variaciones al estudiar varias temporadas consecutivas (95, 285, 286).

Los datos sobre la estacionalidad del MPVH en países tropicales donde las infecciones por este virus podrían tener un patrón diferente, son muy limitados (287-289). Un estudio reciente en la India reportó que la mayoría de las infecciones por el MPVH son detectadas durante los meses de julio a noviembre (290).

Hasta el momento de presentar estos resultados, no existen estudios publicados sobre esta temática en países del área del Caribe. Cuba, por su situación geográfica, posee un clima subtropical y se reconocen dos

estaciones climáticas: una estación lluviosa entre los meses de mayo a octubre y una estación seca comprendida entre los meses de noviembre hasta abril, con la temperatura promedio más alta en el mes de julio (30°C) (291). Los resultados del presente estudio sugieren que el patrón estacional del MPVH en países con clima subtropical como el nuestro pudiera ser diferente, sin embargo esta observación necesitaría del análisis de temporadas sucesivas de infecciones respiratorias.

En la mayoría de las publicaciones procedentes de países con clima templado y tropical, las infecciones por el BoVH, aunque ocurren a lo largo de todo el año, son más frecuentes durante los meses de invierno y primavera. A pesar de esto, se debe tener presente que muchos de los estudios tienen un diseño retrospectivo y cuentan con la limitación de haber incluido muestras colectadas únicamente durante los meses de invierno, coincidiendo con el incremento en la circulación de la mayoría de los virus respiratorios (266, 292, 293). En la literatura consultada no se publican investigaciones sobre la estacionalidad del BoVH en países con clima subtropical. Los resultados obtenidos evidenciaron que las características estacionales del BoVH son similares a las del MPVH. No obstante, es arriesgado arribar a conclusiones definitivas sobre la estacionalidad del BoVH en Cuba e investigaciones futuras deben contribuir a esclarecer este tema.

Este estudio constituye el primer reporte de la detección de la circulación de los virus respiratorios emergentes: BoVH y MPVH, en Cuba y el área del Caribe. Los resultados aportan nuevas evidencias sobre el papel etiológico de estos agentes en las infecciones respiratorias pediátricas y confirman la distribución mundial de los mismos.

IV. 3 Desarrollo de una estrategia de laboratorio para el diagnóstico y estudio de la circulación de un virus influenza con potencial pandémico.

IV. 3. 1 Elaboración de un algoritmo para el diagnóstico de virus influenza con potencial pandémico.

Como parte del Plan Nacional para el enfrentamiento de la amenaza de una pandemia por un virus influenza, en el año 2005, los LNR fortalecieron sus capacidades diagnósticas para la vigilancia de las IRA virales. La introducción de varios ensayos de RCP para el diagnóstico de 20 virus respiratorios, incluidos los virus influenza considerados con mayor potencial pandémico: influenza A (H5N1), influenza A (H7N7) y el virus influenza A (H9N2) contribuyeron a dicho fortalecimiento.

El 25 de abril del año 2009 la Directora General de la OMS declaró Emergencia de Salud Pública de Preocupación Internacional y anunció la emergencia de un virus influenza A (H1N1) nuevo de origen porcino con potencial pandémico al que se le denomina actualmente influenza A (H1N1) pdm09 (294). El 11 de

junio, la OMS definió el evento epidemiológico como la primera pandemia del siglo 21 producida por un virus influenza.

En Cuba, ante este evento epidemiológico, el 26 de abril del año 2009, los LNR del IPK elaboraron una estrategia de vigilancia de laboratorio que se inició con la confección del documento: "Indicaciones del Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios del IPK para la colecta de muestras clínicas para el diagnóstico virológico y vigilancia de la influenza porcina A (H1N1)" (nombre que se le dió inicialmente al nuevo virus) para su distribución inmediata a la Red Nacional de Laboratorios de Microbiología (Anexo 8). Para su confección se tuvieron en cuenta los conocimientos previos sobre los virus influenza estacionales y la poca información disponible en esa fecha sobre el nuevo agente. Estas indicaciones se acompañaron de la introducción de un modelo nuevo de colecta de muestra para diagnóstico microbiológico (Anexo 5) y el inicio de una primera etapa de implementación del Sistema Nacional de Transporte de muestras para el diagnóstico microbiológico.

La OMS orientó que el diagnóstico molecular era el método de elección para la identificación del nuevo virus y señaló que la amplificación de segmentos correspondientes a más de un gen de los virus influenza A era el procedimiento más apropiado (216).

Inicialmente, el laboratorio designó el método descrito previamente por Casas y colaboradores (204) para la extracción de ácidos nucleicos considerando que permite extraer con eficiencia el ácido nucleico de tipo ADN y ARN e incluye un control interno que posibilita chequear el proceso de extracción, la reacción de amplificación y evita la notificación de casos falsos negativos.

El análisis de la especificidad de los cebadores para la amplificación de los segmentos de los genes de las proteínas NP, M y HA (205, 214, 215), disponibles en el laboratorio y empleados para la identificación de los virus influenza A y subtipo de influenza A (H1N1) evidenció que los diseñados para los genes de las proteínas NP y M eran teóricamente capaces de amplificar un segmento correspondiente a estos genes del nuevo virus influenza. La especificidad de los cebadores para amplificar un segmento del gen de la NP del virus influenza emergente, podría atribuirse a que fueron diseñados a partir de una región altamente conservada del gen de dicha proteína, son degenerados y detectan todos los virus influenza A conocidos (205).

Los cebadores específicos para el gen de la HA empleados en el ensayo de TR-RCP para el subtipado de los virus influenza A (214), capaces de amplificar el gen completo de la HA de los 16 subtipos de virus influenza A, también evidenciaron especificidad para el nuevo virus. Igual resultado se obtuvo con los empleados en la RCP anidada múltiple para el subtipado del virus influenza estacional A (H1N1).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se establecieron dos definiciones de casos. La primera de ellas estuvo referida a caso probable; en la que deberían ser incluidos todos los pacientes con resultados positivos al virus influenza A o virus influenza A (H1) y la segunda referente al caso confirmado. Para esta última se consideró, que en los casos con resultados positivos al virus influenza A y al virus influenza A (H1), debería ser secuenciado al menos uno de los segmentos resultantes de la amplificación de los genes de la M, NP o HA para definir si se trataba de un caso confirmado al nuevo virus o por el contrario se trataba de una infección por el virus influenza estacional A (H1).

Con el objetivo de realizar el diagnóstico diferencial con otros virus influenza y 13 virus respiratorios se incluyeron en el algoritmo del laboratorio diferentes ensayos de TR-RCP anidados múltiples (205, 206, 212, 213).

En relación al aislamiento viral, al momento de elaborar el algoritmo diagnóstico, la OMS señalaba que la sensibilidad de los sistemas convencionales (cultivo de células y aislamiento en huevos embrionados) para el nuevo virus era aún indeterminada. Por otro lado, se recomendó que para dicho procedimiento debieran emplearse medidas de contención del nivel III de seguridad biológica, no disponibles en el laboratorio. Sin embargo, los procedimientos para el diagnóstico molecular podrían llevarse a cabo en condiciones del nivel II, con prácticas de laboratorio del nivel III de seguridad biológica (216).

Al mismo tiempo que se implementó el algoritmo diagnóstico propuesto, se desarrolló y optimizó un ensayo nacional de TR-RCP específico para el virus pandémico que amplifica un segmento del gen de la HA de este agente. El ensayo demostró un 97% de sensibilidad y un 100% de especificidad. La confirmación de la identidad de los productos amplificados se realizó mediante secuenciación nucleotídica adicional (217).

Como resultado del análisis previo, en la figura 5 se muestra la estructura del algoritmo diagnóstico empleado en los LNR para la primera fase del diagnóstico y vigilancia del virus influenza A (H1N1) pdm09 en el período comprendido entre el 28 de abril y el 17 de julio del año 2009.

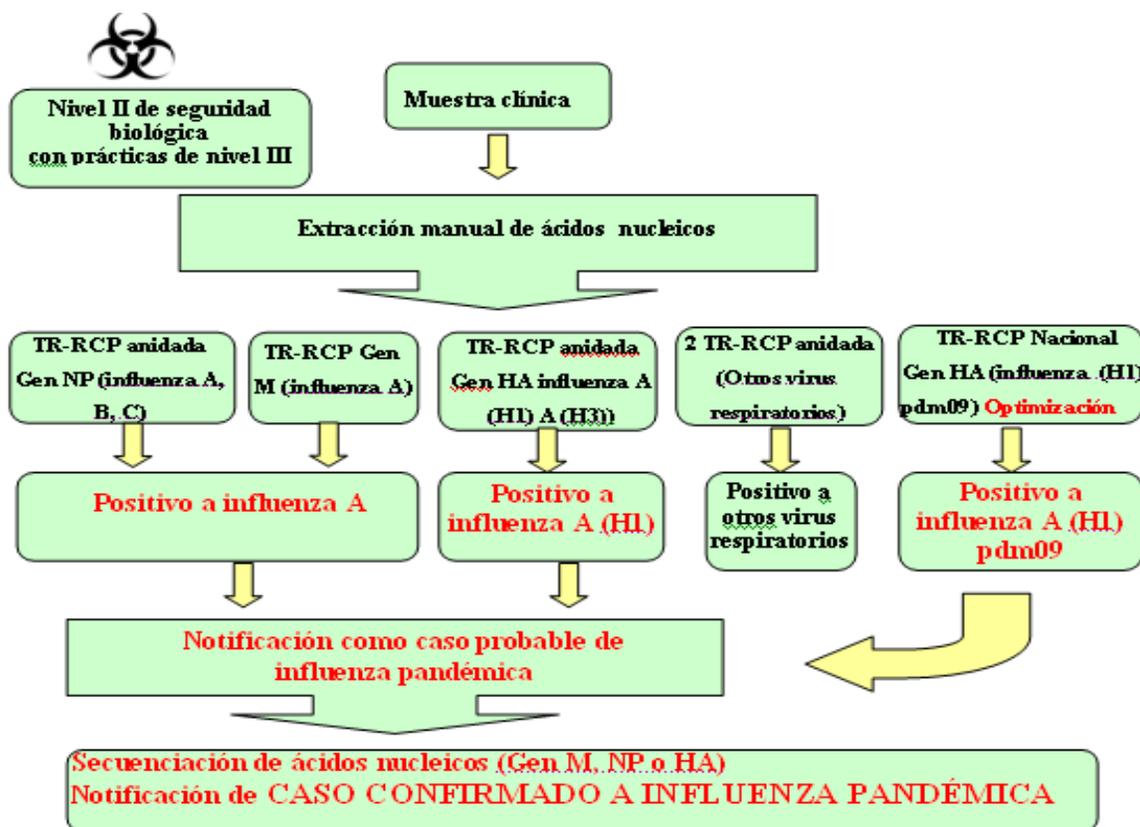


Figura 5. Algoritmo diagnóstico de la primera fase de vigilancia del virus influenza pandémico A (H1N1) pdm09 en Cuba.

Fuente: LNR, IPK

Al disponer de un protocolo nacional de TR-RCP para el nuevo virus, se realizó una actualización del algoritmo diagnóstico empleado en la primera fase que consistió en decidir que la secuenciación de ácidos nucleicos para la confirmación definitiva de los casos se realizara solamente una vez por semana como control de la calidad del diagnóstico, a la totalidad de los casos con diagnóstico clínico de IRAG y los fallecidos por esta causa a partir del 17 de julio del año 2009 y hasta el 27 de septiembre del propio año. Esta actualización conservó el cumplimiento de las orientaciones de la OMS, y fue útil al permitir acortar el tiempo del diagnóstico y garantizar la eficiencia del proceso. En la siguiente figura se muestra el algoritmo de la primera fase actualizado.

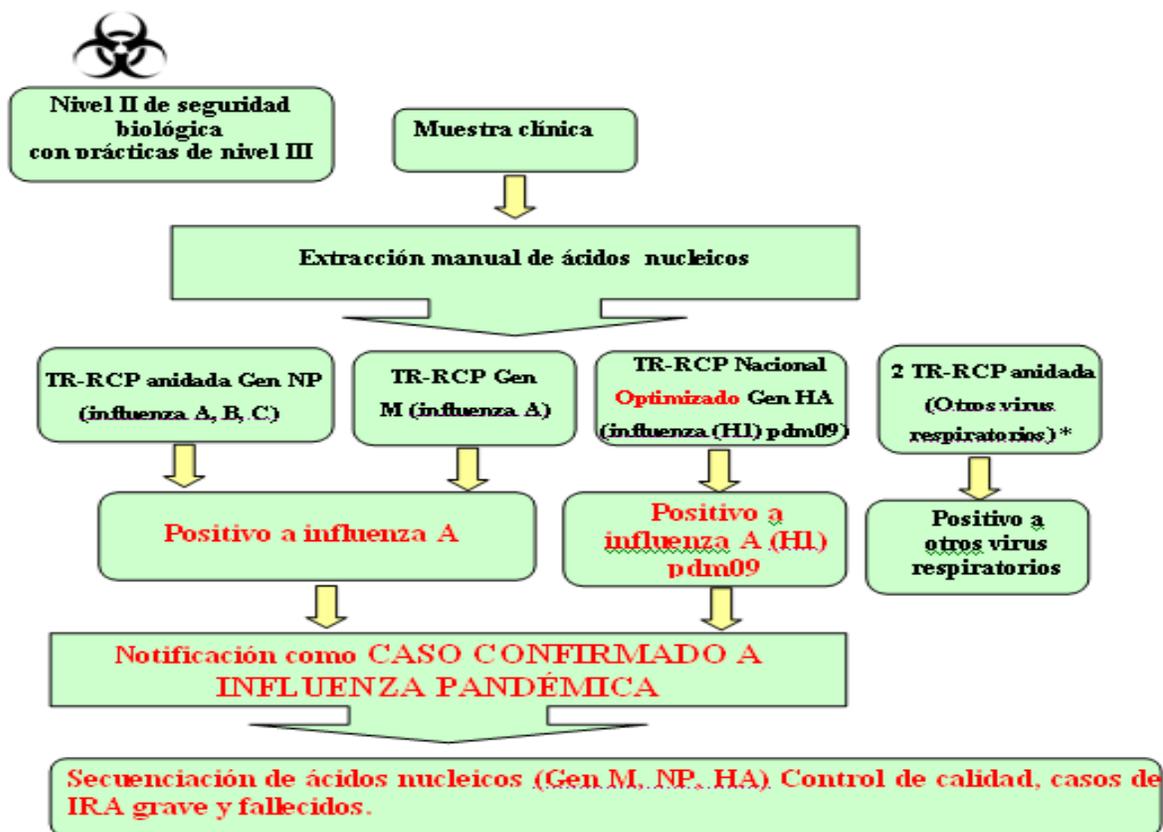


Figura 6. Algoritmo diagnóstico de la primera fase actualizado para la vigilancia del virus influenza A (H1N1) pdm09.

Leyenda: *Aplicación de ensayos para diagnóstico diferencial con otros virus respiratorios a muestras de fallecidos y casos de IRAG.

Fuente: LNR, IPK

Como se demuestra en los resultados anteriores, el algoritmo que formó parte de la estrategia diagnóstica diseñada para la vigilancia del nuevo virus pandémico en una primera fase, se basó en el empleo de varios ensayos de TR-RCP. Este tipo de algoritmo fue el más empleado por los laboratorios que llevaron a cabo la vigilancia de este agente en varios países (295-297).

Los métodos tradicionales considerados las "pruebas de oro" para el tipado y subtipado de los virus influenza A, no pueden ser utilizados para la identificación de un nuevo subtipo en la práctica; debido a la carencia de los reactivos específicos tanto para la detección de Ac como para la identificación y caracterización antigénica mediante la IH. Los métodos rápidos para la detección de Ag disponibles, proporcionan resultados en

aproximadamente 30 minutos, pero poseen baja sensibilidad, requieren de una muestra colectada con calidad y no distinguen entre los subtipos de los virus influenza A (161).

Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos, particularmente los ensayos de TR-RCP, se han convertido en la herramienta estándar para el diagnóstico y la vigilancia de los virus influenza en las últimas dos décadas (168, 298, 299). La ventaja principal de estos métodos es que permiten garantizar los resultados en un corto tiempo (generalmente menos de 24 horas) sin comprometer la sensibilidad del diagnóstico; aspectos necesarios para la vigilancia de un virus emergente, el manejo eficiente de un brote, la aplicación oportuna de un tratamiento antiviral específico y la implementación de las medidas efectivas para la profilaxis y el control.

Es conocido que la amplificación mediante RCP y el análisis posterior comparativo de las secuencias nucleotídicas no solo garantiza la detección directa de un agente a partir de una muestra clínica, sino también permite realizar análisis genéticos retrospectivos para evaluar origen ancestral y evolución viral (300-302). La información que aporta una secuencia nucleotídica proporciona confiabilidad de un resultado diagnóstico y permite además la detección oportuna de la circulación de las variantes virales con posible repercusión clínica y epidemiológica, posibilitando realizar tempranamente actualizaciones en los programas de prevención y control (303, 304).

El análisis mediante BLAST (siglas del inglés, Basic Local Alignment Search Tool) del segmento secuenciado a partir de las muestras positivas de pacientes confirmados en Cuba, mostró un porcentaje de homología ≥ 96 % al compararlas con las secuencias del virus pandémico detectado en otros países y publicadas en la base de datos del GenBank, EpiFlu y GISAID (siglas del inglés, Global Initiative Share Avian Influenza Data).

Algunas de las secuencias del virus influenza A (H1N1) pdm09 detectado en Cuba, se encuentran disponibles en el GenBank bajo los números de acceso: HM159409-159418 y HM176606-HM17639.

Al analizar los resultados del procesamiento de 1785 muestras en relación al tiempo que medió entre la recepción de las muestras por los LNR y la notificación de los resultados durante la aplicación del algoritmo diagnóstico establecido para la primera fase, es de destacar que el promedio de días fue de 1,4 días. En el 92,5 % (n=1652) de las muestras estudiadas, la notificación de los resultados del laboratorio se produjo en 2 días o menos. El rango de días fue de 1-8. En la tabla 19 se muestran los resultados de este análisis.

Tabla 19. Número de muestras procesadas según el número de días que medió entre la recepción de la muestra y la notificación del resultado de laboratorio.

Días	No de muestras (%)
< 24 horas	53 (2,9)
1	1193 (66,8)
2	406 (22,7)
3	99 (5,5)
4	21 (1,1)
5	5 (0,2)
6	6 (0,3)
8	2 (0,1)
Total	1785

Fuente: Registro de datos de los LNR, IPK

Se diseñó un algoritmo diagnóstico para una segunda fase de la vigilancia del virus influenza pandémico favorecido por la voluntad política del gobierno y el apoyo de la OPS. En el mismo se realizó la introducción de un equipo homogenizador de muestras de tejidos, un extractor automático de ácidos nucleicos, un equipo de RCP en tiempo real y un protocolo específico para el nuevo virus, que posibilitó acortar aun más el tiempo del diagnóstico, procesar un mayor número de muestras, automatizar e incrementar la sensibilidad del algoritmo diagnóstico (figura 7).

El protocolo de TR-RCP en tiempo real introducido en esta nueva fase, fue el recomendado por la OMS para el diagnóstico y la vigilancia del virus pandémico, desarrollado por el CDC, (siglas del inglés, Center for Diseases Control) y distribuido a los CNI a través de la OMS. Es de destacar que el mismo incluye 4 reacciones de amplificación independientes. La primera de ellas permite la amplificación de un segmento del gen de la proteína M de los virus influenza A de cualquier especie (aviar, porcina, humana), la segunda amplifica un segmento del gen de la HA de los virus influenza A de origen porcino de cualquier subtipo, y la tercera amplifica un segmento del gen de la HA del virus pandémico. Además, el ensayo incluye un juego de cebadores para la amplificación específica de un segmento del gen RNase P humano presente en todas las células del organismo que permite controlar la eficiencia del proceso de extracción y evita la notificación de resultados falsos negativos. Teniendo en cuenta que el ensayo garantiza la identificación de todos los virus influenza A, permitió mediante la posterior aplicación de los ensayos de TR-RCP anidada para el subtipado

de estos agentes, monitorear la circulación de los virus influenza estacionales: A (H3N2) y A (H1N1), o por el contrario detectar los virus influenza A no subtipables que podrían constituir una alerta por la posible emergencia de un subtipo nuevo. El ensayo se realizó utilizando el estuche comercial SuperScript III Platinun One Step Quantitative (Invitrogen), el cual garantizó la reacción TR-RCP en un solo paso y posibilitó realizar el protocolo establecido en el equipo disponible de modo rápido, permitiendo obtener resultados en un tiempo aproximado de 45 minutos.



Figura 7. Algoritmo diagnóstico de la segunda fase para la vigilancia del virus influenza A (H1N1) pdm09 en Cuba.

Leyenda: *Aplicación de los ensayos para diagnóstico diferencial con otros virus respiratorios a muestras de fallecidos y casos de IRAG.

Fuente: LNR, IPK

IV. 3. 2 Detección y estudio de la circulación del virus influenza pandémico.

El 28 de abril del año 2009 se inició la recepción por los LNR de las primeras muestras clínicas de los casos sospechosos de infección por el virus pandémico y se implementó el algoritmo de diagnóstico propuesto. El 4

de Mayo se recibió la primera muestra de un caso sospechoso de infección por influenza pandémica colectada de un viajero procedente de México. Dos días después se notificó el primer caso confirmado por el nuevo virus que determinó la alerta a las autoridades nacionales de salud para la puesta en marcha de las acciones de prevención y control incluidas en el Plan Nacional de enfrentamiento del virus influenza A (H1N1) pdm09.

Al igual que en Cuba, la detección temprana de la infección por el virus pandémico en otros países estuvo relacionada con viajeros procedentes de México. En relación a esta observación, se reportó una correlación significativa entre pasajeros de líneas aéreas procedentes de México y el número de casos confirmados (305, 306).

Una de las primeras medidas de prevención y control implementadas en Cuba, fue la cuarentena aplicada a estudiantes que viajaron a La Habana procedente de México, entre los que se encontraban el primer caso confirmado por el laboratorio (307). Posterior a la notificación de este caso, entre el 7 y el 13 mayo del año 2009, se realizó un estudio conjunto con la DNE del MINSAP en la institución designada para la cuarentena mediante el cual se colectaron y procesaron por el algoritmo diagnóstico propuesto para la primera fase, un total de 64 muestras clínicas respiratorias. Los resultados permitieron detectar 3 casos nuevos confirmados de infección por el virus pandémico. La detección de la excreción viral hasta el décimo día posterior a la fecha del inicio de los síntomas, se consideró un hallazgo relevante marcador de una diferencia con los virus influenza estacionales. Al mismo tiempo, indicaba la necesidad de modificar algunas medidas de prevención y control. La existencia de la co-circulación del nuevo virus con los virus influenza estacionales, así como la efectividad del tratamiento antiviral impuesto como medida de prevención y control, fueron otros resultados derivados de este primer estudio. La confirmación mediante secuenciación nucleotídica de los primeros casos, evidenció la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico.

El monitoreo de la circulación de los virus influenza a partir de la semana epidemiológica (SE) 23 (7 al 13 de junio del año 2009) (figura 8), evidenció un incremento en la positividad al virus pandémico en muestras clínicas procedentes de los brotes comunitarios y en instituciones escolares. A partir de este momento, este agente se convirtió en el virus influenza circulante predominante, evidenciando su transmisión sostenida en Cuba y corroborando el carácter típicamente explosivo de la circulación de los virus influenza descrito en la literatura científica mucho más notorio al tratarse de un virus nuevo para el cual la población carece de inmunidad (146, 308).

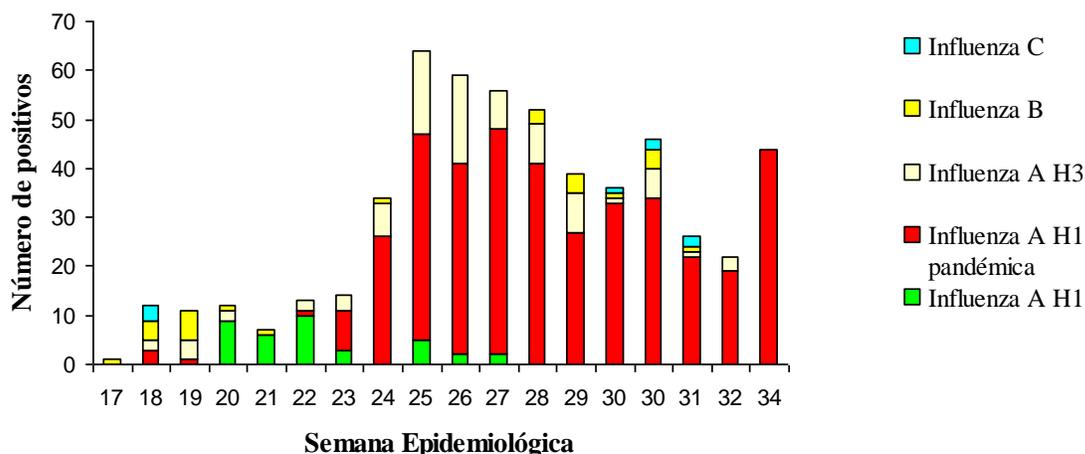


Figura 8. Distribución de las muestras positivas a los virus influenza por semanas epidemiológicas, Cuba 2009.

Fuente: Registro de datos de los LNR, IPK

Como se observa en la figura 8, el virus estacional influenza A (H1N1) se detectó en la circulación hasta la SE 27, (5 julio al 17 de julio). Este resultado se corresponde con el desplazamiento de la circulación de este agente por el virus pandémico y coincide con lo sucedido en eventos pandémicos anteriores atribuidos a los virus influenza en los cuales el nuevo virus ha desplazado de la circulación a la variante viral anterior (309). Este fenómeno de desplazamiento fue reconocido en todo el mundo según el reporte oficial de la OMS (310).

Dada la tasa elevada de mutaciones y la emergencia continua de linajes genéticos nuevos de los virus influenza, no está esclarecido por qué los virus influenza A pandémicos reemplazan los subtipos de virus influenza estacionales existentes. Al respecto; se ha planteado la existencia de una inmunidad heterosubtípica transitoria, capaz de conferir protección cruzada entre diferentes subtipos de virus influenza por un período breve de tiempo, entorpeciendo temporalmente la infección de un individuo por cepas diferentes (311, 312). Se ha postulado que durante las pandemias, una fracción importante de la población infectada por el virus nuevo queda transitoriamente inmunizada contra los subtipos previamente circulantes, reduciendo críticamente el número de susceptibles, lo cual conduce paulatinamente a la extinción del virus estacional (313). Dado que el subtipo A (H1N1) estacional comparte mayor número de epítopes con el virus pandémico que el subtipo A (H3N2), es posible que el fenómeno antes descrito sea más importante para el virus estacional A (H1N1) que para el A (H3N2), lo cual explica el efecto desigual del virus pandémico sobre éstos (314, 315).

Entre el 28 de abril del año 2009 y el 10 de agosto del año 2010, período que delimita la vigilancia de la primera pandemia del presente siglo, los LNR procesaron un total de 14 510 muestras procedentes de casos esporádicos, brotes, pacientes con IRAG y fallecidos, sospechosos de infección por el virus influenza A (H1N1) pdm09 de todo el país y con edades comprendidas entre 10 días de nacido y 103 años de edad.

Hasta el 10 de agosto del año 2010, cuando la OMS declaró finalizada la actividad pandémica del virus influenza A (H1N1) pdm09 (316), se confirmaron un total de 1805 muestras positivas al nuevo virus en Cuba. En la figura 9 se muestra el comportamiento de la tasa de incidencia del virus pandémico en las diferentes provincias del país según la división política administrativa vigente hasta esa fecha. Como se muestra, en todas las provincias se confirmaron casos de infección por el virus influenza pandémico.

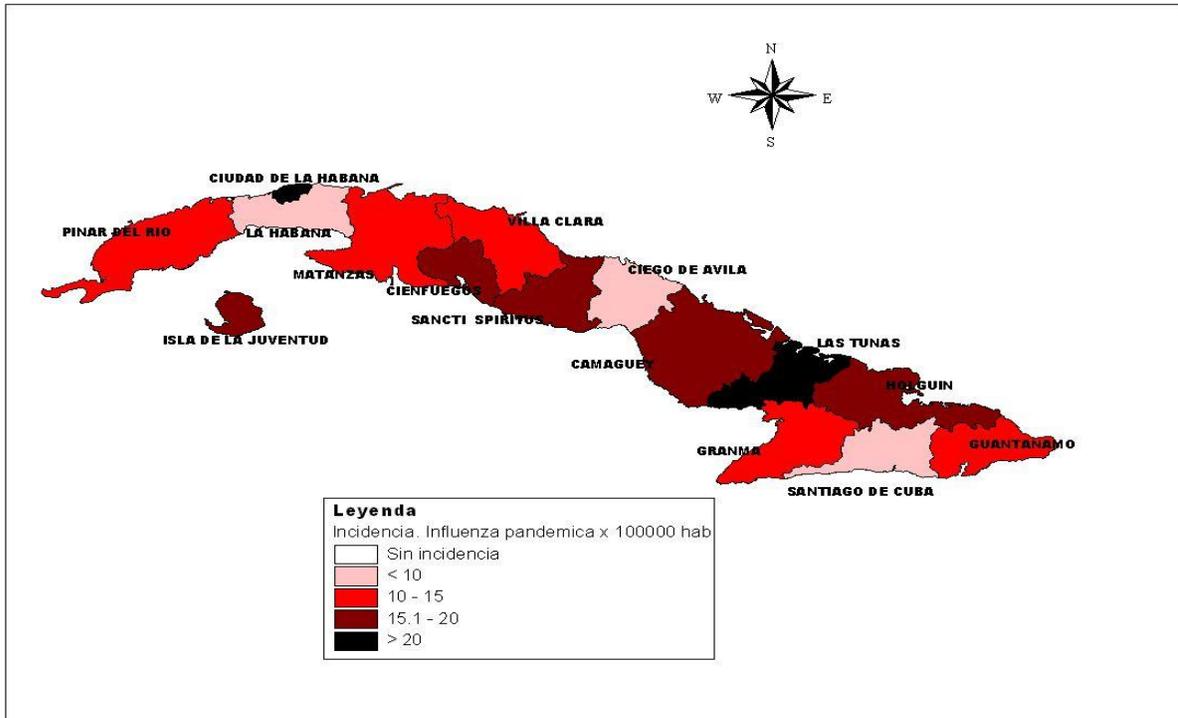


Figura 9. Tasa de incidencia de influenza pandémica según provincia. 28 abril 2009 al 10 de agosto 2010.

Fuente: Registro de datos de los LNR, IPK

La provincia con la mayor tasa de incidencia fue Ciudad de la Habana, seguida por la provincia Las Tunas. No es objetivo del presente trabajo ni poseemos datos suficientes para analizar el cumplimiento de las estrategias orientadas en el Plan Nacional de enfrentamiento que pudieran haber influenciado en la distribución desigual de la tasa de incidencia para el nuevo virus en las diferentes provincias. Sin embargo, hay

que señalar que la Ciudad de la Habana, es la provincia con menor extensión territorial pero con mayor número de habitantes del país (más de 3 millones) y con un 100% de la población urbana (222). La misma constituye un importante polo turístico y posee el aeropuerto y puerto de mayor tráfico aéreo y comercial, lo que incrementa su vulnerabilidad para eventos de salud como el que describimos.

Tabla 20. Distribución y porcentaje de muestras confirmadas a influenza A (H1N1) pdm09 en Cuba según condiciones clínica-epidemiológicas.

Condición clínica- epidemiológica	Muestras procesadas	Casos confirmados	% Positivos	Valor de p*
viajero	1224	180	9,9	0,01
ETI	5601	830	45,9	0,00
IRAG	4369	247	13,6	0,00
brote	1496	325	18	0,00
embarazo	1047	140	7,7	0,34
fallecido	773	83	4,5	0,14
Total	14510	1805	12,2	

Leyenda: * Prueba de X^2 . Significativo valor de $p \leq 0,05$

Fuente: Registro de datos de los LNR, IPK

Se demostró asociación estadísticamente significativa entre la confirmación de la infección por el virus pandémico y la condición de ser viajero ($p=0,01$), presentar diagnóstico clínico de ETI ($p=0,00$) o IRAG ($p=0,00$) y en las muestras colectadas para el estudio de brotes ($p=0,00$) (tabla 20).

En la actualidad, numerosos artículos relacionados con el impacto social y económico de la pandemia por el virus influenza A (H1N1) pdm09 sobre los sistemas de salud, indican que la misma fue de una intensidad leve a moderada, con índices de morbilidad, hospitalización y letalidad inferiores a cualquiera de las pandemias previas y con características clínicas y una dinámica de transmisión similares a la influenza estacional (según tasa de ataque secundario y período de incubación). Sin embargo, fue significativo el reporte de embarazadas afectadas experimentando cuadros severos y fatales a nivel mundial, los índices altos de morbilidad en adultos

jóvenes, el empleo del cierre de escuelas como medida de control y las afectaciones económicas experimentadas por algunos países (317-319).

Algunas características virológicas del virus influenza A (H1N1) pdm09 podrían explicar su comportamiento menos virulento en comparación con virus pandémicos previos. Se sugiere la ausencia de marcadores de virulencia como la presencia de múltiples aminoácidos en la región de escisión de la HA o la sustitución de ácido glutámico por lisina en la posición 627 de la proteína PB2 que estuvieron presentes en los virus pandémicos previos. Además, a diferencia de los agentes causales de las pandemias anteriores, el nuevo virus pandémico no contiene la proteína accesoria PB1-F2, considerada un factor promotor de apoptosis, estimulador de la inflamación y vinculado a una mayor severidad de la infección. Por último, el virus demostró ser resistente a las drogas antivirales inhibidoras de M2. Sin embargo, evidenció ser sensible a las inhibidoras de la NA. Esto posibilitó el empleo eficaz y oportuno de estas últimas en la profilaxis y el control de la infección por el nuevo virus, disminuyendo la transmisión, el número de casos graves en la población de riesgo y por consiguiente el número de casos fatales (320, 321).

Como resultado del monitoreo de la circulación del virus influenza emergente en Cuba, quedó evidenciado que el porcentaje de positividad para este agente mostró un primer incremento de su circulación entre las SE 38 (18 al 24 de septiembre) y la 41 (9 al 15 de octubre) del año 2009 y circuló simultáneamente con el virus influenza estacional A (H3N2) (figura 10). Este período coincidió con el inicio del curso escolar y un total de 298 y 220 muestras clínicas fueron positivas a influenza A (H1N1) pdm09 e influenza A (H3N2), respectivamente.

A finales del mes de marzo del año 2010 (SE 12), comenzó un segundo incremento de la circulación del virus pandémico, con una co-circulación mínima con otros virus influenza (figura 10). Un total de 303 muestras fueron confirmadas al nuevo virus entre las SE 13 a la 16 (29 de marzo al 25 abril). Este incremento en su circulación se extendió en el tiempo, llegando a ser notificados 578 casos confirmados entre los meses de abril y mayo.

Analizando los datos del laboratorio representados en la figura 10 y su asociación con los datos de morbilidad, podemos afirmar que en nuestro país tuvieron lugar dos olas epidémicas del virus influenza A (H1N1) pdm09. La primera de ellas se asoció con una cifra de 1 826 596 atenciones médicas por IRA entre las SE 34 (22 al 28 de agosto del 2009) a la 44, (30 de octubre al 6 de noviembre) según el reporte de la DNE del MINSAP. Durante el primer semestre del 2010 las cifras de atenciones médicas por IRA alcanzaron valores por encima de igual período del año 2009, particularmente durante las SE 13 a la 16 (29 de marzo al 25 abril)

donde se notificaron 550 872 atenciones médicas, lo que consideramos expresión de la segunda ola epidémica en Cuba.

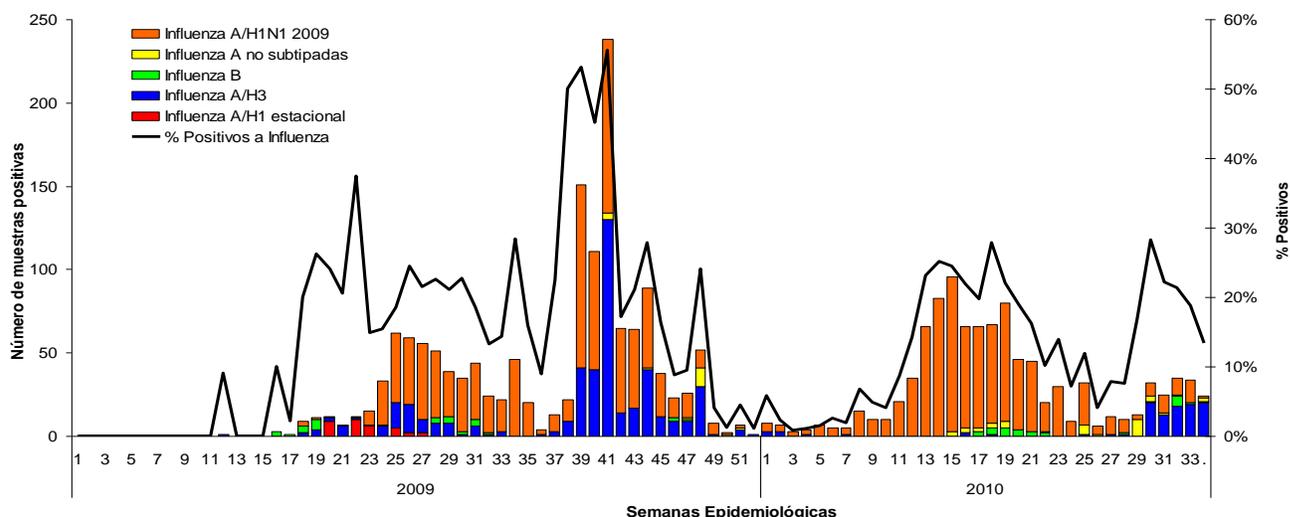


Figura 10. Distribución de la positividad semanal a virus influenza por semanas epidemiológicas, abril 2009-agosto 2010, Cuba

Fuente: Registro de datos de los LNR, IPK

En la literatura consultada, se describe que ocurrieron dos olas pandémicas durante la circulación del virus influenza A (H1N1) pdm09 en el mundo. La segunda de ellas con un impacto que se considera aproximadamente la mitad de la primera ola en la mayoría de los países. La diferencia principal radicó en el momento en que tuvieron lugar. Para los países del hemisferio Sur, la primera tuvo lugar entre los meses de junio y agosto del año 2009, y la segunda menos intensa, entre los meses de enero y febrero del año 2010. Es de señalar que durante la segunda ola pandémica, un número limitado de países mantenían la notificación a la OMS. En cambio, para los países del hemisferio Norte, la primera ola se registró durante los meses de octubre y noviembre, de la misma manera que ocurrió en Cuba y la segunda de menor intensidad en comparación con la del hemisferio Sur, entre los meses de marzo y abril (322-325). En relación con estos hechos, merece ser mencionado que en el enfrentamiento de la primera pandemia de este siglo estaban disponibles un antiviral específico para el control y la prevención de la infección y una vacuna efectiva y segura se obtuvo para el nuevo virus en un período no mayor de 6 meses posterior a la emergencia de este agente. Una estrategia de vacunación dirigida a proteger a los grupos poblacionales más vulnerables (embarazadas, niños, adolescentes

y adultos jóvenes con factores de riesgo, profesionales de la salud, entre otros) permitió mitigar el impacto de la segunda ola en la salud pública mundial (326-328).

Al resumir los resultados de este estudio, consideramos que el algoritmo diagnóstico elaborado por los LNR del IPK, demostró ser efectivo para la identificación temprana de un virus respiratorio emergente pandémico en Cuba, permitiendo poner en práctica las medidas de prevención y control de forma oportuna. Al mismo tiempo, posibilitó llevar a cabo un monitoreo seguro de su circulación. El desarrollo de un protocolo nacional de TR-RCP específico para el virus influenza pandémico, incluido en el algoritmo, fue útil en la fase inicial, cuando los recursos eran limitados y a diferencia de otros países, no estaba disponible el protocolo de TR-RCP en tiempo real recomendado por la OMS. Esto fue posible el encontrarse disponibles tempranamente las secuencias nucleotídicas del nuevo virus e indica la necesidad e importancia de hacer públicas tempranamente toda la información posible sobre un virus emergente para enfrentar eventos futuros.

El gran número de muestras procesadas y la notificación de los resultados del diagnóstico en corto tiempo, impactó positivamente en el manejo clínico de los casos, el inicio precoz del tratamiento antiviral efectivo, el número de casos secundarios, el número de hospitalizaciones y la estadía hospitalaria. Por otra parte, contribuyó al fortalecimiento de los conocimientos sobre las características clínicas, epidemiológicas y virológicas del virus pandémico.

V. DISCUSIÓN GENERAL

A pesar de los logros obtenidos frente a las enfermedades infecciosas, surgen brotes nuevos de EIE o poco conocidas, o bien otras que se creían vencidas y que reemergen, ocasionando problemas de salud pública y se requiere que médicos clínicos, epidemiólogos, microbiólogos y profesionales de la salud pública trabajen juntos y sistemáticamente para prevenir las enfermedades infecciosas y detectar tempranamente cualquier evento sanitario inesperado (31).

Como primer objetivo del presente estudio nos propusimos **identificar la posible etiología viral de un brote de SFAI ocurrido en La Habana, en el mes de julio del año 2005 que afectó a pacientes pediátricos.**

.Mediante la caracterización clínica de los pacientes estudiados, el empleo de diferentes ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (TR-RCP anidada múltiple y RCP anidada múltiple) para el diagnóstico de virus influenza A, influenza B, influenza C, VSRH A y B, AdVH, VPI tipo 1-4, CoVH OC43, CoVH 229E, RV y EV, así como la posterior secuenciación de ácidos nucleicos para la confirmación y caracterización del agente específico; fue posible conocer que dos eventos individuales clínicamente distintos asociados a los AdVH tuvieron lugar en pacientes pediátricos atendidos en tres hospitales de La Habana .

El primero de estos eventos lo constituyó un brote severo de miocarditis aguda, en el que 8 niños fallecieron y el análisis anatomopatológico confirmó el diagnóstico clínico y la posible etiología viral de esta afección. La detección y posterior identificación mediante secuenciación nucleotídica del genoma viral del *adenovirus C* serotipo 5 en el tejido de músculo cardíaco de 6 (75%) de estos niños nos permite considerar a este agente, como el causal de dicho evento. Existen reportes sobre la detección frecuente de los AdV en casos esporádicos de miocarditis (38, 225), sin embargo su identificación como causa de brotes no es común (42). Este hallazgo confirma la necesidad de ampliar el rango de los agentes a estudiar en la etiología de brotes de miocarditis aguda. La presentación clínica de los 8 casos estudiados fue severa, acompañada de descompensación cardíaca aguda que progresó a la muerte y 5 (62,5%) de ellos presentaban un antecedente patológico subyacente, confirmando que los factores del hospedero son condiciones de riesgo para las formas severas de una enfermedad (38, 329).

Dos de los pacientes fallecidos a consecuencia de miocarditis aguda de posible etiología viral resultaron negativos a los agentes investigados. Varias hipótesis han tratado de explicar la no detección de los agentes infecciosos en pacientes con miocarditis como las relacionadas con el mimetismo antigénico, una respuesta inmune eficiente al momento de la colecta de la muestra, los mecanismos autoinmunes, los métodos de diagnóstico empleados, la correlación con los hallazgos clínicos e histopatológicos y el momento de la enfermedad en que la muestra es colectada (223).

Los resultados constituyen el primer reporte de la detección de los AdvH en un brote de miocarditis aguda en Cuba. Sin embargo, tomando en cuenta que la miocarditis es una enfermedad inflamatoria en la que los agentes infecciosos y los actuales conocimientos sobre inmunopatogenia viral están estrechamente relacionados, resultan necesarias investigaciones futuras sobre los mecanismos fisiopatológicos de los cuadros severos en los cuales los factores ambientales, las variaciones genéticas de los individuos, la virulencia de los agentes u otros pueden estar involucrados.

El análisis de otros resultados obtenidos en este estudio, permite plantear que un segundo evento tuvo lugar como parte del estudio etiológico del brote de SFAI, en el cuál se detectó ADN de AdvH en 17 (80,9%) de las 21 muestras de ENF colectadas de pacientes con sintomatología clínica predominantemente gastrointestinal. Para estas muestras, la secuenciación parcial de ácidos nucleicos de un segmento de la proteína del hexón de AdvH a partir de 9 (52,9%) de estas muestras permitió identificar en el 100% de ellas a los AdvH de la *especie D*. No fue posible la asignación del serotipo específico de AdvH de la *especie D* detectado en los pacientes estudiados, probablemente debido a que los datos de las secuencias analizadas (370 nucleótidos) son limitados a una región altamente conservada de la proteína del hexon para el estudio de los 32 serotipos pertenecientes a esta especie y la posibilidad de reconocer recombinantes. No obstante, el método empleado en el estudio fue descrito y validado previamente para la identificación a partir de muestras clínicas de diferentes especies y serotipos de AdvH en muestras de pacientes con diferentes síndromes, llegando incluso a la identificación de asociaciones clínicas poco frecuentes (74). A pesar de lo anteriormente planteado consideramos que la *especie D* de AdvH estuvo involucrada en la etiología de este segundo evento en niños presuntamente inmunocompetentes. Por otra parte, los reportes recientes señalan la ocurrencia de eventos recombinantes entre varios serotipos de los AdvH y los pertenecientes a la *especie D* aparecen como los más susceptibles de experimentarlos. Algunos de los eventos recombinantes han ocasionado la emergencia de un serotipo nuevo, un serotipo conocido pero con diferente tropismo y manifestaciones clínicas, así como variantes genéticas con distribución geográfica desigual y virulencia asociada (17, 18, 242). Probablemente, la identificación inusual de los AdvH de la *especie D* en esta investigación, podría significar la circulación en

Cuba de una variante genética nueva. Otras investigaciones dirigidas a la caracterización molecular del genoma completo de esta variante detectada en nuestro país, y estudios para evaluar determinantes de virulencia, son imprescindibles para esclarecer este hallazgo.

Analizando de manera integral los resultados alcanzados en el estudio etiológico del SFAI consideramos que tuvieron lugar en La Habana, en el mes de julio del año 2005 dos eventos clínicos individuales y el empleo de las herramientas de biología molecular permitió identificar a dos especies de los AdvH en la etiología de los mismos. Ambos eventos estuvieron relacionados en el tiempo e influenciados por las condiciones naturales adversas debidas al paso de un Huracán por la costa Norte del Oeste de nuestro país. Esto repercutió negativamente en las condiciones higiénicas y sanitarias de manera transitoria, favoreciendo el incremento de la morbilidad por enfermedades infecciosas e interactuando con factores inherentes al individuo y al agente. Esta interacción entre agentes patógenos y sus hospederos, y su asociación a factores biológicos inherentes al agente u hospederos, factores ambientales y sociales son determinantes en la emergencia o la re-emergencia de las enfermedades infecciosas (30).

Desde el comienzo del presente siglo, varios virus respiratorios han sido descubiertos como agentes emergentes causantes de IRA con importancia clínica y epidemiológicas diferentes (8-11). Se requiere de oportunidad y capacidad para la identificación de los nuevos agentes circulantes y la consecuente implementación de las estrategias efectivas de prevención y control que contribuyan a minimizar su impacto en la salud pública.

El segundo objetivo del presente estudio estuvo encaminado a **identificar la circulación de dos virus respiratorios emergentes (MPVH y BoVH) en niños ≤ 5 años de edad con diferentes tipos de infección respiratoria aguda mediante un ensayo de TR-RCP anidado múltiple optimizado.**

Mediante varios experimentos se logró la optimización en el laboratorio de un ensayo de TR-RCP múltiple anidado para el diagnóstico de VSRH, MPVH y BoVH, con resultados de sensibilidad comparables a los reportados por otros autores, incluyendo a algunos que evaluaron protocolos de TR-RCP en tiempo real (248, 330).

El ensayo de TR-RCP múltiple anidado optimizado, permitió fortalecer la capacidad diagnóstica del laboratorio e identificar la circulación de MPVH y BoVH por primera vez en Cuba en niños con IRA, contribuyendo de esta forma a identificar la etiología de infecciones, en las que no había sido posible identificar agente viral alguno.

El MPVH se detectó como único agente en el 17,3 % de las muestras con infecciones simples, predominando en los niños con edades comprendidas entre 1 y 2 años (56%). Se evidenció asociación estadísticamente

significativa de la infección por este agente con varios tipos de ITRI ($p=0,00$), resaltando el diagnóstico clínico de bronquiolitis ($p=0,00$).

La detección del BoVH (32,6%) como único agente en pacientes en los que solo se identificó un agente viral y su asociación significativa con ITRS ($p=0,00$) y el diagnóstico de neumonía ($p=0,02$) confirman su papel en la etiología de las IRA a pesar de lo controversial que ha resultado la asignación de un papel patogénico para este agente dada la frecuencia en que coinfecta con otros virus respiratorios y la dificultad para demostrar los postulados de Koch (278, 331). Aunque el genoma del BoVH se detectó en niños de todas las edades (0 a 5 años), el 76,5 % de estos eran menores de 1 año, lo que evidencia que las infecciones por este agente son frecuentes en el primer año de vida, lo que coincide con los reportes internacionales (121, 138, 280).

Considerando los estudios publicados hasta la actualidad, a los que se adicionan los resultados presentados, consideramos que el MPVH y el BoVH son agentes causales de IRA indistinguibles clínicamente de las producidas por otros virus respiratorios y con una repercusión clínica mayor en los tres primeros años de vida.

El MPVH posee una replicación lenta y es posible aislarlo en muy pocas líneas celulares, pudiendo demorar hasta 21 días (98). El BoVH es un virus no cultivable hasta la fecha (119). El método de amplificación de ácidos nucleicos como el empleado en este estudio (TR-RCP anidado múltiple), constituye la herramienta idónea para la identificación sensible de estos agentes.

Finalmente, se ha demostrado la circulación en nuestro país de dos virus respiratorios emergentes (MPVH y BoVH) en niños con IRA. Esta afirmación, confirma la importancia de incrementar el número de virus respiratorios que deben ser incluidos en los sistemas de vigilancia de las IRA y la utilidad de los ensayos moleculares para estos propósitos. Sin embargo, una proporción significativa de las muestras respiratorias estudiadas aun permanecen negativas y otros virus emergentes como los nuevos coronavirus humanos CoVH NL63, CoVH HKU1 y poliomavirus pudieran estar presentes, por lo que otros métodos diagnósticos nuevos deberán ser desarrollados.

Los virus influenza son ejemplo de la constante interacción entre el hombre y los procesos evolutivos que tienen lugar en los agentes microbianos para adaptarse a sus hospederos, que a su vez sirven como reservorios naturales y donde diversos factores biológicos, ambientales y sociales determinan que un virus nuevo se adapte a un nuevo hospedero y sea capaz de producir enfermedad de consecuencias impredecibles como lo demuestra la ocurrencia antes del año 2009 de tres pandemias por los virus influenza (146). Esta afirmación indica la necesidad de que la comunidad científica desarrolle estrategias diagnósticas para la vigilancia e identificación temprana de un virus influenza pandémico haciendo uso del desarrollo científico y tecnológico disponible en la actualidad.

Sobre esta base, se cumplimentó un tercer objetivo en la presente investigación dirigido a **desarrollar una estrategia de laboratorio para el diagnóstico y estudio de la circulación de un virus influenza pandémico en Cuba.**

En marzo del año 2009, un brote inesperado de enfermedad respiratoria ocurrió en México y Estados Unidos (180). El agente causal identificado fue un virus influenza A (H1N1) de origen porcino con capacidad para transmitirse eficientemente entre humanos y cuyo origen fue resultante de eventos de reordenamientos de segmentos de genes de virus de influenza porcina, humana y aviar (332). La OPS y la OMS ante este evento declararon el inicio de una vigilancia global integral para enfrentar la primera pandemia del siglo 21 producida por un virus influenza (294).

En Cuba, siguiendo las recomendaciones de la OMS (216), se elaboró una estrategia de diagnóstico y vigilancia mediante el empleo de los ensayos de TR-RCP disponibles, el desarrollo de un protocolo nacional y la implementación de la secuenciación nucleotídica como método para la confirmación de los casos, y que incluyó además la creación de dos definiciones de caso según los resultados de laboratorio. Mediante las herramientas de la bioinformática, se demostró que teóricamente, los ensayos disponibles eran capaces de detectar al nuevo virus y un algoritmo diagnóstico cumplimentado en dos fases demostró ser sensible y específico para la detección temprana de la circulación de este agente en Cuba. La inclusión de la secuenciación de ácidos nucleicos en el algoritmo diagnóstico proporcionó seguridad del resultado y aunque no fue objeto de este estudio permitió monitorear la circulación de variantes virales.

La automatización del algoritmo diagnóstico en la segunda fase, permitió acortar el tiempo del diagnóstico, procesar un mayor número de muestras, aumentar la sensibilidad y hacer comparables nuestros resultados con los reportados por otros países.

Al concluir el período que delimita la vigilancia de la primera pandemia del presente siglo en el mundo, los LNR procesaron un total de 14 510 muestras procedentes de casos esporádicos, brotes, pacientes con IRAG y fallecidos sospechosos de infección por el virus influenza A (H1N1) pdm09 de todo el país y un total de 1805 muestras fueron positivas a este agente. La detección del nuevo virus se asoció significativamente a la condición de ser viajero ($p=0,01$), al estudio de brotes ($p=0,00$), el diagnóstico clínico de ETI ($p=0,00$), e IRAG ($p=0,00$) y un 7,7% de las muestras tomadas de pacientes gestantes resultaron positivas al virus pandémico.

La detección del virus influenza A (H1N1) pdm09 en viajeros de manera significativa es reflejo de la vigilancia intensiva sobre esta población a la que se identifica como uno de los factores más importantes en la emergencia y re-emergencia de las enfermedades infecciosas.

Algunas características biológicas del nuevo agente como la ausencia de marcadores de virulencia explican su comportamiento menos virulento (causa de enfermedad leve en el mayor porcentaje de los casos) en comparación con los virus pandémicos y los virus de influenza estacional (320, 333). Sin embargo existen autores que plantean que el virus A (H1N1) pdm09 posee una mayor patogenicidad y transmisibilidad que las cepas estacionales. Para sustentar estos planteamientos señalan que el nuevo agente es capaz de unirse a receptores de ácido siálico α 2,3 localizados en las células del tracto respiratorio inferior, mientras que los virus estacionales solo reconocen el enlace α 2,6 frecuente en el tracto respiratorio superior. Esto sugiere que los pacientes infectados con el virus pandémico pueden experimentar mayor compromiso pulmonar y severidad del cuadro lo que explicaría su asociación significativa con la IRAG (320). Al mismo tiempo, la inoculación del virus influenza A (H1N1) pdm09 en animales de experimentación demostró en los mismos, el desarrollo de signos y síntomas más severos que los inoculados con virus de influenza estacional (334).

El escenario de las EIE continúa siendo complejo. Los virus influenza continúan evolucionando y permanece latente la circulación del virus influenza aviar A (H5N1) que ha demostrado poder cruzar la barrera de especie infectando esporádicamente a humanos en diferentes regiones del mundo (20). Cuando y en que lugar puede emerger un virus de influenza pandémica nuevo, no es posible predecir.

No se puede cambiar la capacidad evolutiva de los microorganismos para causar enfermedades en el ser humano, pero si es posible modificar la conducta humana, en su concepción más amplia, a la luz de los conocimientos sobre las enfermedades infecciosas resultantes de las investigaciones. Solamente de esta manera, podremos aminorar el impacto negativo de las enfermedades infecciosas sobre las sociedades humanas presentes y futuras.

Continuar el fortalecimiento de las capacidades de los LNR haciendo uso de la tecnología que hoy disponemos, desarrollando métodos diagnósticos nuevos sensibles, actualizando o modificando periódicamente los disponibles, garantizaremos la continuidad del desarrollo científico-técnico que hoy nos permitió conocer que algunos virus respiratorios emergentes circularon en Cuba asociados a diferentes cuadros clínicos y eventos epidemiológicos.

VI. CONCLUSIONES

- El brote de Síndrome Febril Agudo Inespecífico ocurrido en La Habana, en el mes de julio del año 2005 estuvo constituido por dos eventos individuales para los cuales los AdVH se identificaron como los agentes etiológicos.
- La *especie C* serotipo 5 de los AdVH se identificó por primera vez en Cuba, como el agente causal de un brote de miocarditis fatal en la población pediátrica.
- La identificación inusual de los AdVH de la *especie D* en niños presuntamente inmunocompetentes con sintomatología gastrointestinal sugiere la posible circulación en Cuba de variantes de este agente reportadas a nivel mundial y deben tomarse en cuenta para eventos epidemiológicos futuros.
- El ensayo de TR-RCP anidado múltiple optimizado, posibilitó la identificación sensible y específica de la circulación por primera vez en Cuba de dos virus respiratorios emergentes (Metapneumovirus y Bocavirus humano).
- La detección de MPVH y BoVH en niños ≤ 5 años de edad asociados significativamente con infecciones de las vías respiratorias inferiores confirma el papel de estos agentes en la etiología de las IRA en edades tempranas de la vida.
- El algoritmo de diagnóstico molecular desarrollado para la vigilancia de la influenza pandémica en Cuba resultó ser útil para la identificación oportuna de la circulación del virus influenza A (H1N1) pdm09 constituyendo una estrategia a seguir para eventos pandémicos futuros.
- El virus influenza A (H1N1) pdm09 circuló en todo el país asociado a un curso clínico de leve a moderado y experimentó dos picos de actividad en su circulación relacionados con altos índices de atención médica.

VII. RECOMENDACIONES

1. Caracterizar mediante una estrategia diferente de secuenciación nucleotídica los AdvH de la *especie D* identificados como agentes etiológicos de un brote de Síndrome febril y manifestaciones gastrointestinales ocurrido en La Habana en julio del año 2005.
2. Realizar estudios integrales clínicos, epidemiológicos y virológicos durante varios años consecutivos que contribuyan a esclarecer las características del Metapneumovirus humano y el Bocavirus humano.
3. Desarrollar e introducir en la práctica del laboratorio nuevos ensayos de diagnóstico molecular para la identificación retrospectiva y prospectiva de la circulación de otros virus respiratorios emergentes (CoVH NL63 y HKU1, nuevos poliomavirus) en Cuba.
4. Realizar investigaciones retrospectivas clínicas, epidemiológicas y virológicas de la circulación del virus influenza (H1N1) pdm09 a nivel local y nacional.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berkelman R. The conquest of infectious diseases: who are we kidding? *Ann Int Med* 1993;119:426-28.
2. WHO. The World Health Report 2004. Changing history In: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data WHO, Geneva, Switzerland 2004:120-4.
3. Monto AS. Epidemiology of viral respiratory infections. *Am J Med.* 2002; 22;112 Suppl 6A:4S-12S.
4. Bertino JS. Cost burden of viral respiratory infections: issues for formulary decision makers. *Am J Med.* 2002; 22;112 Suppl 6A:42S-9S.
5. Sándor B, Thorén P, LeBalanc N, Viljoen G. Advances in viral disease diagnostic and molecular epidemiological technologies. *Exp Rev Mol Diagn.* 2009;9(4):367-81.
6. Fred MI, Young NL, To T, Cheng A, Lan F, Wang EE. Molecular diagnosis of acute respiratory infections. *J Virol.* 2008;8(10):620-3.
7. Osterhaus AD. New respiratory viruses of humans. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27(10 Suppl):S71-4.
8. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med.* 2001;7(6):719-24.
9. Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348(20):1967-76.
10. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med.* 2004;10(4):368-73.
11. Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol.* 2005;79(2):884-95.
12. 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(36):12891-6.
13. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog.* 2007;3(5):e64.

14. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, et al. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol*. 2007;81(8):4130-6.
15. Huang T, Wang W, Bessaud M, Ren P, Sheng J, Yan H, et al. Evidence of recombination and genetic diversity in human rhinoviruses in children with acute respiratory infection. *PLoS One*. 2009;4(7):e6355.
16. He CQ, Han GZ, Wang D, Liu W, Li GR, Liu XP, et al. Homologous recombination evidence in human and swine influenza A viruses. *Virology*. 2008;380(1):12-20.
17. Rebelo-de-Andrade H, Pereira C, Giria M, Prudencio E, Brito MJ, Cale E, et al. Outbreak of acute respiratory infection among infants in Lisbon, Portugal, caused by human adenovirus serotype 3 and a new 7/3 recombinant strain. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1391-6.
18. Yang Z, Zhu Z, Tang L, Wang L, Tan X, Yu P, et al. Genomic analyses of recombinant adenovirus type 11a in China. *J Clin Microbiol*. 2009;47(10):3082-90.
19. Wang H, Tuve S, Erdman DD, Lieber A. Receptor usage of a newly emergent adenovirus type 14. *Virology*. 2009;387(2):436-41.
20. WHO. Cumulative Number of Confirmed Human Cases (C) and Deaths (D) of Avian Influenza A (H5N1) Reported to WHO, as of 25 Nov 2011. 2011 [updated 2011; cited 2011 Nov]; Available from: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/index.html
21. Yacoub A, Kiss I, Zohari S, Hakhverdyan M, Czifra G, Mohamed N, et al. The rapid molecular subtyping and pathotyping of avian influenza viruses. *J Virol Methods*. 2009;56(1-2):157-61.
22. MMWR. Outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus infection—Mexico, March–April 2009. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2009;58:467-70.
23. MINSAP. Anuario Estadístico de Salud. República de Cuba. 2010.
24. MINSAP. Programa Integral de Atención y Control de las IRA. Ministerio de Salud Pública. República de Cuba. 2000.
25. Valdes O, Savon C, Goyenechea A, Palerm L, Gonzalez G, Melero J, et al. Caracterización genética molecular del virus Sincitial respiratorio humano en Cuba. *Biotechnologia Aplicada*. 2005;22:34-7.
26. Savon C, Goyenechea A, Valdivia A, Chacon D, Cancio R, Angel-Perez L, et al. Detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by 24-well plate precentrifugation assay using a monoclonal antibody against F protein. *Arch Med Res*. 2000;31(1):93-6.
27. Oropesa Fernandez S, Abreu Nicot I, Morier L, Hernandez Espinosa B, Gonzalez Z, Goyenechea A. [Hemorrhagic pneumonia caused by influenza virus: virological diagnosis]. *Rev Cubana Med Trop*. 2000;52(1):73-5.

28. Fauci A. Infectious diseases: considerations for the 21st century. *Clin Infect Dis.* 2001;32:675-85.
29. Kahn RE, Clouser DF, Richt JA. Emerging Infections: A Tribute to the One Medicine, One Health Concept. *Zoonoses Public Health.* 2009;20: 48-57.
30. Fauci A. Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases: Influenza as a Prototype of the Host-Pathogen Balancing Act. *Cell* 2006;124:665-70.
31. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature.* 2008;451(7181):990-3.
32. Morens D, Folkers G, Fauci A. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature.* 2004;430:242-9.
33. Richardson P, McKenna W, Bristow M. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. . *Circulation.* 1996;93:841-42.
34. Tobin J. Myocarditis. In: Allen H, Gutgesell H, Clark E, editors. *Moss and Adams' heart disease in infants, children, and adolescents including the fetus and young adult.* 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 1197– 215.
35. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: An American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee. *Circulation.* 2006;113:1807-16.
36. Kühl UM, Pauschinger M, Noutsias B, Seeberg T, Bock D, Lassner W, et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation.* 2005;111:887-93.
37. Magnani JW, Dec GW. Myocarditis: Current Trends in Diagnosis and Treatment. *Circulation* 2006;113:676-890.
38. Dennert R, Crijns HJ, Heymans S. Acute viral myocarditis. *Eur Heart J.* 2008;29:2073-82.
39. Cunarro Alonso A, Bezanilla Lopez C, Martinez Campos M, Espino Hernandez M, Perez-Lescure Picarzo J, Rabano Gutierrez del Arroyo A. [Cardiac arrest: fatal presentation of viral myocarditis]. *An Pediatr (Barc).* 2009;71(5):432-5.
40. Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Hum Pathol.* 1987;18(6):619-24.
41. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, Pauschinger M, Schultheiss HP, McCarthy R, et al. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42(3):466-72.

42. Huhn GD, Gross C, Schnurr D, Preas C, Yagi S, Reagan S, et al. Myocarditis Outbreak among Adults, Illinois, 2003. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(10):1621-4.
43. Mounts AW, Amr S, Jamshidi R, Groves C, Dwyer D, Guarner J, et al. A cluster of fulminant myocarditis cases in children, Baltimore, Maryland, 1997. *Pediatr Cardiol.* 2001;22(1):34-9.
44. Stedman T. *Medical dictionary.* . 28th ed Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2006:123.
45. Garbino J, Gerbase MW, Wunderli W, Kolarova L, Nicod LP, Rochat T, et al. Respiratory viruses and severe lower respiratory tract complications in hospitalized patients. *Chest.* 2004;125(3):1033-9.
46. WHO. Prevención y control de enfermedades respiratorias agudas con tendencia epidémica y pandémica durante la atención sanitaria. Pautas de la OMS. WHO/CDS/EPR/20076. 2007.
47. Mizgerd JP. Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med.* 2008;358(7):716-27.
48. PAHO-CDC. Generic Protocol for Influenza Surveillance. . 2006 [updated 2006; cited]; Available from: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/flu-snl-gpis.pdf>.
49. Rodrigo C, Almirante B, T. P. Viriasis respiratorias. En: Rozman C, ed Farreras-Rozman *Medicina Interna*, 15ª ed Madrid: Harcourt. 2004:2481-9.
50. Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R, Tenorio A, Casas I, Pozo F, Ruiz G, et al. [Microbiological diagnosis of viral respiratory infections]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(3):168-77.
51. Thomson RB, Jr. Laboratory diagnosis of respiratory infections. *Curr Opin Infect Dis.* 1999;12(2):115-9.
52. Kronic N, Merante F, Yaghoubian S, Himsworth D, Janeczko R. Advances in the diagnosis of respiratory tract infections: role of the Luminex xTAG respiratory viral panel. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1222(1):6-13.
53. Li PQ, Zhang J, Muller CP, Chen JX, Yang ZF, Zhang R, et al. Development of a multiplex real-time polymerase chain reaction for the detection of influenza virus type A including H5 and H9 subtypes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;61(2):192-7.
54. 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(1):53-6.
55. Alvarez MM, Lopez-Pacheco F, Aguilar-Yanez JM, Portillo-Lara R, Mendoza-Ochoa GI, Garcia-Echauri S, et al. Specific recognition of influenza A/H1N1/2009 antibodies in human serum: a simple virus-free ELISA method. *PLoS One.* 2010;5(4):e10176.
56. Storch G. Diagnostic Virology. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 566-604.

57. Heymann D. Virosis agudas de las vías respiratorias. In: Heymann DL, eds El control de las enfermedades transmisibles, 18th ed American Public Health Association. 2005:708-15.
58. Rowe W, Huebner R, Gilmore L, Parrott R, Ward T. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. . Proc Soc Exp Biol Med 1953;84:570-73.
59. Wold William S, Horwitz M. Adenoviruses. In: Fields B, Knipe D, Howley P, Griffin D, editors. Fields Virology 5ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2396-436.
60. De Jong J, Wermenbol A, Verweij-Uijterwaal M, Slaterus K, Wertheim-Van Dillen P, Van Doornum G. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. . J Clin Microbiol 1999;37:3940-45.
61. Moro MR, Bonville CA, Suryadevara M, Cummings E, Faddoul D, Kobayaa H, et al. Clinical features, adenovirus types, and local production of inflammatory mediators in adenovirus infections. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(5):376-80.
62. Metzgar D, Osuna M, Kajon AE, Hawksworth AW, Irvine M, Russell KL. Abrupt emergence of diverse species B adenoviruses at US military recruit training centers. *J Infect Dis.* 2007;196(10):1465-73.
63. Hakim FA, Tleyjeh IM. Severe adenovirus pneumonia in immunocompetent adults: a case report and review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;27(2):153-8.
64. Harley D, Harrower B, Lyon M, Dick A. A primary school outbreak of pharyngoconjunctival fever caused by adenovirus type 3. *Commun Dis Intell.* 2001;25:9-12.
65. Mielke J, Grub M, Freudenthaler N, Deuter CM, Beck R, Zierhut M. [Epidemic keratoconjunctivitis. Detecting adenoviruses]. *Ophthalmologe.* 2005;102(10):968-70.
66. Leen AM, Rooney CM. Adenovirus as an emerging pathogen in immunocompromised patients. *Br J Haematol.* 2005;128(2):135-44.
67. Carrigan DR. Adenovirus infections in immunocompromised patients. *Am J Med.* 1997;102(3A):71-4.
68. Terletskaja-Ladwig E, Leinmuller M, Schneider F, Meier S, Enders M. Laboratory approaches to the diagnosis of adenovirus infection depending on clinical manifestations. *Infection.* 2007;35(6):438-43.
69. Sadeghi CD, Aebi C, Gorgievski-Hrisoho M, Muhlemann K, Barbani MT. Twelve years' detection of respiratory viruses by immunofluorescence in hospitalised children: impact of the introduction of a new respiratory picornavirus assay. *BMC Infect Dis.* 2011;11:41.

70. Ong H, Chandran V. Identification of gastroenteric viruses by electron microscopy using higher order spectral features. *J Clin Virol.* 2005;34(3):195-206.
71. Echavarría M, Maldonado D, Elbert G, Videla C, Rappaport R, Carballal G. Use of PCR to demonstrate presence of adenovirus species B, C, or F as well as coinfection with two adenovirus species in children with flu-like symptoms. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):625-7.
72. Metzgar D, Osuna M, Yingst S, Rakha M, Earhart K, Elyan D, et al. PCR analysis of Egyptian respiratory adenovirus isolates, including identification of species, serotypes, and coinfections. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5743-52.
73. Claas EC, Schilham MW, de Brouwer CS, Hubacek P, Echavarría M, Lankester AC, et al. Internally controlled real-time PCR monitoring of adenovirus DNA load in serum or plasma of transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2005;43(4):1738-44.
74. Casas I, Avellón A, Mosquera M, Jabado O, Echevarría JE, Campos RH, et al. Molecular identification of adenoviruses in clinical samples by analyzing a partial hexon genomic region. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12):6176-82.
75. Shimada Y, Ariga T, Tagawa Y, Aoki K, Ohno S, Ishiko H. Molecular diagnosis of human adenoviruses D and E by a phylogeny-based classification method using a partial hexon sequence. *J Clin Microbiol.* 2004;42(4):1577-84.
76. Schmitz H, Wigand R, Heinrich W. Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am J Epidemiol.* 1983;117(4):455-66.
77. Tang L, Wang L, Tan X, Xu W. Adenovirus serotype 7 associated with a severe lower respiratory tract disease outbreak in infants in Shaanxi Province, China. *Virol J.* 2011;8:23-8.
78. Krilov LR. Adenovirus infections in the immunocompromised host. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24(6):555-6.
79. Nazir SA, Metcalf JP. Innate immune response to adenovirus. *J Investig Med.* 2005;53(6):292-304.
80. Tate JE, Bunning ML, Lott L, Lu X, Su J, Metzgar D, et al. Outbreak of severe respiratory disease associated with emergent human adenovirus serotype 14 at a US air force training facility in 2007. *J Infect Dis.* 2009;199(10):1419-26.
81. Kajon AE, Dickson LM, Metzgar D, Hough HS, Lee V, Tan BH. Outbreak of febrile respiratory illness associated with adenovirus 11a infection in a Singapore military training cAMP. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1438-41.

82. Collins PL, James E, Crowe J. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th Edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1601-46.
83. Schildgen O. The lack of protective immunity against RSV in the elderly. *Epidemiol Infect*. 2009;137(12):1687-90.
84. Collins CL, Pollard AJ. Respiratory syncytial virus infections in children and adults. *J Infect*. 2002;45(1):10-7.
85. Manoha C, Espinosa S, Aho SL, Huet F, Pothier P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *J Clin Virol*. 2007;38(3):221-6.
86. Thorburn K. Pre-existing disease is associated with a significantly higher risk of death in severe respiratory syncytial virus infection. *Arch Dis Child*. 2008;94(2):99-103.
87. Henrickson KJ, Hall CB. Diagnostic assays for respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(11 Suppl):S36-40.
88. Hymas WC, Mills A, Ferguson S, Langer J, She RC, Mahoney W, et al. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for detection of influenza A, influenza B, RSV and typing of the 2009-H1N1 influenza virus. *J Virol Methods*. 2010;167(2):113-8.
89. Kim SR, Ki CS, Lee NY. Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *J Virol Methods*. 2009;156(1-2):111-6.
90. Meddens MJ, Herbrink P, Lindeman J, van Dijk WC. Serodiagnosis of respiratory syncytial virus (RSV) infection in children as measured by detection of RSV-specific immunoglobulins G, M, and A with enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*. 1990;28(1):152-5.
91. White LJ, Waris M, Cane PA, Nokes DJ, Medley GF. The transmission dynamics of groups A and B human respiratory syncytial virus (hRSV) in England & Wales and Finland: seasonality and cross-protection. *Epidemiol Infect*. 2005;133(2):279-89.
92. Hemalatha R, Swetha GK, Seshacharyulu M, Radhakrishna KV. Respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infections. *Indian J Pediatr*. 2010;77(7):755-8.
93. van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology*. 2002;295(1):119-32.
94. Williams JV. Human Metapneumovirus: An Important Cause of Respiratory Disease in Children and Adults. *Curr Infect Dis Rep*. 2005;7(3):204-10.

95. Rigal E, Maakaroun-Vermesse Z, Gaudy-Graffin C, Bonnemaïson E, Marchand S, Labarthe F, et al. Epidemiological and clinical description of human metapneumovirus infectious diseases in children. *Arch Pediatr.* 2009;17(1):26-33.
96. 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(12):1240-1.
97. Abed Y, Boivin G. Human metapneumovirus infection in immunocompromised child. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(5):854-6.
98. Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moïsan D, Côté S, 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(9):1330-4.
99. Garcia-Garcia ML, Calvo C, Casas I, Bracamonte T, Rellan A, Gozalo F, et al. Human metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5. *Pediatr Pulmonol.* 2007;42(5):458-64.
100. Schildgen O, Geikowski T, Glatzel T, Simon A, Wilkesmann A, Roggendorf M, et al. New variant of the human metapneumovirus (HMPV) associated with an acute and severe exacerbation of asthma bronchiale. *J Clin Virol.* 2004;31(4):283-8.
101. McNamara PS, Flanagan BF, Smyth RL, Hart CA. Impact of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus co-infection in severe bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol.* 2007;42(8):740-3.
102. Kaida A, Kubo H, Goto K, Shiomi M, Kohdera U, Iritani N. Co-infection of human metapneumovirus with adenovirus or respiratory syncytial virus among children in Japan. *Microbiol Immunol.* 2007;51(7):679-83.
103. Calico I, Lowak M, Bas A, Betbese MT, Fuentes F, Loaiza N. A comparative study of direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, and culture for diagnosing metapneumovirus infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(6):322-5.
104. Liu L, Bastien N, Sidaway F, Chan E, Li Y. Seroprevalence of human metapneumovirus (hMPV) in the Canadian province of Saskatchewan analyzed by a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Med Virol.* 2007;79(3):308-13.
105. Lu G, Gonzalez R, Guo L, Wu C, Wu J, Vernet G, et al. Large-scale seroprevalence analysis of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus infections in Beijing, China. *Virology.* 2011;8:62.

106. Jokela P, Piiparinen H, Luiro K, Lappalainen M. Detection of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by duplex real-time RT-PCR assay in comparison with direct fluorescent assay. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(10):1568-73.
107. Bonroy C, Vankeerberghen A, Boel A, De Beenhouwer H. Use of a multiplex real-time PCR to study the incidence of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus infections during two winter seasons in a Belgian paediatric hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(5):504-9.
108. Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB, Quinto JD, Chu M, de Graaf M, et al. Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *J Clin Microbiol.* 2004;42(3):981-6.
109. Pizzorno A, Masner M, Medici C, Sarachaga MJ, Rubio I, Mirazo S, et al. Molecular detection and genetic variability of human metapneumovirus in Uruguay. *J Med Virol.* 2010;82(5):861-5.
110. El Sayed Zaki M, Raafat D, El-Metaal AA, Ismail M. Study of human metapneumovirus-associated lower respiratory tract infections in Egyptian adults. *Microbiol Immunol.* 2009;53(11):603-8.
111. Don M, Korppi M, Valent F, Vainionpaa R, Canciani M. Human metapneumovirus pneumonia in children: results of an Italian study and mini-review. *Scand J Infect Dis.* 2008;40(10):821-6.
112. Kahn JS. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):546-57.
113. Boivin G, De Serres G, Cote S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(6):634-40.
114. Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Ishiko H, Kobayashi K. Comparison of the seroprevalence of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus. *J Med Virol.* 2004;72(2):304-6.
115. Wolf DG, Zakay-Rones Z, Fadeela A, Greenberg D, Dagan R. High seroprevalence of human metapneumovirus among young children in Israel. *J Infect Dis.* 2003;188(12):1865-7.
116. Bastien N, Ward D, Van Caesele P, Brandt K, Lee SH, McNabb G, et al. Human metapneumovirus infection in the Canadian population. *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4642-6.
117. Peiris JS, Tang WH, Chan KH, Khong PL, Guan Y, Lau YL, et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(6):628-33.
118. Chano F, Rousseau C, Laferriere C, Couillard M, Charest H. Epidemiological survey of human metapneumovirus infection in a large pediatric tertiary care center. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5520-5.
119. Allander T. Human bocavirus. *J Clin Virol.* 2008;41(1):29-33.
120. Martin ET, Taylor J, Kuypers J, Magaret A, Wald A, Zerr D, et al. Detection of bocavirus in saliva of children with and without respiratory illness. *J Clin Microbiol.* 2009;47(12):4131-2.

121. Karalar L, Lindner J, Schimanski S, Kertai M, Segerer H, Modrow S. Prevalence and clinical aspects of human bocavirus infection in children. *Clin Microbiol Infect.* 2009;16(6):633-9.
122. Foulongne V, Segondy M. [Human bocavirus (HBoV)]. *Pathol Biol.* 2009;57(2):197-202.
123. Christensen A, Nordbo SA, Krokstad S, Rognlien AG, Dollner H. Human bocavirus in children: mono-detection, high viral load and viraemia are associated with respiratory tract infection. *J Clin Virol.* 2010;49(3):158-62.
124. Calvo C, Garcia-Garcia ML, Blanco C, Santos MJ, Pozo F, Perez-Brena P, et al. Human bocavirus infection in a neonatal intensive care unit. *J Infect.* 2008;57(3):269-71.
125. Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis.* 2007;44(7):904-10.
126. Milder E, Arnold JC. Human metapneumovirus and human bocavirus in children. *Pediatr Res.* 2009;65(52):78R-83R.
127. Midulla F, Scagnolari C, Bonci E, Pierangeli A, Antonelli G, De Angelis D, et al. Respiratory syncytial virus, human bocavirus and rhinovirus bronchiolitis in infants. *Arch Dis Child.* 2009;95(1):35-41.
128. Szomor KN, Kapusinszky B, Rigo Z, Kis Z, Rozsa M, Farkas A, et al. Detection of human bocavirus from fecal samples of Hungarian children with acute gastroenteritis. *Intervirology.* 2009;52(1):17-21.
129. Han TH, Kim CH, Park SH, Kim EJ, Chung JY, Hwang ES. Detection of human bocavirus-2 in children with acute gastroenteritis in South Korea. *Arch Virol.* 2009;154(12):1923-7.
130. Schildgen O, Muller A, Simon A. Human bocavirus and gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(10):1620-1.
131. Tozer SJ, Lambert SB, Whiley DM, Bialasiewicz S, Lyon MJ, Nissen MD, et al. Detection of human bocavirus in respiratory, fecal, and blood samples by real-time PCR. *J Med Virol.* 2009;81(3):488-93.
132. Choi JH, Chung YS, Kim KS, Lee WJ, Chung IY, Oh HB, et al. Development of real-time PCR assays for detection and quantification of human bocavirus. *J Clin Virol.* 2008;42(3):249-53.
133. Lin F, Guan W, Cheng F, Yang N, Pintel D, Qiu J. ELISAs using human bocavirus VP2 virus-like particles for detection of antibodies against HBoV. *J Virol Methods.* 2008;149(1):110-7.
134. Kahn JS, Kesebir D, Cotmore SF, D'Abramo A, Jr., Cosby C, Weibel C, et al. Seroepidemiology of human bocavirus defined using recombinant virus-like particles. *J Infect Dis.* 2008;198(1):41-50.
135. Foulongne V, Olejnik Y, Perez V, Elaerts S, Rodiere M, Segondy M. Human bocavirus in French children. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(8):1251-3.

136. Chung JY, Han TH, Kim CK, Kim SW. Bocavirus infection in hospitalized children, South Korea. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(8):1254-6.
137. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human Bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(5):848-50.
138. Arnold J. Human bocavirus in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(6):557-8.
139. Endo R, Ishiguro N, Kikuta H, Teramoto S, Shirkoohi R, Ma X, et al. Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan. *J Clin Microbiol.* 2007;45(10):3218-23.
140. Cheung T, Poon L. Biology of influenza a virus. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1102:1-25.
141. Palese P, Shaw M. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM HP, editors. *Fields Virology, 5th Edition*, editor.: Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. ; 2007. p. 1648-89.
142. Wright P, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology. 5th ed.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1692-740.
143. Baigent SJ, McCauley JW. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. *Bioessays.* 2003;25(7):657-71.
144. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature.* 2009;459(7249):931-9.
145. Neumann G, Kawaoka Y. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(6):881-86.
146. Monto AS. Epidemiology of influenza. *Vaccine.* 2008;26 Suppl 4:D45-8.
147. Monto AS, Gravenstein S, Elliott M, Colopy M, Schweinle J. Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Arch Intern Med.* 2000;160(21):3243-7.
148. Esposito S, Marchisio P, Principi N. The global state of influenza in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27(11 Suppl):S149-53.
149. Calvo Rey C, Garcia Garcia ML, Casas Flecha I, Martin del Valle F, Centeno Jimenez M, Perez-Brena P. [Influenza virus infections in infants aged less than two years old]. *An Pediatr.* 2005;63(1):22-8.
150. Krilov LR. This issue: focus on influenza. *Pediatr Ann.* 2009;38(12):637-8.
151. Bramley AM, Bresee J, Finelli L. Pediatric influenza. *Pediatr Nurs.* 2009;35(6):335-45.
152. Arostegi Kareaga N, Montes M, Perez-Yarza EG, Sardon O, Vicente D, Cilla G. [Clinical characteristics of children hospitalized for influenza virus infection]. *An Pediatr.* 2005;62(1):5-12.
153. Ison MG. Influenza in hospitalized adults: gaining insight into a significant problem. *J Infect Dis.* 2009;200(4):485-8.

154. Geddes AM. Influenza and bacterial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34(4):293-4.
155. Seki M, Kosai K, Yanagihara K, Higashiyama Y, Kurihara S, Izumikawa K, et al. Disease severity in patients with simultaneous influenza and bacterial pneumonia. *Intern Med*. 2007;46(13):953-8.
156. Rothberg MB, Haessler SD. Complications of seasonal and pandemic influenza. *Crit Care Med*. 2009;38(4 Suppl):e91-7.
157. Bozzo P, Djokanovic N, Koren G. H1N1 influenza in pregnancy: risks, vaccines, and antivirals. *J Obstet Gynaecol Can*. 2009;31(12):1172-5.
158. Nichols WG, Guthrie KA, Corey L, Boeckh M. Influenza infections after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, mortality, and the effect of antiviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2004;39(9):1300-6.
159. Quach C, Piche-Walker L, Platt R, Moore D. Risk factors associated with severe influenza infections in childhood: implication for vaccine strategy. *Pediatrics*. 2003;112(31):e197-201.
160. Madeley CR, Peiris JS. Methods in virus diagnosis: immunofluorescence revisited. *J Clin Virol*. 2002;25(2):121-34.
161. WHO. Manual for the diagnosis and virological surveillance of influenza. WHO Global Influenza Surveillance Network. WHO press, Geneva, Switzerland. 2011.
162. Couch R, Rasel J. Influenza. In: Lenette E, Lenette D, Lenette E, editors. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. 7 ed. Washington: American Public Health Association; 1995. p. 431-46.
163. Bastien N, Antonishyn NA, Brandt K, Wong CE, Chokani K, Vegh N, et al. Human infection with a triple-reassortant swine influenza A(H1N1) virus containing the hemagglutinin and neuraminidase genes of seasonal influenza virus. *J Infect Dis*. 2010;201(8):1178-82.
164. Myers KP, Olsen CW, Gray GC. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2007;44(8):1084-8.
165. MMWR. Isolation of avian influenza A(H5N1) viruses from humans—Hong Kong, May-December 1997. *Morb Mortal Wkly Rep*. 1997;46(50):1204-7.
166. Jackson D, Elderfield RA, Barclay WS. Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era. *J Gen Virol*. 2010;92(1):1-17.
167. Roy T, Agrawal AS, Mukherjee A, Mishra AC, Chadha MS, Kaur H, et al. Surveillance and molecular characterization of human influenza B viruses during 2006-2010 revealed co-circulation of Yamagata-like and Victoria-like strains in eastern India. *Infect Genet Evol*. 2011;11(7):1595-601.

168. Wang R, Taubenberger JK. Methods for molecular surveillance of influenza. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(5):517-27.
169. Abdelwhab el SM, Erfan AM, Grund C, Ziller M, Arafa AS, Beer M, et al. Simultaneous detection and differentiation by multiplex real time RT-PCR of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 classic (clade 2.2.1 proper) and escape mutant (clade 2.2.1 variant) lineages in Egypt. *Virology.* 2010;7:260.
170. Han X, Lin X, Liu B, Hou Y, Huang J, Wu S, et al. Simultaneously subtyping of all influenza A viruses using DNA microarrays. *J Virol Methods.* 2008;152(1-2):117-21.
171. Ellis JS, Zambon MC. Molecular diagnosis of influenza. *Rev Med Virol.* 2002;12(6):375-89.
172. CDC. How the Flu Virus Can Change: "Drift" and "Shift" Atlanta: CDC; 2009 [updated 2009; cited 16 June 2010]; Available from: <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm>. 2009.
173. Yen HL, Webster RG. Pandemic influenza as a current threat. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;333:3-24.
174. Guan Y, Vijaykrishna D, Bahl J, Zhu H, Wang J, Smith GJ. The emergence of pandemic influenza viruses. *Protein Cell.* 2011;1(1):9-13.
175. Enserink M. Virology. From two mutations, an important clue about the Spanish flu. *Science.* 2007;315(5812):582.
176. Liu J, Stevens DJ, Haire LF, Walker PA, Coombs PJ, Russell RJ, et al. Structures of receptor complexes formed by hemagglutinins from the Asian Influenza pandemic of 1957. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(40):17175-80.
177. Fabian GT. Pandemic influenza and lessons from history. *J S C Med Assoc.* 2008;104(5):126-31.
178. Heymann D. Influenza. . In: Heymann D, editor. *El control de las enfermedades transmisibles.* 18 ed. Washintong: American Public Health Association; 2005. p. 379-86.
179. CDC. Origin of 2009 H1N1 Flu (Swine Flu): Questions and Answers. Atlanta: CDC; 2009 [updated 2009; cited 21 June 2010]; Available from: http://www.cdc.gov/h1n1flu/information_h1n1_virus_qa.htm. 2009.
180. WHO. World Health Organization: Influenza-like illness in the United States and Mexico. 2009 [updated 2009; cited 2011 March 23]; Available from: http://www.who.int/csr/don/2009_04_24/en/index.html.
181. Lipsitch M, Viboud C. Influenza seasonality: lifting the fog. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(10):3645-6.
182. Leo YS, Lye DC, Chow A. Influenza in the tropics. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(8):457-8.

183. Pozzetto B, Grattard F, Pillet S. Multiplex PCR theranostics of severe respiratory infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(3):251-3.
184. Metzker M. Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews-Genetics.* 2010:11-13.
185. Fox JD. Nucleic acid amplification tests for detection of respiratory viruses. *J Clin Virol.* 2007;40 Suppl 1:S15-23.
186. Fox JD. Nucleic acid amplification tests for the detection and analysis of respiratory viruses: the future for diagnostics? *Future Microbiol.* 2007;2(2):199-211.
187. Mahony J, Chong S, Merante F, Yaghoobian S, Sinha T, Lisle C, et al. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):2965-70.
188. Letant SE, Ortiz JI, Bentley Tammero LF, Birch JM, Derlet RW, Cohen S, et al. Multiplexed reverse transcriptase PCR assay for identification of viral respiratory pathogens at the point of care. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3498-505.
189. Belak S, Thoren P, LeBlanc N, Viljoen G. Advances in viral disease diagnostic and molecular epidemiological technologies. *Expert Rev Mol Diagn.* 2009;9(4):367-81.
190. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22(5):299-305.
191. Peiris JS, Poon LL. Detection of SARS coronavirus in humans and animals by conventional and quantitative (real time) reverse transcription polymerase chain reactions. *Methods Mol Biol.* 2008;454:61-72.
192. Gainotti R, Ricarte C, Ebekian B, Videla C, Carballal G, Damonte EB, et al. Real time PCR for rapid determination of susceptibility of adenovirus to antiviral drugs. *J Virol Methods.* 2009;164(1-2):30-4.
193. Sidoti F, Rizzo F, Costa C, Astegiano S, Curtioni A, Mandola ML, et al. Development of real time RT-PCR assays for detection of type A influenza virus and for subtyping of avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Mol Biotechnol.* 2009;44(1):41-50.
194. Poon LL, Chan KH, Wong OK, Yam WC, Yuen KY, Guan Y, et al. Early diagnosis of SARS coronavirus infection by real time RT-PCR. *J Clin Virol.* 2003;28(3):233-8.
195. Furuse Y, Suzuki A, Kamigaki T, Oshitani H. Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis. *Virol J.* 2009;6:67.
196. Ren W, Li W, Yu M, Hao P, Zhang Y, Zhou P, et al. Full-length genome sequences of two SARS-like coronaviruses in horseshoe bats and genetic variation analysis. *J Gen Virol.* 2006;87(11):3355-9.

197. Cheng MF, Chen BC, Kao CL, Kao CH, Hsieh KS, Liu YC. Human metapneumovirus as a causative agent of lower respiratory tract infection in four patients: the first report of human metapneumovirus infection confirmed by RNA sequences in Taiwan. *Scand J Infect Dis.* 2006;38(5):392-6.
198. Tsai KN, Chen GW. Influenza genome diversity and evolution. *Microbes Infect.* 2011;33(2):23-8.
199. de Graaf M, Osterhaus AD, Fouchier RA, Holmes EC. Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. *J Gen Virol.* 2008;89(12):2933-42.
200. Zhou H, Yu Z, Hu Y, Tu J, Zou W, Peng Y, et al. The special neuraminidase stalk-motif responsible for increased virulence and pathogenesis of H5N1 influenza A virus. *PLoS One.* 2009;4(7):6277.
201. Wang H, Rao S, Jiang C. Molecular pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Microbes Infect.* 2007;9(1):119-26.
202. Baz M, Abed Y, Simon P, Hamelin ME, Boivin G. Effect of the neuraminidase mutation H274Y conferring resistance to oseltamivir on the replicative capacity and virulence of old and recent human influenza A(H1N1) viruses. *J Infect Dis.* 2010;201(5):740-5.
203. Monto AS. Implications of antiviral resistance of influenza viruses. *Clin Infect Dis.* 2009;48(4):397-9.
204. Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods.* 1995;53(1):25-36.
205. Coiras MT, Perez-Brena P, Garcia ML, Casas I. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol.* 2003;69(1):132-44.
206. Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Perez-Brena P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol.* 2004;72(3):484-95.
207. Kowk S, Higushi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature.* 1989;339:237-8.
208. Avellon A, Perez P, Aguilar JC, Lejarazu R, Echevarria JE. Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 2001;92(2):113-20.
209. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J Mol Evol* 1980;16:111-20.
210. Freymuth F, Vabret A, Dina J, Cuvillon-Nimal D, Lubin C, Vaudecrane A, et al. Bronchiolitis viruses. *Arch Pediatr.* 2010;17(8):1192-201.

211. Muller-Pebody B, Edmunds WJ, Zambon MC, Gay NJ, Crowcroft NS. Contribution of RSV to bronchiolitis and pneumonia-associated hospitalizations in English children, April 1995-March 1998. *Epidemiol Infect.* 2002;129(1):99-106.
212. Pozo F, Garcia-Garcia ML, Calvo C, Cuesta I, Perez-Brena P, Casas I. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol.* 2007;40(3):224-8.
213. Lopez-Huertas MR, Casas I, Acosta-Herrera B, Garcia ML, Coiras MT, Perez-Brena P. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods.* 2005;129(1):1-7.
214. Ruiz-Carrascoso G, Casas I, Pozo F, Perez-Gonzalez C, Reina J, Perez-Brena P. Development and implementation of influenza A virus subtyping and detection of genotypic resistance to neuraminidase inhibitors. *J Med Virol.* 2010;82(5):843-53.
215. WHO. Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans 2005. 2005 [updated 2005; cited 2011 April 25]; Available from: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/humanspecimens/en/index.html.
216. WHO. Information for Laboratory Diagnosis of New Influenza A (H1N1) Virus in Humans. 2009 [updated 2009; cited 2011 March 26]; Available from: http://www.who.int/csr/disease/pandemic_influenza/laboratory_diagnosis_2009_05_21/en/index.html
217. Valdés O, Piñón A, Acosta B, Savón C, González G, Arencibia A, et al. Design and implementation of a molecular method for influenza A virus (H1N1) in Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2011;63(1):15-20.
218. WHO. CDC protocol of real-time RT-RCP for Influenza A H1N1. 28 April 2009. . 2009 [updated 2009; cited 2011 March 3]; Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf
219. MINSAP. Plan Nacional para el enfrentamiento de la pandemia por el virus influenza A (H1N1) 2009. Ciudad de la Habana: Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba. 2009.
220. Agresti A. Inference for contingency tables. In: Balding D, Bloomfield P, Cressie N, Fisher N, Johnstone I, Kadane J, editors. *Categorical data analysis*. 2nd ed: Wiley-Interscience; 2008. p. 70-98.
221. WHO. WHO Global Technical Consultation: global standards and tools for influenza surveillance 2012 [updated 2012; cited 2012 July]; Available from: http://www.who.int/influenza/resources/documents/technical_consultation/en/index.html.

222. ONE. Estadística de población. República de Cuba: Oficina Nacional de Estadística. ; 2010 [updated 2010; cited 2010 28 May]; Available from: <http://www.one.cu/EstadisticaPoblacion/EstadisticaPoblacion.asp>.
223. Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med* 2000;343:1388-98. .
224. Batra A, Lewis A. Acute myocarditis. *Curr Opin Pediatr.* 2001;13:234-39.
225. Snyder M. Pediatric viral myocarditis. *Air Med J.* 2003;22(4):6-8.
226. Grumbach IM, Heim A, Pring-Akerblom P, Vonhof S, Hein WJ, Muller G, et al. Adenoviruses and enteroviruses as pathogens in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Acta Cardiol.* 1999;54(2):83-8.
227. Vare D, Vare B, Dauphin C, Lafeuille H, Gaulme J, Labbe A, et al. [Acute myocarditis in children. Study of 11 clinical cases]. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2000;93(5):571-9.
228. Ison MG. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2006;43(3):331-9.
229. Baughman KL. Diagnosis of myocarditis: death of Dallas criteria. *Circulation.* 2006;113(4):593-5.
230. Mendiondo B, Más P, Agramnonte S, Ortega Bruno L, G. A. Brote de Miocarditis. *Rev Cub Pediatría.* 1972;44:23-9.
231. Fodha I, Chouikha A, Dewar J, Trabelsi A, Boujaafar N, Steele AD. [Prevalence of adenovirus antigens in children presenting with acute diarrhoea]. *Med Trop (Mars).* 2007;67(3):256-8.
232. Mori T, Aisa Y, Shimizu T, Ikeda Y, Okamoto S, Okada K, et al. Hemorrhagic cystitis caused by adenovirus type 34 after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation.* 2005;79(5):624.
233. Ariga T, Shimada Y, Shiratori K, Ohgami K, Yamazaki S, Tagawa Y, et al. Five new genome types of adenovirus type 37 caused epidemic keratoconjunctivitis in Sapporo, Japan, for more than 10 years. *J Clin Microbiol.* 2005;43(2):726-32.
234. Clark B, McKendrick M. A review of viral gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis.* 2004;17(5):461-9.
235. Nebbia G, Chawla A, Schutten M, Atkinson C, Raza M, Johnson M, et al. Adenovirus viraemia and dissemination unresponsive to antiviral therapy in advanced HIV-1 infection. *AIDS.* 2005;19(12):1339-40.
236. Pumariaga T, Savon C, Mune M, Cancio R, Gonzalez G, Valdivia A, et al. Isolation and identification of adenovirus in hospitalized children, under five years, with acute respiratory disease, in Havana, Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95(6):859-61.
237. Savon C, Mune M, Goyenechea A, Valdivia A, Soto Y, Perez L. [Follicular conjunctivitis caused by an adenovirus. The characterization of its strains by restriction endonucleases]. *Rev Cubana Med Trop.* 1995;47(3):195-8.
238. Torres Rojas G, Goyenechea A, Savon C, Valdes O, Oropesa I. [The incidence of adenoviruses in viral conjunctivitis]. *Rev Cubana Med Trop.* 1998;50(3):182-5.

239. Mistchenko AS, Robaldo JF, Rosman FC, Koch ER, Kajon AE. Fatal adenovirus infection associated with new genome type. *J Med Virol.* 1998;54(3):233-6.
240. Schnurr D, Dondero ME. Two new candidate adenovirus serotypes. *Intervirology.* 1993;36(2):79-83.
241. Hierholzer JC, Wigand R, Anderson LJ, Adrian T, Gold JW. Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (types 43-47). *J Infect Dis.* 1988;158(4):804-13.
242. Kajon AE, Dickson LM, Murtagh P, Viale D, Carballal G, Echavarría M. Molecular characterization of an adenovirus 3-16 intertypic recombinant isolated in Argentina from an infant hospitalized with acute respiratory infection. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1494-6.
243. Beck ET, Henrickson KJ. Molecular diagnosis of respiratory viruses. *Future Microbiol.* 2010;5(6):901-16.
244. Tiveljung-Lindell A, Rotzen-Ostlund M, Gupta S, Ullstrand R, Grillner L, Zwegyberg-Wirgart B, et al. Development and implementation of a molecular diagnostic platform for daily rapid detection of 15 respiratory viruses. *J Med Virol.* 2009;81(1):167-75.
245. Mad'arova L, Feikova S, Kissova R, Klement C, Blaskovicova H, Takac B, et al. Polymerase chain reaction (PCR)—an efficient tool for diagnosis of influenza and acute respiratory illnesses during influenza season. *Cent Eur J Public Health.* 2008;16(2):59-64.
246. Mahony JB, Blackhouse G, Babwah J, Smieja M, Buracond S, Chong S, et al. Cost analysis of multiplex PCR testing for diagnosing respiratory virus infections. *J Clin Microbiol.* 2009;47(9):2812-7.
247. Markoulatos P, Sifakakos N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal.* 2002;16(1):47-51.
248. Kleines M, Scheithauer S, Rackowitz A, Ritter K, Hausler M. High prevalence of human bocavirus detected in young children with severe acute lower respiratory tract disease by use of a standard PCR protocol and a novel real-time PCR protocol. *J Clin Microbiol.* 2007;45(3):1032-4.
249. Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods.* 2005;126(1-2):53-63.
250. Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC, Claas EC. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol.* 2004;42(4):1564-9.

251. Druce J, Tran T, Kelly H, Kaye M, Chibo D, Kostecki R, et al. Laboratory diagnosis and surveillance of human respiratory viruses by PCR in Victoria, Australia, 2002-2003. *J Med Virol.* 2005;75(1):122-9.
252. Briese T, Palacios G, Kokoris M, Jabado O, Liu Z, Renwick N, et al. Diagnostic system for rapid and sensitive differential detection of pathogens. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(2):310-3.
253. Camps M, Ricart S, Dimova V, Rovira N, Munoz-Almagro C, Garcia JJ, et al. Prevalence of human metapneumovirus among hospitalized children younger than 1 year in Catalonia, Spain. *J Med Virol.* 2008;80(8):1452-60.
254. Abdullah Brooks W, Erdman D, Terebuh P, Klimov A, Goswami D, Sharmeen AT, et al. Human metapneumovirus infection among children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2008;13(10):1611-3.
255. Principi N, Bosis S, Esposito S. Human metapneumovirus in paediatric patients. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(4):301-8.
256. Bharaj P, Sullender WM, Kabra SK, Broor S. Human bocavirus infection in children with acute respiratory tract infection in India. *J Med Virol.* 2010;82(5):812-6.
257. Dina J, Vabret A, Gouarin S, Petitjean J, Lecoq J, Brouard J, et al. Detection of human bocavirus in hospitalised children. *J Paediatr Child Health.* 2009;45(3):149-53.
258. Brieu N, Guyon G, Rodiere M, Segondy M, Foulongne V. Human bocavirus infection in children with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27(11):969-73.
259. Garcia ML, Calvo C, Martin F, Perez-Brena P, Acosta B, Casas I. Human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain. *Arch Dis Child.* 2006; 12(2):35-9.
260. Cuevas LE, Nasser AM, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(12):1626-8.
261. 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(2):299-303.
262. 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(61):1407-10.
263. Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Roggendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3043-5.
264. O'Gorman C, McHenry E, Coyle PV. Human metapneumovirus in adults: a short case series. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;25(3):190-2.

265. 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(1):46-50.
266. 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(1):99-102.
267. Souza EL, Ramos JG, Proenca-Modena JL, Diniz A, Carvalho G, Ciuffo I, et al. Human bocavirus in very young infants hospitalized with acute respiratory infection in northeast Brazil. *J Trop Pediatr.* 2009;56(2):125-7.
268. Hindiyeh MY, Keller N, Mandelboim M, Ram D, Rubinov J, Regev L, et al. High rate of human bocavirus and adenovirus coinfection in hospitalized Israeli children. *J Clin Microbiol.* 2008;46(1):334-7.
269. Jacques J, Moret H, Renois F, Leveque N, Motte J, Andreoletti L. Human Bocavirus quantitative DNA detection in French children hospitalized for acute bronchiolitis. *J Clin Virol.* 2008;43(2):142-7.
270. Garcia ML, Calvo C, Pozo F, Perez-Brena P, Vazquez MC, Casas I. Detection of human bocavirus in ill and healthy Spanish children. A 2-year study. *Arch Dis Child.* 2008;18(4):42-6.
271. Wang W, Ren P, Sheng J, Mardy S, Yan H, Zhang J, et al. Simultaneous detection of respiratory viruses in children with acute respiratory infection using two different multiplex reverse transcription-PCR assays. *J Virol Methods.* 2009;162(1-2):40-5.
272. Stempel HE, Martin ET, Kuypers J, Englund JA, Zerr DM. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta Paediatr.* 2008;9(2):34-9.
273. Calvo C, Garcia-Garcia ML, Blanco C, Vazquez MC, Frias ME, Perez-Brena P, et al. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. *J Clin Virol.* 2008;42(3):268-72.
274. De Vos N, Vankeerberghen A, Vaeyens F, Van Vaerenbergh K, Boel A, De Beenhouwer H. Simultaneous detection of human bocavirus and adenovirus by multiplex real-time PCR in a Belgian paediatric population. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28(11):1305-10.
275. Sefers SE, Li H, Tang YW. Simultaneous detection and differentiation of respiratory syncytial virus and other respiratory viral pathogens. *Methods Mol Biol.* 2010;665:309-23.
276. Soderlund-Venermo M, Lahtinen A, Jartti T, Hedman L, Kempainen K, Lehtinen P, et al. Clinical assessment and improved diagnosis of bocavirus-induced wheezing in children, Finland. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(9):1423-30.

277. Lin JH, Chiu SC, Lin YC, Chen HL, Lin KH, Shan KH, et al. Clinical and genetic analysis of Human Bocavirus in children with lower respiratory tract infection in Taiwan. *J Clin Virol.* 2009;44(3):219-24.
278. Schildgen O, Muller A, Allander T, Mackay IM, Volz S, Kupfer B, et al. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(2):291-304.
279. Schildgen O. Human bocavirus: increasing evidence for virulence. *Pediatr Pulmonol.* 2010;45(2):118-9.
280. Tan BH, Lim EA, Seah SG, Loo LH, Tee NW, Lin RT, et al. The incidence of human bocavirus infection among children admitted to hospital in Singapore. *J Med Virol.* 2009;81(1):82-9.
281. Pierangeli A, Scagnolari C, Trombetti S, Grossi R, Battaglia M, Moretti C, et al. Human bocavirus infection in hospitalized children in Italy. *Influenza Other Respi Viruses.* 2008;2(5):175-9.
282. Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter GH, Hallam N, Templeton K, et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis.* 2006;194(9):1283-90.
283. Kupfer B, Vehreschild J, Cornely O, Kaiser R, Plum G, Viazov S, et al. Severe pneumonia and human bocavirus in adult. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(10):1614-6.
284. Laguna-Torres VA, Sanchez-Largaespada JF, Lorenzana I, Forshey B, Aguilar P, Jimenez M, et al. Influenza and other respiratory viruses in three Central American countries. *Influenza Other Respi Viruses.* 2011;5(2):123-34.
285. Reina J, Ferrer F, Mena A, Figuerola J, Alcoceba E. Clinical and epidemiological characteristics of respiratory infections caused by human metapneumovirus in pediatric patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26(2):72-6.
286. Pabbaraju K, Wong S, McMillan T, Lee BE, Fox JD. Diagnosis and epidemiological studies of human metapneumovirus using real-time PCR. *J Clin Virol.* 2007;40(3):186-92.
287. Rao BL, Gandhe SS, Pawar SD, Arankalle VA, Shah SC, Kinikar AA. First detection of human metapneumovirus in children with acute respiratory infection in India: a preliminary report. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5961-2.
288. Fodha I, Legrand L, Vabret A, Jrad T, Gueddiche N, Trabelsi AF, et al. Detection of human metapneumovirus in two Tunisian children. *Ann Trop Paediatr.* 2004;24(3):275-6.
289. Thanasugarn W, Samransamruajkit R, Vanapongtipagom P, Prapphal N, Van den Hoogen B, Osterhaus AD, et al. Human metapneumovirus infection in Thai children. *Scand J Infect Dis.* 2003;35(10):754-6.

290. Agrawal AS, Roy T, Ghosh S, Chawla-Sarkar M. Genetic variability of attachment (G) and Fusion (F) protein genes of human metapneumovirus strains circulating during 2006-2009 in Kolkata, Eastern India. *Virology*. 2011;8:67.
291. Ortíz Bultó I P, Pérez Rodríguez A, Rivero Valencia A, Pérez Carreras A, Cangas J, Lecha Estela L. La variabilidad y el cambio climático en Cuba: potenciales impactos en la salud humana *Rev CubSalud Pública* 2008;34 (1):13-8.
292. Catalano-Pons C, Bue M, Laude H, Cattan F, Moulin F, Menager C, et al. Human bocavirus infection in hospitalized children during winter. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(10):959-60.
293. Bastien N, Chui N, Robinson JL, Lee BE, Dust K, Hart L, et al. Detection of human bocavirus in Canadian children in a 1-year study. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):610-3.
294. PAHO-WHO. PAHO'S Director Newsletter PAHO-WHO. ISSUE 7. 2009 [updated 2009; cited 2011 March 23]; Available from: http://www.paho.org/English/D/D_DNewsLetters_eng.asp.
295. Troppan KT, Bozic M, Santner BI, Kessler HH. Evaluation of four molecular assays for detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in the routine diagnostic laboratory. *J Clin Virol*. 2010;49(2):82-4.
296. Boggild AK, McGeer AJ. Laboratory diagnosis of 2009 H1N1 influenza A virus. *Crit Care Med*. 2010;38(4 Suppl):e38-42.
297. WER. Global influenza surveillance network: laboratory surveillance and response to pandemic H1N1 2009. *Wkly Epidemiol Rec*. 2009;84(36):361-5.
298. Tenorio-Abreu A, Eiros JM, Rodriguez E, Bernejo JF, Dominguez-Gil M, Vega T, et al. Influenza surveillance by molecular methods. *Rev Esp Quimioter*. 2009;22(4):214-20.
299. Vernet G. Use of molecular assays for the diagnosis of influenza. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5(1):89-104.
300. Zaraket H, Saito R, Sato I, Suzuki Y, Li D, Dapat C, et al. Molecular evolution of human influenza A viruses in a local area during eight influenza epidemics from 2000 to 2007. *Arch Virol*. 2009;154(2):285-95.
301. Rambaut A, Holmes E. The early molecular epidemiology of the swine-origin A/H1N1 human influenza pandemic. *PLoS Curr*. 2009;1:10-3.
302. Ding N, Wu N, Xu Q, Chen K, Zhang C. Molecular evolution of novel swine-origin A/H1N1 influenza viruses among and before human. *Virus Genes*. 2009;39(3):293-300.
303. Wang B, Dwyer DE, Blyth CC, Soedjono M, Shi H, Kesson A, et al. Detection of the rapid emergence of the H275Y mutation associated with oseltamivir resistance in severe pandemic influenza virus A/H1N1 09 infections. *Antiviral Res*. 2010;87(1):16-21.

304. Anton A, Marcos MA, Martinez MJ, Ramon S, Martinez A, Cardenosa N, 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(2):207-8.
305. Lipsitch M, Lajous M, O'Hagan JJ, Cohen T, Miller JC, Goldstein E, et al. Use of cumulative incidence of novel influenza A/H1N1 in foreign travelers to estimate lower bounds on cumulative incidence in Mexico. *PLoS One*. 2009;4(9):6895.
306. Duncan AR, Priest PC, Jennings LC, Brunton CR, Baker MG. Screening for influenza infection in international airline travelers. *Am J Public Health*. 2009;99 Suppl 2:S360-2.
307. Reed G. Faceoff: Cuba vs. H1N1 influenza. *MEDICC Rev*. 2010;12(1):6-12.
308. Monto AS. The risk of seasonal and pandemic influenza: prospects for control. *Clin Infect Dis*. 2009;48 Suppl 1:S20-5.
309. Kilbourne E. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(1):9-14.
310. WHO. FluNetGlobal Data(week 17-34). World Health Organization. 2009 [updated 2009; cited 2011 April 2]; Available from: http://www.who.int/csr/don/Virologicaldata2009_08_21.pdf .
311. Mathews JD, Chesson JM, McCaw JM, McVernon J. Understanding influenza transmission, immunity and pandemic threats. *Influenza Other Respi Viruses*. 2009;3(4):143-9.
312. Grebe KM, Yewdell JW, Bennink JR. Heterosubtypic immunity to influenza A virus: where do we stand? *Microbes Infect*. 2008;10(9):1024-9.
313. McCaw JM, McVernon J, McBryde ES, Mathews JD. Influenza: accounting for prior immunity. *Science*. 2009;325(59):1071-3.
314. Tu W, Mao H, Zheng J, Liu Y, Chiu SS, Qin G, et al. Cytotoxic T lymphocytes established by seasonal human influenza cross-react against 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *J Virol*. 2010;84(13):6527-35.
315. Boon AC, deBeauchamp J, Krauss S, Rubrum A, Webb AD, Webster RG, et al. Cross-reactive neutralizing antibodies directed against pandemic H1N1 2009 virus are protective in a highly sensitive DBA/2 mouse influenza model. *J Virol*. 2010;84(15):7662-7.
316. WHO. World Health Organization. Director-General's opening statement at virtual press conference 10 August 2010. . 2010 [updated 2010; cited 2011 March 26]; Available from: http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/index.html

317. Borse RH, Behravesch CB, Dumanovsky T, Zucker JR, Swerdlow D, Edelson P, et al. Closing schools in response to the 2009 pandemic influenza A H1N1 virus in New York City: economic impact on households. *Clin Infect Dis*. 2011;52 Suppl 1:S168-72.
318. Yang P, Deng Y, Pang X, Shi W, Li X, Tian L, et al. Severe, critical and fatal cases of 2009 H1N1 influenza in China. *J Infect*. 2010;61(4):277-83.
319. Cervantes-Gonzalez M, Launay O. Pandemic influenza A (H1N1) in pregnant women: impact of early diagnosis and antiviral treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010;8(9):981-4.
320. Girard MP, Tam JS, Assossou OM, Kieny MP. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine*. 2010;28(31):4895-902.
321. D'Ortenzio E, Renault P, Jaffar-Bandjee MC, Gauzere BA, Lagrange-Xelot M, Fouillet A, et al. A review of the dynamics and severity of the pandemic A(H1N1) influenza virus on Reunion island, 2009. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(4):309-16.
322. Keramarou M, Cottrell S, Evans MR, Moore C, Stiff RE, Elliott C, et al. Two waves of pandemic influenza A(H1N1) 2009 in Wales—the possible impact of media coverage on consultation rates, April-December 2009. *Euro Surveill*. 2011;16(3):12-6.
323. Campbell CN, Mytton OT, McLean EM, Rutter PD, Pebody RG, Sachedina N, et al. Hospitalization in two waves of pandemic influenza A(H1N1) in England. *Epidemiol Infect*. 2010;26:1-10.
324. Barboza P, Baudon C, Cherie-Challine L, Gastellu-Etchegorry M, Gueguen J, La Ruche G, et al. Influenza A(H1N1)2009 in the French Pacific territories: assessment of the epidemic wave during the austral winter. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(4):304-8.
325. Bandaranayake D, Jacobs M, Baker M, Hunt D, Wood T, Bissielo A, et al. The second wave of 2009 pandemic influenza A(H1N1) in New Zealand, January-October 2010. *Euro Surveill*. 2010;16(6):15-9.
326. Zhu FC, Wang H, Fang HH, Yang JG, Lin XJ, Liang XF, et al. A novel influenza A (H1N1) vaccine in various age groups. *N Engl J Med*. 2009;361(25):2414-23.
327. Vajo Z, Tamas F, Sinka L, Jankovics I. Safety and immunogenicity of a 2009 pandemic influenza A H1N1 vaccine when administered alone or simultaneously with the seasonal influenza vaccine for the 2009-10 influenza season: a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*. 2009;375(9708):49-55.
328. Medlock J, Galvani AP. Optimizing influenza vaccine distribution. *Science*. 2009;325(5948):1705-8.
329. Chuang YY, Chiu CH, Wong KS, Huang JG, Huang YC, Chang LY, et al. Severe adenovirus infection in children. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003;36(1):37-40.

330. Kuypers J, Wright N, Corey L, Morrow R. Detection and quantification of human metapneumovirus in pediatric specimens by real-time RT-PCR. *J Clin Virol.* 2005;33(4):299-305.
331. McIntosh K. Human bocavirus: developing evidence for pathogenicity. *J Infect Dis.* 2006;194(9):1197-9.
332. Babakir-Mina M, Dimonte S, Perno CF, Ciotti M. Origin of the 2009 Mexico influenza virus: a comparative phylogenetic analysis of the principal external antigens and matrix protein. *Arch Virol.* 2009;154(8):1349-52.
333. Faruqi F, Mukundan D. 2009 pandemic influenza: a review. *Curr Opin Pediatr.* 2010;22(4):530-5.
334. Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, Wadford DA, Pappas C, Zeng H, et al. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science.* 2009;325(5939):484-7.

ANEXOS

Anexo 1

➤ **Publicaciones científicas donde han sido presentados los resultados de la tesis.**

- Valdés O, **Acosta B**, Piñón A, Savón C, Goyenechea A, Gonzalez G, y cols. First Report on Fatal Myocarditis Associated With Adenovirus Infection in Cuba J Med Virol 2008;80:1756–1761
- Savón C, **Acosta B**, Valdés O, Goyenechea A, González G, Piñón A, y cols. A myocarditis outbreak with fatal cases associated with adenovirus subgenera C among children from Havana City in 2005. J Clin Virol 2008;43(2):152-157
- **Acosta B**, Piñón A, Valdés O, Savón C, Goyenechea A, Gonzalez G, y cols. Fortalecimiento del diagnóstico molecular para la vigilancia de virus respiratorios en Cuba. Rev Biom 2008;19(3):146-154
- **Acosta B**, Valdés O, Piñón A, Savón C, Goyenechea A, Gonzalez G, y cols. Molecular Characterization of Adenoviral Infections in Cuba. Report of an unusual association of species D Adenoviruses with different clinical syndromes. Arch Virol (2009) 154:619–627.
- **Acosta B** y Llop A. Influenza pandémica en Cuba. Rev Cub Med Trop 2010; 62(3):165-166
- **Acosta B**, Piñón A, Valdés O, Savón C, Guzmán MG, Llop A, y cols. Contribución del Laboratorio Nacional de Influenza al enfrentamiento de la influenza pandémica 2009 en Cuba. Rev Cub Med Trop 2011;63(1):7-14
- **Acosta B**, Piñón A, Valdés O, Savón C, Arencibía A, Guilarte E, y cols. Rapid diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 in Cuba. Emerg Infect Dis Volume 18, Number 2–February 2012 [Disponible on line] <http://dx.doi.org/10.3201/eid1802.110547>□

➤ **SUPLEMENTOS**

- **Acosta B**, Casas I, Pérez –Breña P, Savón C, Goyenechea A, Piñón A, Oropesa S. Human Metapneumovirus in Cuban children. First report. J Clin Microbiol Infect 2006, Vol 12 suplement 4
- **Acosta B**, Valdés O, Savón C, Goyenechea A, Piñón A, Palerm L, Gonzalez G, Guzmán MG, Llop A. Unusual Adenovirus outbreak with different clinical presentation among Cuban children. C. Savón; International J Infect Dis June 2006, vol 10 Supplement .
- Valdés O, **Acosta B**, Savón C, Piñón A, Goyenechea A, Palerm L, Gonzalez G, Guzmán MG, Llop A. Fatal cases of myocarditis Among Cuban Children . Evidence of Adenovirus as etiological agent. International J Infect Dis June 2006, vol 10 Supplement.

- **Acosta B**, Valdés O, Lago PM, Goyenechea A, Savón C, Piñón A, Gonzalez G. Isolation of Adenovirus during an unusual outbreak of acute febrile syndrome in Cuba. International J Infect Dis. June 2006, vol 10 Supplement.
- **Acosta B**, Savón C, Casas I, Pérez-Breña P, Piñón A, Valdés O. Molecular Diagnosis of Acute respiratory tract infection in Cuba. First Report of Human Metapneumovirus. International J Infect Dis. June 2006, vol 10 Supplement .
- **Eventos científicos donde han sido presentados los resultados de la tesis.**
 - 16th European Congress of Infectious disease and Clinical Microbiology April 2006 Nice, France
 - Human Metapneumovirus In cuban Children. First report. **Belsy Acosta**, Inmaculada Casas, Pilar Pérez–Breña, Clara Savón, Angel Goyenechea , Alexander Piñón, Suset Oropesa.
 - 12th International Congress of infectious disease June 2006 Lisboa Portugal
 - Unusual outbreak with different clinical presentation caused by Adenovirus among Cuban Children. C. Savón; **B. Acosta**; O. Valdés; A. Goyenechea; A. Piñón; L. Palerm; P. Más; y cols.
 - Fatal Cases of Myocarditis Among Cuban Children. Evidence of Adenovirus as Etiological Agent. O. Valdés, **B. Acosta**, C. Savón, A. Piñón, A. Goyenechea, L. Palerm, y cols.
 - Isolation of Adenovirus during an unusual outbreak of acute febrile syndrome in Cuba. **B. Acosta** , O Valdés, PM Lago, A Goyenechea C Savón, A Piñón, y cols.
 - Molecular Diagnosis of acute respiratory tract infection in Cuba . First report of Human Metapneumovirus. **B. Acosta**, C savón , I Casas , MP Pérez , A Pinón , O Valdés, A Goyenechea .
 - VI Jornada Internacional de Infectología pediátrica. 20 -23 de Septiembre 2006 Hotel Melia Habana Cuba.
 - Miocarditis y casos fatales en niños. Adenovirus como agente etiológico. O. Valdés, **B. Acosta** , C. Savón, A. Piñón, A. Goyenechea, L. Palerm, G. González Báez, V. Kourí, P.A. Martínez, L.R. Sarmiento, D. Rosario, V. Capó, M.G. Guzmán
 - Metapneumovirus humano en niños cubanos con infección respiratoria aguda. Características clínicas y epidemiológicas. **B Acosta**, C Savón, O Valdés, A Piñón, A Goyenechea, J Echevarria Valdés, y cols.
 - Síndrome febril agudo idiopático y adenovirus en niños. Ciudad de la Habana. 2005. C. Savón; **B. Acosta**; O. Valdés; A. Goyenechea; A. Piñón; L. Palerm; P. Más; y cols.
 - Congreso 70 Aniversario del IPK, VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, IV Congreso Nacional de Medicina Tropical.

- Conferencia: Fortalecimiento de la vigilancia de virus respiratorios en Cuba. **B Acosta**
- Conferencia: Virus Respiratorios Emergentes. **B Acosta**
- Simposio Internacional de Lecciones Aprendidas en el enfrentamiento de la Pandemia de Influenza A (H1N1) pandémica, Beijing del 21 al 25 de agosto auspiciado por Ministerio de Salud de China, OMS y Lancet.
- Presentación oral: Vigilancia de laboratorio de los virus influenza en Cuba. **B Acosta**
- 5to Encuentro Latinoamericano de Distribuidores de Qiagen. Hotel Meliá Cohíba, Cuba, 2 de Febrero 2010.
- Experiencias del enfrentamiento en Cuba a la pandemia influenza A H1N1 del 2009. Alexander Piñón, **B Acosta**, O Valdés, A Arencibia, S Oropesa, C Savón, A Goyenechea y cols.
- Contribución de las herramientas moleculares a la vigilancia de la Influenza en Cuba 2009. O Valdés, A Piñón, **B Acosta**, C Savón, E Guilarte, G Gonzalez, y cols.
- Simposio Internacional sobre Ventilación Mecánica. Centro de Convenciones, Santa Clara, Villa Clara 21 al 24 de abril 2010.
- Presentación en Mesa Redonda: Panorama clínico, epidemiológico y de laboratorio de la Influenza A (H1N1) pandémica en Cuba. **B Acosta**
- VIII Congreso Internacional de Desastres. Palacio de las Convenciones, Ciudad de la Habana, 16 de junio del 2010.
- Presentación en Mesa Redonda: Experiencias en la prevención y control de la pandemia de influenza A (H1N1) en Cuba. **B Acosta**
- VII Jornada Internacional de Infectología pediátrica. 16 al 19 de Noviembre 2011 Hotel Occidental Miramar, La Habana, Cuba.
- Presentación oral: Virus respiratorios emergentes. **B Acosta**
- Poster: Diagnóstico etiológico viral de infecciones respiratorias en niños cubanos menores de 5 años de edad. **B Acosta**, O Valdés, A Piñón, C Savón, G González, A Arencibia y cols.
- **Reconocimientos a los resultados presentados en la tesis:**
- Resultado Relevante Institucional (octubre 2008).
- Primer reporte en Cuba de Adenovirus asociados a Miocarditis fatales dentro del Síndrome Agudo Idiopático (SFAI). C Savón, **B Acosta**, O Valdés, G Gonzalez, , A Piñón , A Goyenechea y cols.
- Concurso Central del Premio Anual de Salud, 2009. Mención en la categoría de artículo científico.

- First Report on Fatal Myocarditis Associated With Adenovirus Infection in Cuba. O Valdés, **B Acosta**, A Piñón, C Savón, A Goyenechea, G Gonzalez, G Gonzalez-Baez y cols. J Med Virol 2008;80:1756–1761.
- Logros de la Academia de Ciencias de Cuba (febrero 2010).
- Etiología Viral de la infección respiratoria aguda baja en niños menores de un año. Estudio Integral. C Savón, O Valdés, G Gonzalez, **B Acosta**, A Piñón, A Goyenechea y cols.
- Logros de una estrategia emergente de laboratorio para el enfrentamiento de la influenza pandémica 2009 en Cuba. **B Acosta**, A Piñón, O Valdés, C Savón, MG Guzmán, A Llop y cols.
- Reconocimiento por resultados científicos relevantes de la Comisión de Mujeres Científicas de la Academia de Ciencias de Cuba. **B Acosta**, O Valdés, C Savón, MG Guzmán, A Llop, A Arencibia y cols.
- Resultados relevantes en XVII Forum Provincial de Ciencia y técnica (septiembre 2010)
- Etiología Viral de la infección respiratoria aguda baja en niños menores de un año. C Valdés, O Valdés, G Gonzalez, **B Acosta**, Alexander Piñón, Angel Goyenechea, Guelsys Gonzalez Amely Arencibia.
- Logros de una estrategia emergente de laboratorio para el enfrentamiento de la influenza pandémica 2009 en Cuba. **B Acosta**, A Piñón, O Valdés, C Savón, MG Guzmán, A Llop, A Arencibia, y cols.
- Concurso Central del Premio Anual de Salud, 2012. Premio en la categoría de Investigaciones de Sistemas y servicios de Salud (junio 2012).
- Logros de la estrategia de laboratorio para la vigilancia de la influenza pandémica 2009 en Cuba. **B Acosta**, A Piñón, O Valdés, C Savón, MG Guzmán, A Llop y cols.

➤ **Trabajos de Tesis**

- Tesis de Diploma de Técnico en Farmacia Industrial. Instituto Politécnico de Química Industrial "Mártires de Girón". "Detección de Metapneumovirus humano en pacientes con Infección respiratoria aguda en Cuba en el período comprendido entre el 2003-2005" 2006. Autor: Janet Echevarría Valdés. Tutor: Belsy Acosta Herrera.
- Tesis de Diploma de Licenciatura en Microbiología de la Universidad de la Habana: "Diagnóstico molecular aplicado a los virus influenza como parte del enfrentamiento del Laboratorio Nacional ante una pandemia" 2006. Autor: Juan Pablo Rodas Cruz. Tutor: Dra Belsy Acosta, Dra Suset Oropesa.

- Tesis de Diploma de Licenciatura en Microbiología de la Universidad de la Habana: “Optimización de un sistema de RT-PCR anidada múltiple para el diagnóstico de virus causantes de cuadros de Infección Respiratoria Aguda Severa” 2007. Autor: Amely Arencibía García. Tutor: Dra Belsy Acosta, Lic Alexander Piñón.
- Tesis de Especialista de primer grado en Microbiología del Instituto “Pedro Kouri” : “Estrategia inicial de vigilancia de laboratorio de la influenza pandémica A (H1N1) 2009. Características clínicas, epidemiológicas y virológicas de su circulación en Cuba” 2010. Autor: Dr Elías Guilarte García. Tutor: Dra Belsy Acosta, Dra Clara Savón.
- Tesis de Maestría en Virología del Instituto “Pedro Kouri”: “Estudio de la circulación de la influenza pandémica A (H1N1) y otros virus respiratorios en la provincia las Tunas” 2011. Autor: Lic. Yoanny Peña González. Tutor: Dra Belsy Acosta, Dra Clara Savón.

Anexo 2

Características de los cebadores empleados en la reacción de TR-RCP anidada múltiple para la detección de influenza A, B, C, AdvH y VSRH A y B.

Especificidad del cebador	Nombre y secuencia del cebador 5'-3'	Gen Diana	Posición
Reacción TR-RCP			
Influenza A y C	INF AB1-Positivo GAACTCRTYCYWWATSWCAAWGRRGAAAT	NP	(A) 319–347 (C) 346–374
Influenza B	INF B1-Positivo ACAGAGATAAAGAAGAGCGTCTACAA	NP	217–242
Influenza A, B y C	INFABC1-Negativo ATKGCWCWYRAYAMWCTYARRTCTTCAWAIG C	NP	(A)1040–1009 (B) 1208–1177 (C) 1084–1053
VSRH A y B	VSRAB-Positivo ATGGAGYTGCRYRATCCWCARRRCAARTGCAAT	F	1-37
VSRH A y B	VSRAB-Negativo AGGTGTWGTACACCTGCATTRACACTRAATT C	F	737–705
AdvH	ADV1-Positivo CAACACCTAYGASTACATGAA	Hexon	20380- 20400
AdvH	ADV1-Negativo KATGGGGTARAGCATGTT	Hexon	20854- 20836
CI	CI1-Positivo GCTTGGGCGTGTCTCAAAATCT	Control ^a	9-30
CI	CI1-Negativo GTCGCCACGGTTGATGAGAGCT	Control ^a	1137-1116
RCP anidada			
Influenza A y B	INF AB2-Positivo GATCAAGTGAKMRRRAGYMGRAAYCCAGG	NP	(A) 718–746 (B) 892–920
Influenza C	INF C2-Positivo AAATTGGAATTTGTTCCTTTCAAGGGACA	NP	952–980
Influenza A y C	INF AC2-Negativo TCTTCAWATGCARSWSMAWKGCATGCCATC	NP	(A) 1019–990 (C) 1063–1034
Influenza B	INF B2-Negativo CTTAATATGGAAACAGGTGTTGCCATATT	NP	1018-1090
VSRH A	VSR A2-Positivo TTATACTCAACAATRCCAAAAAWACC	F	347-374
VSRH A	VSR A2-Negativo AAATCCCTGGTAATCTCTAGTAGTCTGT	F	710-682
VSRH B	VSR B2-Positivo ATCTTCCTAACTCTTGCTRTTAATGCATTG	F	30-59
VSRH B	VSR B2-Negativo GATGCGACAGCTCTGTTGATTTACTATG	F	641-614
AdvH	ADV2-Positivo CCCITYAACCACCACCG	Hexon	20485 a 20503
AdvH	ADV2-Negativo ACATCCTTBCKGAAGTTCCA	Hexon	20652 a 20632
CI	CI2-Positivo GGGGTGTATGAGCCATATTCAACGG	Control ^a	108-133
CI	CI2-Negativo AGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAG	Control ^a	995–974

^a Fragmento del clonaje del vector pCM132 obtenido del control de ARN suministrado en el estuche RT-PCR, Access (Promega)

Fuente: Coiras y cols., 2003

Anexo 3

Características de los cebadores empleados en la reacción de TR-RCP múltiple anidada para la detección de VPI tipo 1-4, CoVH OC-43, CoVH 229 E, RV y EV.

Especificidad del cebador	Nombre y Secuencia del cebador 5'-3'	Gen Diana	Posición
Reacción TR-RCP			
VPI 1 y VPI 3	PIV131-Positivo AGGWTGYSMRGATATAGGRAARTCATA	HA	(VPI 1) 641-667 (VPI 3) 635-661
VPI 1 y VPI 3	PIV131-Negativo CTWGTATATATRTAGATCTTKTTRCCTAGT	HA	(VPI1) 1277-1248 (VPI 3) 1270-1241
VPI 2	PIV41-Positivo TAATTCCTCTTAAAAATTGACAGTATCGA	HA	(VPI 2) 259-286
VPI 2 y VPI 4	PIV241-Negativo TRAGRCCMCCATAYAMRGGAAATA	HA	(VPI 2) 942-919 (VPI 4) 963-940
VPI 4	PIV41-Negativo ATCCAGARRGACGTCACATCAACTCAT	5'NCR- HA	(VPI 4) 107-81 ^a
CoVH 229E y CoVH OC43	COV1-Positivo TGTGCCATAGARGAYWTACTTTTT	SP	(CoVH 229E) 2068- 2090 (CoV OC43) 2727- 2750
CoVH 229E y CoVH OC43	COV1-Negativo AACCGCTTKYACCAKCAAYGCACA	SP	(CoV229E) 2919- 2896 (CoVH OC43) 3533- 3511
EV y RV	EVRV1-Positivo CTCCGGCCCCTGAATRYGGCTAA	5'NCR- VP4/VP2	(EV) 445-467 ^b
EV y RV	EVRV1-Negativo TCIGGIARYTTCCASYACCAICC	5'NCR- VP4/VP2	(RV) 1200-1178
CI	CI1-Positivo GCTTGGGCGTGTCTCAAAATCT	Control ^c	9-30
CI	CI1-Negativo GTCGCCACGGTTGATGAGAGCT	Control ^c	1137-1116
RCP anidada			
VPI 1 y VPI 3	PIV132-Positivo ACGACAAYAGGAARTCATGYTCT	HA	(VPI 1) 754-776 (VPI 3) 748-770
VPI 1	PIV12-Negativo GACAACAATCTTTGGCCTATCAGATA	HA	(VPI 1)1193-1168
VPI 3	PIV32-Negativo GAGTTGACCATCCTYCTRTCTGAAAAC	HA	(VPI 3)1138-1112
VPI 2 y VPI 4	PIV242-Positivo CYMAYGGRTGYAYTMGAATWCCATCATT	HA	(VPI 2) 487-514 (VPI 4) 509-536
V PI2	PIV22-Negativo GCTAGATCAGTTGTGGCATAATCT	HA	(VPI 2) 784-761
VPI 4	PIV42-Negativo TGA CTATRCTCGACYTTRAAATAAAGG	HA	(VPI 4) 383-358
CoVH 229E y CoVH OC43	COV2-Positivo TTGTGCGCAATGTTATAAWGGYAT	SP	(CoV229E) 2174- 2197 (CoVH OC43) 2831- 2854
CoVH 229E y CoVH OC43	COV2-Negativo GATAARTGAGTRCCATTWCCACA	SP	(CoVH 229E) 2804- 2781 (CoVH OC43) 3696- 3418

EV y RV	EVRV2-Positivo ACCRASACTTTGGGTRWCCGTG	5'NCR- VP4/VP2	(EV y RV) . 536–559 ^b
EV y RV	EVRV2-Negativo CTGTGTTGAWACYTGAGCICCCA	5'NCR- VP4/VP2	(RV) 762–743
CI	CI2-Positivo GGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGG	Control ^c	108-133
CI	CI2-Negativo AGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAG	Control ^c	995–974

Leyenda: ^a Cebador localizado por delante de la región que codifica para el gen de la hemaglutinina.

^b Posición del gen con relación a la cepa Sabin de Poliovirus 1 (No Acceso en GenBank: V01150. Nota: Todos los rinovirus tienen una delección de aproximadamente 116 pb en relación con los enterovirus.

^c Fragmento del clonaje del vector pCM132 obtenido del control de ARN suministrado en el estuche RT-RCP, Promega Access

Fuente: Coiras y cols., 2004

Anexo 4

Características de los cebadores empleados en la reacción de TR-RCP múltiple anidada para la detección de VSRH A, VSRH B, BoVH y MPVH.

Especificidad del cebador	Nombre y Secuencia del cebador 5'-3'	Gen Diana	Longitud del segmento amplificado (pb)
Reacción TR-RCP			
VSRH A y B	VSR AB1-Positivo ATGGAGYTGCRYATCCWCARRRCAARTGCAAT	F	737
VSRH A y B	VSR AB1-Negativo AGGTGTWGTACACCTGCATTRACACTRAATTC	F	737
MPVH	MPVH1-Positivo GAG TCC TAY CTA GTA GAC AC	M	876
MPVH	MPVH1-Negativo TTG TYC CTT GRT GRC TCC A	M	867
BoVH	BoVH1-Positivo CAC AGG AGC MGG AGY CGC AG	NP-1 VP1/VP2	528
BoVH	BoVH1-Negativo CCA AGA TAT YTR TAT CCA GG	NP-1 VP1/VP2	528
CI	CI1-Positivo GCTTGGGCGTGTCTCAAAATCT	Control	1128
CI	CI1-Negativo GTCGCCACGGTTGATGAGAGCT	Control	1128
RCP anidada			
VSRH A	VSR A2-Positivo TTATACACTCAACAATRCCAAAAAWACC	F	
VSRH A	VSR A2-Negativo AAATCCCTGGTAATCTCTAGTAGTCTGT	F	363
VSRH B	VSR B2-Positivo ATCTTCCTAACTCTTGCTRTTAATGCATTG	F	
VSRH B	VSR B2-Negativo GATGCGACAGCTCTGTTGATTTACTATG	F	611
MPVH	MPVH2-Positivo GCR GCI ATG TCT GTA CTT CC	M	
MPVH	MPVH2-Negativo TCT TGC AKA TYY TRC TKA TGC T ^{a)}	M	486
BoVH	BoVH2-Positivo GTG GTG TGG GTT CTA CTG GC	NP-1 VP1/VP2	
BoVH	BoVH2-Negativo CTA CGG TAC ACA TCA TCC CAG	NP-1 VP1/VP2	243
CI	CI2-Positivo GGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGG	Control	
CI	CI2-Negativo AGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAG	Control	887

^{a)} Cebador diseñado en este estudio.

Fuente: (Coiras y cols., 2003; López-Huerta y cols., 2005; Pozo y cols., 2007)

Anexo 5

Modelo de recolección de datos sobre muestras para diagnóstico microbiológico o envío de cepas para el trabajo de referencia nacional en el IPK.

1-Nombre(es)		Primer Apellido:		Segundo Apellido:		2-Carné de Identidad:		No.	
3- Dirección Particular:				4-Municipio:		5-Provincia:		6-Hist. Clínica:	
7-Edad:	8-Sexo: Masc. <input type="checkbox"/> Fem. <input type="checkbox"/>		9-Ocupación		10-Color de la piel: Blanca <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Amarilla <input type="checkbox"/> Mestiza <input type="checkbox"/>			11-Días de ingreso	
12-Centro que Remite:			13-Sala	14-Municipio:		15-Provincia:		16-Fecha: _____ _____ _____ _____ _____ _____ Día Mes Año	
17-Diagnóstico Clínico: _____					18-Tipo de Muestra colectada:			19-APP:	
20-Fecha de comienzo de los Síntomas: ____ ____ ____ ____ ____ ____ Día Mes Año					Suero <input type="checkbox"/> Sangre <input type="checkbox"/>			Enfermedad similar en la familia o comunidad:	
21-GENERALES: Fiebre <input type="checkbox"/> Mialgia <input type="checkbox"/> Cefalea <input type="checkbox"/> Linfadenopatía <input type="checkbox"/> Malestar General <input type="checkbox"/> Vómitos <input type="checkbox"/> Rash <input type="checkbox"/> Petequias <input type="checkbox"/> Diarreas <input type="checkbox"/> Artralgia <input type="checkbox"/> Esplenomegalia <input type="checkbox"/> Anorexia <input type="checkbox"/> Ictero <input type="checkbox"/> Hepatomegalia <input type="checkbox"/> Astenia <input type="checkbox"/> Escalofríos <input type="checkbox"/> Sangramiento <input type="checkbox"/> Dolor abdominal <input type="checkbox"/> Aumento de volumen de parótida <input type="checkbox"/> <u>IRA:</u> Tos <input type="checkbox"/> Disnea <input type="checkbox"/> Expectorcación <input type="checkbox"/> Laringitis <input type="checkbox"/> Faringitis <input type="checkbox"/> Rinorrea <input type="checkbox"/> Otitis <input type="checkbox"/> Coqueluche <input type="checkbox"/> Amigdalitis <input type="checkbox"/> Laringotraqueobronquitis <input type="checkbox"/> Estornudos <input type="checkbox"/> Vacunación anti-Influenza <input type="checkbox"/> <u>SNC:</u> Desorientación <input type="checkbox"/> Rigidez nucal <input type="checkbox"/> Convulsiones <input type="checkbox"/> Perdida de conciencia <input type="checkbox"/> Trastornos de conducta <input type="checkbox"/> Dificultad en la marcha <input type="checkbox"/> <u>ITS:</u> Secreción Genital <input type="checkbox"/> Lesión Genital <input type="checkbox"/> <u>SEPSIS URINARIA:</u> Disuria <input type="checkbox"/> Otros: _____					LCR <input type="checkbox"/> Humor acuoso <input type="checkbox"/>			SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	
					Orina <input type="checkbox"/> Líquido amniótico <input type="checkbox"/>			Historia de viajes al exterior: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> País: _____	
					Gargarismo <input type="checkbox"/> Esputo <input type="checkbox"/>			Fecha llegada al país: _____ _____ _____ _____ _____ _____ Día Mes Año	
					Heces <input type="checkbox"/>			Tratamiento Previo: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Cuál(es): _____	
					Exudado <input type="checkbox"/> Cual _____			Antecedente de vacunación PRS	
					Tejido <input type="checkbox"/> Cual _____			SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	
					**Lámina de: _____			Fecha : _____ _____ _____ _____ _____ _____ Día Mes Año	
					Cepa de: _____				
					Fecha colecta muestra: _____ _____ _____ _____ _____ _____ Día Mes Año				
					22-Estudio solicitado: Diagnóstico <input type="checkbox"/>				
					Referencia <input type="checkbox"/>				
					23-SUEROS PAREADOS				
					Fecha de colecta:				
					1 ^{er} Suero ____ ____ ____ ____ ____ ____ Día Mes Año				
					2 ^{do} Suero ____ ____ ____ ____ ____ ____ Día Mes Año				
					Confirmatorio <input type="checkbox"/> (Dengue)				
					Referencia <input type="checkbox"/>				
24- Nombre del Facultativo:									
25- RESULTADOS									

*Para el envío de cepas solo se requieren los datos correspondientes a los acápite: 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 22, 24, 25.

Anexo 6

Cebadores y sondas empleados en el ensayo de TR-RCP en tiempo real para la detección del virus influenza A (H1N1)pdm09.

Nombre de cebadores y sondas	Proteína diana	Secuencia (5-3) de cebadores y sondas	Concentración
Influenza A Universal Positivo	M	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C	40µM
Influenza A Universal Negativo	M	AGG GCA TTY TGG ACA AAKA CGT CTA	40µM
Influenza A Universal Sonda		FAM-TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG-BHQ1	10µM
Influenza A Universal porcina Positivo	HA	GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG	40µM
Influenza A Universal porcina Negativo	HA	GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC	40µM
Influenza A Universal porcina Sonda		FAM-CYA CTG CAA GCC CAT ACA CAC AAG CAG GCA-BHQ1	10µM
Influenza A porcina (H1) 2009 Positivo	HA	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA	40µM
Influenza A porcina (H1) 2009 Negativo	HA	CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RCG	40µM
Influenza A porcina 2009 (H1) Sonda		FAM-CA GAA TAT ACA T CC RGT CAC AAT TGG ARA A-BHQ1	10µM
Rnasa P Positivo	Rnasa P	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	40µM
Rnasa P Negativo	Rnasa P	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	40µM
Rnasa P Sonda		FAM-TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG-BHQ1	10µM

Fuente: WHO, 2009.

Anexo 7

Evaluación de la TR-RCP anidada múltiple para la detección de MPVH en muestras clínicas de niños ≤ 5 años de edad.

		Prueba diagnóstica de Referencia (TR-RCP semi-anidada original)		Total
		Muestra Positiva	Muestra Negativa	
Prueba diagnóstica a evaluar	Muestra positiva	8	1	9
	Muestra negativa	0	134	134
Total		8	135	143

Evaluación de la TR-RCP anidada múltiple para la detección de VSRH en muestras clínicas de niños con ≤ 5 años de edad.

		Prueba diagnóstica de Referencia (TR-RCP anidada original)		Total
		Muestra Positiva	Muestra Negativa	
Prueba diagnóstica a evaluar	Muestra positiva	29	1	30
	Muestra negativa	0	113	113
Total		29	114	143

Evaluación de la TR-RCP anidada múltiple para la detección de BoVH en muestras clínicas de niños con ≤ 5 años de edad.

		Prueba diagnóstica de Referencia (RCP anidada original)		Total
		Muestra Positiva	Muestra Negativa	
Prueba diagnóstica a evaluar	Muestra positiva	6	0	6
	Muestra negativa	0	137	137
Total		6	137	143

Anexo 8

“Indicaciones del Laboratorio Nacional de Referencia del IPK para la colecta de muestras clínicas para el diagnóstico virológico y vigilancia de la influenza porcina A (H1N1)”

Se colectará la muestra clínica respiratoria para los casos que cumplan el criterio de caso sospechoso establecida por nuestro Ministerio de Salud:

Las muestras se acompañarán del documento de envío de muestra establecido en el sistema nacional de envío de muestras que se encuentra disponible en todos los Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología.

La colecta de muestras deberá realizarse por personal capacitado en toma, colecta y transporte de muestra y siguiendo las medidas de bioseguridad requeridas.

- Muestra de Exudado nasofaríngeo (tomado entre el 1 y 7 días del inicio de los síntomas).

Los medios para la toma y colecta de esta muestra serán suministrados a todas las provincias por el LNR de influenza del IPK.

Para la toma de la muestra se tomará un hisopo para **ambas fosas nasales** que será previamente humedecido en el medio virológico y se raspará durante aproximadamente 1 minuto en la pared del tabique en su extremo superior y la mucosa del comete superior. Al terminar se introduce en el medio de transporte virológico. El otro hisopo se empleará para el exudado faríngeo raspando fuertemente en la pared posterior de la faringe durante aproximadamente 30 segundo y se introduce en el medio de transporte donde ya está previamente introducido el hisopo que se empleó para el exudado nasal del mismo paciente. La muestra se conservará a 4°C hasta su envío al LNR.

Deberá notificarse al LNR del IPK al teléfono 2020651 (Odalys, Carlos, Anisleidy) el envío de las muestras una vez que han sido debidamente colectadas. El envío deberá realizarse en las primeras 24 horas de colecta de la muestra.

- Muestras de necropsia (pulmón): se colectará un fragmento de tejido de pulmón de aproximadamente 2 cm² y se depositará en 5 mL de solución salina fisiológica estéril en un frasco estéril o en medio de transporte universal para virus (UTM). Las muestras se conservarán a 4°C hasta su envío al LNR del IPK en las primeras 24 horas de la colecta.

Todas las muestras para diagnóstico deberán estar debidamente identificadas y acompañadas de la indicación para diagnóstico microbiológico con los datos clínicos-epidemiológicos correspondientes para cada caso.

Transporte de las muestras clínicas para diagnóstico virológico:

El transporte de las muestras para diagnóstico deberá realizarse teniendo en cuenta el sistema de triple embalaje en termos seguros y en condiciones de 4°C. Consultar documento SISTEMA DE COLECTA, CONSERVACION Y TRANSPORTE DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS disponible actualmente en todos los CPHEM.

Reporte:

El LNR realizará un reporte diario a las autoridades nacionales designadas por el Ministerio de Salud.

NOTA: Ante cualquier duda comunicarse con el LNR en los teléfonos: 202 0651 y 202 0450.

Todo el personal de laboratorio deberá ser monitoreado. Ante sintomatología de enfermedad deberá reportarse al departamento de seguridad ocupacional de manera inmediata.