

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURI”

Departamento de Virología



“Etiología viral de las Infecciones Agudas del Tracto Respiratorio Inferior en Cuba entre mayo 2012- junio 2013.”

Tesis para optar por el título de Máster en Virología

Autor: Lic. Aned Gordillo Hernández.

La Habana, Cuba

2014

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURI”

Departamento de Virología



“Etiología viral de las Infecciones Agudas del Tracto Respiratorio Inferior en Cuba entre mayo 2012- junio 2013.”

Tesis para optar por el título de Máster en Virología

Autor: Lic. Aned Gordillo Hernández.

Tutores: Dra. Belsy Acosta Herrera, Dr. C.

Lic. Odalys Valdés Ramírez, Dr. C.

Asesor: Lic. Grehete González Muñoz, Dr. C.

La Habana, Cuba

2014

“Jamás se descubriría nada si nos consideráramos satisfechos con las cosas descubiertas”

Lucio Anneo Séneca

A mi madre e hijos.

RESUMEN

Las infecciones respiratorias agudas constituyen la causa principal de morbilidad a nivel mundial, siendo sus principales agentes etiológicos los virus respiratorios. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, alrededor de 4 millones de personas mueren cada año por estas infecciones a nivel mundial, el 98% de ellas debido a las que afectan el tracto respiratorio inferior. El presente trabajo se propuso determinar el papel de diferentes virus respiratorios en la etiología de la Infección Respiratoria Aguda Grave en Cuba durante el período mayo 2012- junio 2013. Se estudiaron 1604 muestras clínicas procedentes de pacientes de todas las edades con Infección Aguda del Tracto Respiratorio Inferior. Para el diagnóstico se emplearon 3 ensayos de TR-RCP Múltiple de tipo anidado y un TR-RCP en tiempo real. Los rinovirus fueron los agentes identificados con mayor frecuencia (28.93%), seguido de los virus influenza (25.85%) y del virus sincitial respiratorio humano (20.13%). Los virus detectados con mayor frecuencia en los pacientes con Infección respiratoria aguda grave fueron los virus influenza ($n=183$, 31.83%) demostrándose asociación significativa (OR 6.437; 95% IC: 3.407-12.159; $p=0,000$). En los pacientes <1 año se encontró asociación significativa con la detección del virus sincitial respiratorio y en la población de 15-59 años con los virus influenza ($p=0.000$). El virus influenza B circuló principalmente entre los meses de mayo y septiembre del año 2012, mientras que el virus influenza A (H1N1)pdm09 predominó en la circulación durante el 2013. Los resultados de esta investigación permiten esclarecer la contribución específica de los diferentes virus respiratorios en la etiología de la Infección respiratoria aguda grave. Al mismo tiempo alertan a los programas nacionales la necesidad de centralizar los esfuerzos de la vigilancia en este tipo de infección para la identificación oportuna de eventos de salud inusitados por los virus influenza.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
II.1. Objetivo general:	2
II.2. Objetivos específicos:	2
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
III.1 Infecciones Respiratorias Agudas.....	5
III.1.1 Definiciones.	5
III.1.2 Etiología de las IRA e IRAG.	6
III.1.3 Epidemiología de las IRA.	6
III.2 Virus respiratorios.....	7
III.2.1 Virus Influenza. Características generales.	7
III.2.1.1 Datos clínicos.	8
III.2.1.2 Epidemiología.	8
III.2.2 Virus sincitial respiratorio humano. Características generales.	9
III.2.2.1 Datos clínicos.	10
III.2.2.2 Epidemiología.	10
III.2.3 Adenovirus humano. Características generales.....	11
III.2.3.1 Datos clínicos.	11
III.2.3.2 Epidemiología.	12
III.2.4 Metapneumovirus humano. Características generales.	13
III.2.4.1 Datos clínicos.	13
III.2.4.2 Epidemiología.	13
III.2.5 Bocavirus humano. Características generales.	14
III.2.5.1 Datos clínicos.	14
III.2.5.2 Epidemiología.	15
III.2.6 Rinovirus humano. Características generales.	15
III.2.6.1 Datos clínicos.	15
III.2.6.2 Epidemiología.	16
III.2.7 Enterovirus. Características generales.	16

III.2.7.1 Datos clínicos.	16
III.2.7.2. Epidemiología.	17
III.2.8 Virus parainfluenza. Características generales.....	17
III.2.8.1 Datos clínicos.	17
III.2.8.2 Epidemiología.	18
III.2.9 Coronavirus humano. Características generales.....	19
III.2.9.1 Coronavirus emergentes.....	19
III.2.9.1.1 SARS-CoVH.	19
III.2.9.1.2 CoVH-NL63.....	19
III.2.9.1.3 CoVH-HKU1.	20
III.2.9.1.4 MERS-CoVH.	20
III.3 Diagnóstico virológico de las IRA.....	21
III.3.1 Principales líneas celulares para aislamiento de virus respiratorios.	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	23
IV.1 Diseño general.	23
IV.2 Universo de estudio.	23
IV.3 Marco muestral.	23
IV.3.1 Muestras clínicas.....	23
IV.4 Métodos para el procesamiento de las muestras clínicas.....	24
IV.4.1 Extracción de ácidos nucleicos.	24
IV.4.2 Diagnóstico molecular para la detección de un segmento del genoma viral.	24
IV.4.2.1 Primera reacción de amplificación de los ensayos TR-RCP Múltiple 1, Múltiple 2 y Múltiple 3.	24
IV.4.2.2 Segunda reacción de amplificación de los ensayos TR-RCP Múltiple 1, Múltiple 2 y Múltiple 3.	26
IV.4.2.3 Detección de los productos de amplificación.	28
IV.5 Subtipado del virus Influenza A (H3) mediante TR-RCP anidada para la amplificación de un segmento del gen de la HA.	29
IV.5.1 Detección de los productos de amplificación.	30
IV.6 TR-RCP en tiempo real para el diagnóstico de influenza A (H1N1)pdm09.	30
IV.7 Recolección, procesamiento y análisis estadístico de la información.	32

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
V.1 Identificación de los diferentes virus respiratorios en la etiología de las IATRI. 33	
V.2 Relación de la positividad a virus respiratorios circulantes en pacientes con IRAG según las características clínicas y demográficas.	37
V.3 Patrón de circulación de los virus influenza asociados a muestras recibidas de pacientes con IRAG durante el período de estudio.....	41
VI. CONCLUSIONES	44
VII. RECOMENDACIONES	45
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

I. INTRODUCCIÓN

Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) constituyen una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en los niños menores de cinco años, los adultos mayores, las personas con enfermedad pulmonar crónica y los pacientes inmunocomprometidos, tanto en los países desarrollados, como en los países en vía de desarrollo (1). Las mismas generan una gran demanda de los servicios de salud y ocasionan altos costos de atención sanitaria (2).

La mayoría de las IRA son de origen viral, siendo el virus sincitial respiratorio humano (VSRH), los virus influenza (A y B), los virus parainfluenza humanos (VPIH), los adenovirus humanos (AdVH), los rinovirus (RV), los enterovirus (EV) y los coronavirus (CoVH-229E y CoVH-OC43) los principales agentes etiológicos (3, 4). En el presente siglo, gracias al uso de las técnicas moleculares se han identificado nuevos virus respiratorios, entre los que se encuentran el metapneumovirus humano (MPVH), los coronavirus humanos (SARS-CoVH, CoVH- NL63, CoVH- HKU1, MERS-CoVH) y el bocavirus humano (BoVH) (5-9).

En la mayoría de los casos, los pacientes afectados cursan con una enfermedad leve de manejo ambulatorio. Sin embargo, una proporción importante de los pacientes requieren asistencia médica y hospitalización en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). El diagnóstico de este último grupo de pacientes, para los efectos de la vigilancia epidemiológica se denomina Infección Respiratoria Aguda Grave (IRAG) (2).

Según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) los virus influenza producen de 3-5 millones de los casos severos y de 250 000-500 000 muertes anuales a nivel mundial (10). El VSRH causa infecciones severas en los lactantes y niños pequeños, siendo la bronquiolitis y la neumonía las principales manifestaciones clínicas en niños menores de un año (11). El resto de los agentes mencionados se asocian a IRAG con menor frecuencia en determinados grupos de edades (12).

La circulación de los virus respiratorios se ha asociado frecuentemente con factores geográficos y climáticos. El patrón de circulación de los virus respiratorios (particularmente VSRH y virus influenza) en los países de clima templado es bien conocido, observándose la mayor incidencia en los meses de invierno. Por otra parte, en los países de clima tropical se conoce que la temperatura varía menos que en las regiones templadas y que su valor medio anual es más alto. Aunque existe un menor

número de publicaciones sobre este aspecto, se describe que la circulación de estos virus se detecta durante todo el año, con un incremento en la estación de lluvia (13, 14).

La frecuencia de agentes específicos también varía dependiendo de la población en estudio y del nivel socioeconómico del país (15). La etiología de las infecciones respiratorias es bien conocida en los niños hospitalizados, particularmente en las infecciones moderadas o graves. En los niños menores de dos años el VSRH es el más frecuente, causando cerca del 50% de las infecciones respiratorias que requieren hospitalización (16). Pocos estudios han evaluado el papel de los virus respiratorios en las infecciones agudas del tracto respiratorio inferior (IATRI) en pacientes adultos hospitalizados (17, 18). Gran parte de los datos disponibles que describen a las infecciones virales en este grupo de edad, provienen de un número limitado de regiones geográficas, principalmente de los Estados Unidos (19).

La mayoría de los estudios de incidencia y circulación de los virus respiratorios se han realizado en los países desarrollados (20, 21). En estos países las IRAG se asocian a un 30% de los ingresos hospitalarios. La gran mayoría de estas infecciones son de origen viral, sin embargo, entre el 10 y el 50% de los pacientes desarrollan una infección secundaria bacteriana (22). Se estima que la neumonía adquirida en la comunidad (NAC), anualmente ocasiona el deceso de 1,6 millones de adultos mayores de 60 años. En los Estados Unidos, ocurren al menos 500.000 casos por año, con una mortalidad del 4% (octava causa de muerte en mayores de 65 años) (23). Por el contrario, en los países en vías de desarrollo esta información es más limitada por no constituir prioridad de los sistemas de salud y probablemente por la falta de recursos para disponer de capacidad diagnóstica (convencional y molecular) para la amplia variedad de virus respiratorios circulantes (24).

En Cuba, las IRA constituyen la primera causa de consultas a los distintos niveles del sistema nacional de salud. Según el anuario estadístico, en el año 2011 se produjeron 6 025 489 atenciones médicas por IRA, el mayor número de ellas (1 616 437) ocurrió en la población entre 25-59 años de edad, sin embargo, la tasa mayor fue en los lactantes (3 711.2 por 1000 habitantes). Considerando los principales diagnósticos al egreso hospitalario en ambos sexos, las enfermedades del sistema respiratorio ocuparon el primer lugar. Dentro de este grupo el primer diagnóstico fue la Influenza asociada a neumonía y el cuarto correspondió a otras IATRI tratadas en su mayoría con terapia antimicrobiana, sin tener en cuenta la posibilidad de que se produzcan efectos tóxicos

potenciales y resistencia a los antimicrobianos (25, 26). La mortalidad por influenza y neumonía, constituye la cuarta causa de muerte en pacientes de todas las edades (25). 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 fue actualizado en el 2012, donde la vigilancia del laboratorio constituye un pilar fundamental (27).

Las IATRI usualmente se presentan como un cuadro clínico que varía considerablemente entre los diferentes agentes virales, un mismo agente puede ocasionar síndromes diversos, mientras que varios agentes infecciosos pueden producir síndromes no distinguibles clínicamente (28). El diagnóstico definitivo lo proporciona el laboratorio de microbiología, evitando el uso indiscriminado de antibióticos y estableciendo estrategias para el control de la propagación de estas enfermedades (29). El Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de los virus influenza y otros virus respiratorios del Instituto Pedro Kourí (IPK) constituye el soporte principal para el diagnóstico y la vigilancia de estos agentes en la etiología de los casos con IATRI. El empleo de métodos convencionales de diagnóstico virológico y la aplicación de las técnicas de diagnóstico molecular ha permitido el estudio de los virus causantes de IRA en Cuba (30, 31).

Conocer el papel de los virus respiratorios en la etiología de las IRAG como parte de los Programas de Prevención y Control, permite un mejor manejo y tratamiento de los pacientes, una adecuada planificación y utilización de los recursos en las instituciones hospitalarias, así como, detectar cualquier evento inusual asociado a estos agentes para alertar al sistema de salud (32).

Considerando estos antecedentes, este estudio tiene como propósito fundamental conocer la contribución de los diferentes virus respiratorios a la etiología de las IATRI, en pacientes cubanos de todas las edades, con énfasis en las IRAG, mediante un algoritmo de diagnóstico molecular.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general:

Determinar el comportamiento de diferentes virus respiratorios en la etiología de la Infección Respiratoria Aguda Grave en Cuba durante el período mayo 2012- junio 2013.

II.2. Objetivos específicos:

1-Identificar la frecuencia de los diferentes virus respiratorios en la etiología de las Infecciones Agudas del Tracto Respiratorio Inferior.

2-Determinar la posible relación de los virus respiratorios circulantes con la Infección Respiratoria Aguda Grave según las características clínicas y demográficas de la población objeto de estudio.

3-Describir el patrón de circulación de los virus influenza asociados a Infecciones Respiratorias Agudas Graves durante el período de estudio.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III.1 Infecciones Respiratorias Agudas.

Las IRA, son patologías de alta frecuencia en la población y se definen como toda afección que compromete una o más partes del aparato respiratorio, durante un lapso no mayor de 15 días. Aunque el principal origen de las IRA es viral y un porcentaje alto es autolimitado, son la primera causa de indicación de antibióticos en el mundo (33).

Actualmente las IRA constituyen una de las patologías más frecuentes en la edad pediátrica, originando un gran número de consultas e ingresos en los servicios de asistencia, sobre todo en los meses de invierno (34). Afectan a todos los grupos de edades y de ambos sexos por igual. Este tipo de infecciones genera demanda de servicios de salud, altos costos de atención sanitaria y producen altas tasas de morbilidad y mortalidad. La mayoría de los pacientes afectados cursan con una enfermedad leve de manejo ambulatorio, sin embargo, un número elevado de pacientes requiere asistencia médica y hospitalización en unidades de atención al grave. El diagnóstico de este último grupo de pacientes, para los efectos de la vigilancia epidemiológica se denomina Infección Respiratoria Aguda Grave (2).

Con el propósito de fortalecer las capacidades básicas de vigilancia y respuesta, e integrar la vigilancia epidemiológica de influenza con la de laboratorio en un sistema único, la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en conjunto con los Centros de Prevención y Control de Enfermedades de los EE.UU (CDC), desarrolló el Protocolo Genérico para la Vigilancia de Influenza. Este protocolo generó dos guías operativas mayormente dirigidas a los equipos de salud de nivel local de los Estados Miembros de la OPS. La primera es para apoyar la preparación de los establecimientos de salud ante un caso de (IRAG) y la segunda guía operativa tiene como objetivo sistematizar las orientaciones para la implementación de la vigilancia centinela de Enfermedad Tipo Influenza (ETI) e IRAG (2).

III.1.1 Definiciones.

IRA: se define como un conjunto de enfermedades agudas del tracto respiratorio causada por un agente infeccioso transmitido de persona a persona, que puede cursar desde un resfriado común hasta una complicación más severa como la neumonía (35).

De acuerdo a su localización y la estructura anatómica que afectan se clasifican en:

Infecciones del Tracto Respiratorio Superior (ITRS). Refiriéndose a las que afectan las amígdalas, los senos nasales, los oídos, la faringe y la epiglotis.

Ejemplos: amigdalitis, sinusitis, otitis media, faringitis, laringitis, epiglotitis, faringoamigdalitis y catarro común o ETI (36).

Infecciones Agudas del Tracto Respiratorio Inferior (IATRI). Refiriéndose a las que afectan la laringe, la tráquea, los bronquios, los bronquiolos y el parénquima pulmonar y resultan ser graves en la mayoría de los casos.

Ejemplos: laringitis, traqueítis, bronquitis, laringotraqueobronquitis o crup, traqueo-bronquitis, bronquiolitis, neumonía y bronconeumonía (36, 37).

IRAG: Clasificación muy utilizada por los pediatras y clínicos referida a la severidad de las IRA, tomando en cuenta los parámetros clínicos presentes en los pacientes hospitalizados en las UCI (2).

Definición de caso de IRAG:

- Fiebre o historia de fiebre, tos, dificultad para respirar y necesidad de hospitalización (2).

La definición de IRAG para los niños menores de 5 años se adopta del Programa de Atención Integrada a las Enfermedades Prevalentes en la Infancia (PAIEPI) de la OMS:

Niño menor de 5 años en el que se sospeche clínicamente la presencia de neumonía y requiera de ingreso hospitalario (38).

III.1.2 Etiología de las IRA e IRAG.

Entre los principales agentes etiológicos virales se encuentran: VSRH, BoVH, RV, MPVH, AdVH, Influenza A y B, VPIH 1-4, CoVH y EV (39-42).

III.1.3 Epidemiología de las IRA.

Según datos de la OMS, alrededor de 4 millones de personas mueren cada año por IRA a nivel mundial, el 98% de ellas debido a las IATRI. Las tasas de mortalidad son elevadas en los lactantes, en los niños entre 1 y 5 años de edad, en los adultos de la tercera edad y en las personas con alteraciones cardíacas, pulmonares o del sistema inmune, principalmente en los países en vías de desarrollo. La susceptibilidad a la infección es universal, pero resultan más graves en los grupos de riesgo antes

mencionados (43). Del mismo modo, estas afecciones constituyen la causa más frecuente de consulta o admisión, particularmente en los servicios pediátricos (44).

Cerca de 200 millones de casos de neumonía adquirida en la comunidad ocurre cada año (100 millones en niños y 100 millones en adultos). El diagnóstico molecular ha permitido demostrar el papel de los virus en la neumonía. Estos descubrimientos señalan que la incidencia de neumonía viral se ha subestimado. En los niños, el VSRH, los RV, el MPVH, el BoVH, y los VPIH son los agentes identificados con mayor frecuencia, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (45).

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 (46).

Los virus respiratorios se diseminan entre los humanos por aerosoles, por el contacto directo con secreciones infectadas o por el 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, los AdvH y el BoVH pueden transmitirse, además, por vía fecal-oral. El período de incubación varía según el agente, pero generalmente es corto (1-5 días) (43).

III.2 Virus respiratorios

III.2.1 Virus Influenza. Características generales.

Los virus influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* que incluye cinco géneros de acuerdo a su estructura genómica y a las diferencias antigénicas en el gen de la nucleoproteína (NP) y de la proteína de la matriz (M): Influenza A, Influenza B, Influenza C, Thogotovirus e Isavirus. La influenza A es la única que 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 (47). Todos los virus influenza son virus envueltos, de simetría helicoidal, esféricos o pleomórficos de 80 a 120 nm de diámetro que algunas veces pueden adoptar una forma alargada de 400nm. Los virus de influenza A y B contienen un genoma ARN

monocatenario, lineal, en sentido negativo, compuesto de 8 segmentos que codifican para 11 proteínas, mientras que el tipo C solo posee 7 segmentos (48, 49).

III.2.1.1 Datos clínicos.

Los virus influenza son los agentes causales de la enfermedad infecciosa aguda de las vías respiratorias conocida como Influenza, gripe o catarro común (50, 51). 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 (52). 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 (53). 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 (54).

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 (55, 56). Las extrapulmonares pueden subdividirse en neurológicas, cardiovasculares y miopatías (57-59).

III.2.1.2 Epidemiología.

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 (47). 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 (60, 61).

Desde el año 1977 hasta el 2009 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 (62, 63). En el año 2009 emergió el virus influenza A (H1N1) pdm09 y desplazó de la circulación al virus influenza A (H1N1) estacional. El virus Influenza A (H3N2) sigue siendo el subtipo predominante a nivel mundial, seguido por influenza B e Influenza A (H1N1) pdm09 (49). El 29 de marzo de 2013, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades en China reportó el primer caso confirmado de infección humana con el virus de influenza aviar A (H7N9). Hasta el 29 de noviembre de 2013 se han reportado 139 personas infectadas y 45 fallecidos (64).

El período de incubación para los virus influenza 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 (51).

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, los picos de mayor incidencia se asocian con las estaciones de lluvia. Estos índices elevados están relacionados con el ausentismo escolar y laboral, las altas tasas de consultas médicas por IRA y las de hospitalización en los niños menores de 5 años, sólo superadas por las del grupo de ancianos mayores de 85 años (51, 65, 66).

III.2.2 Virus sincitial respiratorio humano. Características generales.

El VSRH fue aislado en 1957 de dos niños hospitalizados por bronconeumonía y laringotraqueobronquitis (67). 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, posee un genoma compuesto ARN de polaridad negativa, lineal y no segmentado de 16 a 20 kb, que se encuentra en el interior de una nucleocápside helicoidal (68, 69).

III.2.2.1 Datos clínicos.

El cuadro clínico de las infecciones por el VSRH varía de acuerdo con la edad del paciente. 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 hasta una bronquiolitis o neumonía grave. La reinfección en los niños, los adultos y los ancianos es frecuente debido a que la inmunidad es incompleta (70). 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 (71-73).

Existen evidencias que los niños que desarrollan síntomas del tracto respiratorio bajo durante la infección con VSRH en el primer año de vida, incrementan el riesgo a desarrollar síntomas parecidos a los de asma durante la edad escolar (69,74,75).

III.2.2.2 Epidemiología.

El VSRH afecta principalmente a niños que se encuentran en edades comprendidas entre las seis semanas y los nueve meses, causando bronquiolitis aguda y neumonía (72, 76). La mitad de los niños son infectados por este virus en el primer año de vida, a los dos años de edad casi todos los niños se han infectado con el virus y aproximadamente un 50% se ha infectado dos veces (77).

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 (78). Los humanos son la única fuente de infección del virus. La transmisión intrahospitalaria a partir del personal sanitario infectado, que con frecuencia es asintomático, es frecuente (79).

Posee un patrón estacional definido en las zonas templadas, donde las epidemias ocurren anualmente y tienen lugar durante los meses de invierno 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 (80). 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 (73).

III.2.3 Adenovirus humano. Características generales.

Los AdvH fueron descubiertos en el año 1953 a partir del tejido de adenoide extirpado quirúrgicamente y cultivado durante varias semanas (81). 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 de la A a la F, y 51 serotipos (82, 83). Son virus desnudos con un diámetro entre 70 a 90 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 ADN de doble cadena lineal de 35 kb. Los determinantes antigénicos localizados en la superficie del virión poseen reactividad específica de tipo y están involucrados en la respuesta de anticuerpos mediadores de la neutralización (hexonas), o de la inhibición de la hemaglutinación (fibras) (82).

III.2.3.1 Datos clínicos.

La mayoría de las infecciones por AdvH, se presentan inicialmente como una ligera enfermedad respiratoria que usualmente es autolimitada (84, 85). De manera usual los síntomas incluyen congestión nasal, tos, faringitis y amigdalitis que pueden acompañarse de manifestaciones sistémicas como fiebre, malestar general, dolor de cabeza y mialgia, también pueden aparecer síntomas gastrointestinales como vómitos, diarreas y dolor abdominal (86). La severidad y extensión de los síntomas dependen del serotipo y del síndrome clínico. Aunque la mayoría de estas infecciones son benignas, pueden progresar a la severidad, causando Crup, bronquiolitis y neumonía (en ocasiones asociada con shock séptico) que puede ocurrir hasta en un 20% de niños pequeños donde pueden dejar secuelas que incluyen bronquiectasias y bronquiolitis obliterante (87-89). El curso hacia una enfermedad respiratoria grave y fatal también se ha documentado durante brotes en población adulta inmunocompetente, principalmente por los serotipos 4, 7 y 14 (90-92). Más recientemente, las infecciones por AdvH se han asociado con el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) en adultos inmunocompetentes (93).

En la población militar, los brotes de enfermedad respiratoria severa con frecuentes complicaciones que involucran al Sistema Nervioso Central (SNC) se han descrito durante la última década (94). Particularmente, estos brotes se han producido por los

serotipos 4 (95-97) y 14, cuya tasa de ataque entre los nuevos reclutas asciende hasta un 80%, con un 20% de hospitalizaciones (98). Otra de las manifestaciones clínicas de las infecciones por AdvH es el síndrome similar al pertusis. Este término se ha empleado para denotar los signos y síntomas indistinguibles de la tosferina, cuando no se puede demostrar la presencia de su agente causal, la *Bordetella pertussis* (99). El cuadro clínico se caracteriza por una tos intensa, paroxística con emesis y cianosis, con intervalos breves de apnea, característicos de la tosferina. Estas formas de pertusis se han llamado síndrome coqueluchoide o pertusoide y la asociación de los AdvH con estos, se ha descrito en estudios epidemiológicos (100-102). De manera general, los AdvH se han responsabilizado con epidemias de IATRI con casos de neumonías, complicaciones pulmonares y muerte (97, 103, 104).

III.2.3.2 Epidemiología.

Las infecciones por AdvH ocurren a nivel mundial, de forma endémica, esporádica y epidémica. De manera general estos patrones se correlacionan con el serotipo viral y la edad de la población susceptible, que en el 80% de los casos suelen ser los niños menores de 4 años (82).

Aunque el hospedero tiene la capacidad de eliminar la infección generando una respuesta inmune potente, el hecho de que esta respuesta sea serotipo- específica, hace posible que individuos de todas las edades puedan infectarse con diferentes serotipos de AdvH a lo largo de toda la vida (105).

La susceptibilidad a las infecciones por estos agentes es universal pero las infecciones severas son frecuentes en hospederos inmunocomprometidos (pacientes con SIDA, trasplantados, pacientes con cáncer), pacientes con antecedentes de enfermedades crónicas y en los niños menores de 5 años de edad (106, 107). En las comunidades cerradas pueden ocurrir brotes de ITRS e IATRI, principalmente en unidades militares, escuelas y campamentos de verano (98, 107). El período de incubación va de 2 a 14 días, dependiendo del serotipo viral y la vía de transmisión (108). Los serotipos predominantes difieren de acuerdo a los países, regiones y localidades. Su prevalencia cambia con el tiempo debido a la transmisión y al reemplazamiento de nuevas cepas. Existen diferencias notables en la distribución de los serotipos entre la población civil y militar (103).

III.2.4 Metapneumovirus humano. Características generales.

El MPVH es un paramoxivirus descubierto en Holanda en el año 2001, causante de infecciones respiratorias altas y bajas en niños y adultos alrededor del mundo (109, 110). Comparte características genéticas, clínicas y epidemiológicas con el VSRH (69, 111).

Los miembros de la familia *Paramyxoviridae* son virus ARN de cadena sencilla, no segmentado de 16 a 20kb, de polaridad negativa, pleomórficos con un diámetro de 150-300 nm. *Paramyxoviridae* incluye las subfamilias *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*; la subfamilia *Pneumovirinae* se divide en *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*. El *Metapneumovirus* difiere del *Pneumovirus* por la carencia de dos proteínas no estructurales, NS1 y NS2, y una diferencia en el orden de los genes (112).

III.2.4.1 Datos clínicos.

El MPVH se ha asociado en niños como agente causal de bronquiolitis, crup, neumonía y exacerbación de asma (112). La infección por el MPVH puede manifestarse como una infección respiratoria en un rango que varía desde leve o asintomática hasta una enfermedad severa de las vías respiratorias bajas (69, 113). Neumonías severas causadas por el MPVH se han reportado en receptores de trasplantes de órganos sólidos y en los receptores de trasplante de células madre, en este último grupo de pacientes las infecciones por el MPVH pueden ser sintomáticas y persistentes (114-116).

III.2.4.2 Epidemiología.

El perfil epidemiológico de las infecciones por el MPVH es similar al de las infecciones por el VSRH. Las infecciones por el MPVH se han reportado en todas las edades, con la ocurrencia de enfermedades más severas en niños pequeños menores de dos años, en pacientes inmunocomprometidos y en ancianos débiles. La incidencia por las infecciones del MPHV ha variado generalmente de un 5% a un 10% en niños hospitalizados por infecciones respiratorias agudas y de un 12% a un 20% en pacientes ambulatorios, por lo que este patógeno tiene un papel importante en la etiología de las enfermedades respiratorias agudas. Hoy el MPVH ocupa el segundo lugar después del VSRH en la etiología de la IRAG en niños menores de 2 años (117-120).

El período de incubación se estima entre 4 a 6 días basado en un evento de transmisión simple, aunque se necesita realizar más estudios para definir mejor este intervalo de tiempo (121). Las infecciones por el MPVH parecen tener una distribución estacional en

regiones templadas, como el VSRH, los VPIH y los virus influenza (117, 122-124). Aunque muchos estudios han limitado su vigilancia a la temporada típica respiratoria, otros reportes sugieren que el MPVH pudiera estar circulando durante todo el año con alzas en determinados períodos (115, 125-127). Los humanos son los únicos hospederos naturales del virus (112).

Presenta una distribución mundial siendo descrito en varios estudios alrededor del mundo (128). Aunque los rangos de incidencia por edades varían en diferentes muestras poblacionales, generalmente este agente afecta más a niños menores de 2 años y adultos mayores de 65 años (129).

III.2.5 Bocavirus humano. Características generales.

El BoVH se identificó por primera vez en muestras clínicas respiratorias de pacientes con diagnóstico de IRA en el año 2005. Se caracterizó como un miembro de la familia *Parvoviridae*, subfamilia *Parvovirinae*, género *Bocavirus*. Es un virus pequeño, desnudo, 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) (130-133).

III.2.5.1 Datos clínicos.

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 IATRI, otros investigadores publicaron sobre la frecuencia elevada de coinfecciones entre el BoVH y otros virus respiratorios y su detección en pacientes asintomáticos (134-136). 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 e inferior y en pacientes con exacerbaciones de las crisis de asma, episodios de sibilancia, descompensaciones de la EPOC, entre otros diagnósticos (137-139).

La sintomatología observada en los casos de infección por el BoVH incluye la ocurrencia de complicaciones, como el desarrollo de bronquitis, bronquiolitis y

neumonía (135, 140, 141). 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 (142, 143).

III.2.5.2 Epidemiología.

Se ha demostrado que el BoVH posee, aparentemente, una distribución mundial, con una frecuencia que varía de 1,5% a 19%. Pocos estudios se han realizado en América Latina con relación a la asociación del BoVH a infecciones respiratorias. Merece destacar el alto porcentaje (85%) en que este virus se encuentra como coinfección, tanto con virus, como con otros patógenos. La transmisión del BoVH no está esclarecida, debido a que se ha encontrado en el tracto respiratorio, suero, sangre, orina y en heces. Sin embargo, algunos estudios muestran que el BoVH es el cuarto agente mayormente detectado en pacientes de hasta 2 años de edad, hospitalizados con IATRI, sugiriendo que la vía aérea pudiera ser la principal vía de transmisión (144). Se plantea que el BoVH produce IRA con una mayor frecuencia en niños entre 6 meses y 2 años de edad (135, 145).

El perfil estacional de los casos de infección por el BoVH todavía no está bien establecido. No obstante, en los países de clima templado la circulación de este virus es más acentuada en el invierno y el inicio de la primavera. Hasta el momento, estudios muestran la existencia de tres tipos de BoVH (BoVH-1, BoVH-2 y BoVH-3), siendo el tipo 3 solo encontrado en heces, el 2 en sangre y heces y el 1 solo se asocia a IRA (144).

III.2.6 Rinovirus humano. Características generales.

Los RV son los agentes más frecuentes del resfriado común. Estos virus, descubiertos en 1956, pertenecen a la familia *Picornaviridae*. Poseen un genoma ARN de cadena simple de 7.2 kb, de polaridad positiva con un único marco de lectura. Actualmente, existen más de 100 serotipos clasificados en tres especies: A, B y C (69, 146-148).

III.2.6.1 Datos clínicos.

El impacto y la asociación de RV con diferentes cuadros clínicos se han subestimado debido a la falta de métodos diagnósticos suficientemente sensibles y específicos. La incorporación de los métodos moleculares para su diagnóstico, ha permitido asociar a los RV con infecciones respiratorias, no solo del tracto superior sino también del

inferior, tales como neumonía y bronquiolitis en niños menores de 2 años (149). Asimismo, se les ha detectado en pacientes con exacerbaciones de crisis de asma, con fibrosis quística y con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (148, 150, 151). Además, la infección por RV durante la infancia se ha identificado como predictor de sibilancias recurrentes, y con el posterior desarrollo de asma en niños (148, 152, 153).

III.2.6.2 Epidemiología.

Los RV se encuentran ampliamente extendidos en todo el mundo, causando anualmente cuadros de IRA en todas las edades, siendo más frecuentes en los lactantes, los niños pequeños y en edad escolar, pero también pueden afectar a adultos jóvenes y a personas de la tercera edad. Debido a la gran cantidad de serotipos pueden producir más de una infección por año y la transmisión exitosa de la infección es dependiente de la entrada del virus al huésped susceptible (154). Son más comunes en climas templados y durante los meses más fríos del año. El período de incubación varía de 1 a 4 días (155).

III.2.7 Enterovirus. Características generales.

Los EV se incluyen dentro de la familia *Picornaviridae*. Poseen un genoma de ARN de simple cadena, polaridad positiva, 7.5 kb con cápside de simetría icosaédrica. El genoma viral está compuesto de una región 5' no traducida (5'UTR) seguida por un único marco abierto de lectura (156).

III.2.7.1 Datos clínicos.

Los EV son responsables de un gran número de enfermedades muy frecuentes en niños y en recién nacidos con una gran variabilidad de cuadros clínicos. La forma más frecuente de presentación es la enfermedad febril inespecífica, que en los niños hace pensar generalmente en una sepsis bacteriana. Dentro de las manifestaciones clínicas más frecuentes del tracto respiratorio se encuentran: el resfriado común, la faringitis, la herpangina, la estomatitis, y la neumonía (157). Entre ellos los virus coxsackie A21 y A24 causan brotes epidémicos en adultos. Los virus coxsackie B se implican en la etiología de una amplia gama de cuadros que afectan a todo el tracto respiratorio, con especial prevalencia en edades tempranas de la vida. El EV-68 es un agente asociado a enfermedades del tracto respiratorio. Ha estado clasificado en la especie D del género EV que actualmente comprende 2 agentes patógenos humanos importantes, el EV-70 y el EV-94 (156).

En un estudio realizado en Tailandia durante el periodo 2006-2011 se demostró un predominio de IATRI en niños por EV-68 (156). A pesar de que las infecciones por EV-68 generalmente afectan a niños menores, la asociación entre las infecciones por este virus y las enfermedades respiratorias en pacientes adultos también se ha establecido (158, 159). Estos estudios han demostrado que la infección por este virus parece ser una causa importante de neumonía viral en niños con fiebre, tos, disnea y dificultad para respirar que requieren de hospitalización (158-160). Además, también se ha reportado una fuerte asociación entre la infección con el virus y la exacerbación de crisis de asma (161).

III.2.7.2. Epidemiología.

Los EV tienen una distribución mundial. En los climas templados predominan en otoño y verano y en los climas tropicales todo el año. La seroepidemiología de las infecciones por EV demuestra una transmisión de la infección aumentada en edades tempranas, en poblaciones con bajo nivel socioeconómico (162). Una proporción importante de estos agentes etiológicos están implicados en la etiología de las infecciones de las vías respiratorias. En estos últimos años, con el uso de técnicas moleculares altamente sensibles, se ha reconocido el EV-68 como un agente patógeno respiratorio reemergente en varios países (156).

III.2.8 Virus parainfluenza. Características generales.

Forman parte de la familia *Paramyxoviridae* y de los géneros *Rubulavirus* y *Respirovirus*. Tienen un genoma compuesto por ARN monocatenario, el cual está recubierto por una cápside proteica; ésta, a su vez, se halla recubierta por una envoltura lipídica que presenta unas espículas glicoproteicas codificadas por el genoma vírico y que son antigénicas. Se distinguen cuatro tipos de VPIH (VPIH-1, VPIH-2, VPIH-3 y VPIH-4), con dos subtipos del VPIH-4 (4A y 4B). En contraste con los virus de influenza, son estables y no presentan cambios antigénicos (163). Estos virus se describieron por primera vez a finales de los años 50, conociéndose poco a poco algunas de sus características más importantes (164).

III.2.8.1 Datos clínicos.

Los VPIH causan rinitis y faringitis. Sin embargo, la laringotraqueítis aguda infantil, es el síndrome más importante; el VPIH-1 es el principal agente etiológico. Comienza como un resfriado simple, generalmente con febrícula, y en el transcurso de las

siguientes 12 a 72 h aparecen la tos “perruna”, la disfonía, el estridor y la dificultad respiratoria de mayor o menor intensidad, como consecuencia de la inflamación de los tejidos subglóticos y de la mucosa traqueal. La mayoría de los casos siguen un curso leve y autolimitado (163).

Las infecciones por los VPIH en los niños pequeños son más graves y a veces se acompañan de fiebre elevada. En cambio, las reinfecciones que aparecen en niños mayores o adultos suelen manifestarse únicamente como un resfriado común o incluso ser asintomáticas (163). Una de sus patologías más frecuentes es el Crup, siendo el VPIH-1 y el VPIH-3 los agentes más frecuentes en niños menores de 5 años, especialmente los comprendidos entre 2 y 3 años de edad. Asimismo, el VPIH-3 está implicado en la producción de neumonía y bronquiolitis, sobre todo en niños menores de 1 año (165). El VPIH-4 aparece de forma infrecuente, y su importancia clínica está todavía por definir, aunque estudios recientes han demostrado la participación de este virus en la IRAG, principalmente en niños (166).

III.2.8.2 Epidemiología.

Los VPIH-1, 2 y 3 presentan una distribución mundial entre personas de todos los grupos de edad, mientras que el VPIH-4, tanto 4A como 4B, son mucho menos frecuentes. Clínicamente, también los VPIH presentan diferencias en cuanto al papel que juegan los diferentes tipos (164, 167).

El VPIH-1 tiende a ocasionar epidemias de infección respiratoria en otoño, con un patrón bienal, generalmente afectando a niños de 2 a 6 años de edad. El VPIH-2 también da lugar a epidemias en los meses de otoño. En los climas templados el VPIH-3, suele provocar epidemias anuales, generalmente en invierno y primavera, afectando a niños menores de 2 años (sobre todo en los primeros meses de vida) con una frecuencia sólo inferior a la del VSRH. El VPIH-4 se comporta como el VPIH-3, pero es menos frecuente (165).

La inmunidad frente a la infección por los VPIH es incompleta y de corta duración, por lo que es frecuente observar reinfecciones con cada uno de estos virus, aunque suelen ser más benignas que las infecciones primarias. El período de incubación se sitúa entre 2 y 8 días (164).

III.2.9 Coronavirus humano. Características generales.

Los CoVH pertenecen a la familia *Coronaviridae*, género *Coronavirus*. Son viriones pleomórficos de 80-160 nm, envueltos con genoma ARN de cadena simple no segmentado, pero sin embargo poseen una frecuencia de recombinación relativamente alta (168).

Desde mediados de los años sesenta del pasado siglo los CoVH (CoVH-229E y CoVH-OC43), se han asociado exclusivamente con el resfriado común y por tanto se consideraban patógenos respiratorios relativamente benignos. Sin embargo esta concepción cambió drásticamente en abril de 2003, fecha en la que se identificó un nuevo CoVH como responsable del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) (169).

III.2.9.1 Coronavirus emergentes.

Con los métodos de biología molecular actualmente disponibles, se han descrito nuevos CoVH asociados a IATRI.

III.2.9.1.1 SARS-CoVH.

En el 2003 se reconoció un nuevo agente responsable del SARS. Posteriormente se llegó a la conclusión de que era un nuevo CoVH, el SARS-CoVH, desconocido hasta entonces y de procedencia animal, responsable de un cuadro grave del tracto respiratorio inferior, con fiebre elevada, tos seca, disnea, cefalea e hipoxemia (170, 171).

SARS-CoVH es un virus ARN, que pertenece al grupo 3 de los coronavirus. El período de incubación es de 2-14 días con un promedio de 4-6 días. Tiene una presentación bifásica y en algunos casos trifásica. Produce un cuadro respiratorio febril, acompañado de escalofríos, cefalea y mialgias. En una segunda fase aparece diarrea y vómitos, con progresión del compromiso respiratorio. La recuperación es al final de la segunda semana o comienzos de la tercera. La mortalidad es de 7-16%, que llega al 50% en mayores de 65 años. La presencia de comorbilidades aumenta la gravedad y la mortalidad. Los menores de 12 años tienen una evolución de menor gravedad y mortalidad (172).

III.2.9.1.2 CoVH-NL63.

En el año 2004 dos grupos de investigadores holandeses describieron casi simultáneamente un nuevo CoVH aislado de un paciente con bronquiolitis y de muestras respiratorias guardadas de un paciente con neumonía del año 1988.

Denominaron a este nuevo virus como CoVH- NL63, el cual pertenece al grupo 1 de los CoVH y está relacionado al CoVH -229E (173, 174).

Este virus tiene una distribución mundial. Circula en invierno y afecta con mayor frecuencia a los lactantes. Puede producir disfonía, exantema, diarrea y otitis media aguda (OMA). Se asocia en un 17,4% a laringitis obstructiva. En pacientes hospitalizados se detecta en un 2-9% de los casos con estudio negativo de los agentes tradicionales de IATRI, se asocia a bronquiolitis y neumonía. En ocasiones es indistinguible de una infección por el VSRH y el MPVH. Las coinfecciones ocurren especialmente con el VSRH. Afecta fundamentalmente a pacientes adultos e inmunocomprometidos (175, 176).

III.2.9.1.3 CoVH-HKU1.

En enero del año 2005 se describió un tercer CoVH, aislado de un paciente con neumonía en Hong Kong, China. Se denominó CoVH-HKU1 (8). Este virus pertenece al grupo 2 de los CoVH. Posee 2 genotipos A y B, los cuales pueden cocircular. Tiene un predominio estacional en otoño e invierno y se asocia a otros agentes (177). Se ha encontrado entre un 2% y un 4,4 % de los episodios de IRA en pacientes en Australia, China, E.U.A., Francia e Italia. Produce neumonía tanto en niños como en adultos (8).

III.2.9.1.4 MERS-CoVH.

El Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS) (178), es causado por un nuevo tipo de CoVH reportado por primera vez el 24 de septiembre de 2012 por el virólogo egipcio, Dr. Ali Mohamed Zaki en Jeddah, en Arabia Saudita, quien aisló e identificó a un nuevo tipo de CoVH desconocido hasta el momento de los pulmones de un paciente masculino de 60 años de edad que presentaba una neumonía aguda e insuficiencia renal. (179, 180).

El MERS-CoVH es el sexto tipo de CoVH recientemente descubierto que presenta un comportamiento similar al del SARS-CoVH (181). El virus MERS-CoVH pertenece al género *Betacoronavirus*, al igual que el SARS-CoVH (182). Sin embargo se encuentra más estrechamente relacionado a los coronavirus de los murciélagos HKU4 y HKU5 (linaje 2C) que al SARS-CoVH (linaje 2B) (9, 178).

Desde septiembre del 2012 hasta noviembre del 2013, se ha informado a la OMS un total de 136 casos de infección por dicho virus confirmado mediante pruebas de laboratorio, incluidas 58 muertes (183). Los casos son procedentes de los siguientes

países del Oriente Medio: Arabia Saudita, Emiratos Árabes Unidos, Jordania y Qatar. En Alemania, Francia, Italia, Reino Unido y Túnez también se han notificado casos confirmados, que presentaron la enfermedad después de haber vuelto de viajes del Oriente Medio. En Francia, Italia, Reino Unido y Túnez ha ocurrido transmisión local limitada a personas que no han estado en el Oriente Medio, pero sí han tenido contacto con casos confirmados o probables (183).

III.3 Diagnóstico virológico de las IRA

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 (28).

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 IATRI son las obtenidas por procedimientos invasivos [aspirado bronquial (AB), lavado broncoalveolar (LB) y cepillado bronquial] y el esputo.
- 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) 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 (184).

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

Reacción en cadena de la polimerasa (RCP), RCP en tiempo real, secuenciación de ácidos nucleicos, entre otros (184).

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 (185, 186).

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), inmunofluorescencia (IF), ensayos inmunoenzimáticos (EIE), neutralización (Nt) y RCP constituye la prueba de oro para la identificación de los agentes cultivables (187).

III.3.1 Principales líneas celulares para aislamiento de virus respiratorios.

Las líneas celulares comúnmente empleadas para el aislamiento de virus respiratorios se detallan a continuación:

- NCI-H292: sensible a *Adenovirus* y *Enterovirus*.
- HeLa: sensible a *Adenovirus*
- HEp-2: sensible a *Adenovirus*.
- Vero: sensible a varios virus respiratorios.
- MDCK-L: sensible a los virus influenza A y B y *Adenovirus*.
- MRC-5: sensible a varios virus respiratorios (184).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Diseño general.

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, con base en la vigilancia de los LNR para los virus influenza y otros virus respiratorios del IPK.

IV.2 Universo de estudio.

El universo de estudio estuvo constituido por todas las muestras clínicas recibidas en el LNR de Virus Respiratorios del IPK como parte de la vigilancia de las IRA de posible etiología viral, durante el período comprendido entre el 1 de mayo del 2012 y el 30 de junio del 2013. Para conformar el marco muestral, se realizó una selección de las muestras con diagnóstico de IATRI, teniendo en cuenta los siguientes criterios de inclusión:

Criterios de inclusión:

- Toda muestra clínica colectada de paciente con diagnóstico de IATRI (laringitis, laringotraqueobronquitis, bronquitis aguda, bronquiolitis, neumonía y bronconeumonía), enviada a los LNR durante los primeros 10 días a partir del inicio de los síntomas, acompañada de un modelo de colecta de muestra (Anexo 1).
- Volumen de la muestra suficiente para las determinaciones a realizar, la cual debe estar correctamente identificada y transportada al laboratorio a 4 °C en un sistema de triple empaque.

Se empleó la definición de caso de IRAG incluida en el Programa Integral de Prevención y Control de las IRA (2):

- Fiebre o historia de fiebre, tos, dificultad para respirar y necesidad de hospitalización.

IV.3 Marco muestral.

Se estudiaron 1604 muestras clínicas procedentes de pacientes de todas las edades que cumplieron con los criterios de inclusión.

IV.3.1 Muestras clínicas.

Las muestras clínicas consistieron en exudados nasofaríngeos (ENF) y aspirados bronquiales (AB) colectados en medio de transporte universal para virus (UTM, siglas del inglés Universal Transport Medium), transportadas hacia el laboratorio del IPK en un sistema de triple empaque a 4°C, correctamente identificadas y acompañadas del modelo de colecta de muestra. Las mismas 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 .

IV.4 Métodos para el procesamiento de las muestras clínicas.

IV.4.1 Extracción de ácidos nucleicos.

El ácido nucleico total ARN/ADN se obtuvo mediante extracción automática a partir de una alícuota de $140\mu\text{L}$ de la muestra clínica, empleando el extractor automático QIAcubeTM (QIAGEN, EUA) con un volumen de elusión final de $60\mu\text{L}$. 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 incluyó 100 copias de un producto clonado y amplificado como control interno (CI) descrito por Coiras y colaboradores en el 2003 (188). Este CI fue empleado para chequear el proceso de extracción, la eficiencia de la amplificación y la presencia de inhibidores en la muestra clínica. También se procesaron controles negativos en cada extracción, consistente en agua estéril libre de nucleasas (Sigma), empleando el mismo procedimiento utilizado para las muestras clínicas.

IV.4.2 Diagnóstico molecular para la detección de un segmento del genoma viral.

Para el diagnóstico de virus respiratorios se emplearon 3 ensayos de TR-RCP Múltiple de tipo anidado, (TR-RCP Múltiple 1 para la detección de Influenza A, Influenza B, Influenza C y AdVH) (188), (TR-RCP Múltiple 2 para la detección de VPIH 1-4, CoVH-OC43, CoVH-229 E, RV y EV) (189) y (TR-RCP Múltiple 3 para la detección de VSRH A y B, MPVH y BoVH) (190).

IV.4.2.1 Primera reacción de amplificación de los ensayos TR-RCP Múltiple 1, Múltiple 2 y Múltiple 3.

Para la primera reacción de amplificación de los ensayos TR-RCP Múltiple 1, Múltiple 2 y Múltiple 3 anidadas se adicionaron $5\mu\text{L}$ del ARN extraído a $45\mu\text{L}$ de las mezclas de las reacciones para completar un volumen final de $50\mu\text{L}$. Las mezclas estuvieron compuestas por $10\mu\text{L}$ de tampón 5X, $0,1\mu\text{M}$ de la mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), $2\mu\text{L}$ 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 específico (tabla 1). Las condiciones de amplificación aparecen representadas en la tabla 2.

Tabla 1. Cebadores utilizados en la primera reacción de amplificación de los ensayos TR-RCP Múltiple.

Cebadores de la primera reacción TR/RCP Múltiple 1		
Influenza A,B,C	NPAC11+	5' GAACTCRTCCYWWATSWCAAWGRRGAAAT 3'
	NPB1+	5' ACAGAGATAAAGAAGAGCGTCTACAA 3'
	NPABC22-	5' ATKGCGCWYRAYAMWCTYARRTCTTCAWAKGC 3'
AdVH	ADV1F+	5' CAACACCTAYGASTACATGAA 3'
	ADV1R-	5' KATGGGGTARAGCATGTT 3'
CI	RTS	5' GCTTGGGCGTGTCTCAAAATCT 3'
	RTA-	5' GTCGCCACGGTTGATGAGAGCT 3'
Cebadores de la primera reacción TR/RCP Múltiple 2		
VPIH1-4	1PIV13	5' AGGWTGYSMRGATATAGGRAARTCATA 3'
	1PIV4	5' ATCCAGARRGACGTCACATCAACTCAT 3'
	1PIV2	5' TAATTCCTCTTAAAATTGACAGTATCGA 3'
	2PIV13	5' CTWGTATATATRTAGATCTTKTTRCCTAGT 3'
	2PIV24	5' TRAGRCCMCCATAYAMRGGAAATA 3'
EV	HER1	5' CTCCGGCCCCTGAATRYGGCTAA 3'
RV	HER2	5' TCIGGIARYTTCCASYACCAICC 3'
CoVH	1HCoV	5' TGTGCCATAGARGAYWACTTTTT 3'
OC43,229E	2HCoV	5' AACCGCTTKYACCAKCAAAYGCACA 3'
CI	RTS	5' GCTTGGGCGTGTCTCAAAATCT 3'
	RTA	5' GTCGCCACGGTTGATGAGAGCT 3'
Cebadores de la primera reacción TR/RCP Múltiple 3		
MPVH	Matriz 1S	5' GAG TCC TAY CTA GTA GAC AC 3'
	Matriz 1A	5' TTG TYC CTT GRT GRC TCC A 3'
BoVH	HBOV1F	5' CAC AGG AGC MGG AGY CGC AG 3'
	HBOV1R	5' CCA AGA TAT YTR TAT CCA GG 3'
	RSFAB51-	5' AGGTGTWGTACACCTGCATTRACACTRAATTC 3'
CI	RTS	5' GCTTGGGCGTGTCTCAAAATCT 3'
	RTA	5' GTCGCCACGGTTGATGAGAGCT 3'

Fuente: Coiras y cols., 2003; Coiras y cols., 2004; Acosta., 2012

Tabla 2. Condiciones de amplificación de la primera reacción de amplificación de los ensayos TR-RCP Múltiple.

	Temperatura	Tiempo	# de ciclos
Múltiple 1	48°C	45 min	1 ciclo
	95°C	15 min	1 ciclo
	94°C	30 seg	45 ciclos
	50°C	2 min	
	72°C	1 min	
	72°C	5 min	1 ciclo
4°C	Hasta que se retire del termociclador		
	Temperatura	Tiempo	No de ciclos
Múltiple 2	48°C	45 min	1 ciclo
	95°C	15 min	1 ciclo
	94°C	30 seg	45 ciclos
	55°C	1.30 min	
	72°C	1 min	
	72°C	5 min	1 ciclo
4°C	Hasta que se retire del termociclador		
	Temperatura	Tiempo	No de ciclos
Múltiple 3	45°C	45 min	1 ciclo
	95°C	5 min	1 ciclo
	95°C	30 seg	45 ciclos
	53°C	2 min	
	68°C	1 min	
	68°C	10 min	1 ciclo
4°C	Hasta que se retire del termociclador		

IV.4.2.2 Segunda reacción de amplificación de los ensayos TR-RCP Múltiple 1, Múltiple 2 y Múltiple 3.

Para la segunda reacción de amplificación de los ensayos Múltiple 1, Múltiple 2 y Múltiple 3, se agregaron 2µl del producto de la primera reacción a la mezcla de la reacción que consistió en 10 µL de tampón 5X [2 mM de MgCl₂ (Perkin-Elmer), 60 mM Tris-HCl (pH 8.5), 15 mM (NH₄)₂SO₄], 0,2 µM de cada dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, y dTTP) (Promega), 20 pmol/µL de cada cebador específico (tabla 3), 1.25 U de AmpliAq DNA Polymerase (Perkin-Elmer) y agua destilada estéril libre de nucleasas (Sigma) para un volumen final de 48 µL. Las condiciones de amplificación de la segunda reacción aparecen representadas en la tabla 2.

Tabla 3. Cebadores utilizados en la segunda reacción de amplificación de los ensayos TR-RCP múltiplex.

Cebadores de la RCP Anidada Múltiple 1		
Influenza A,B,C	NPAB3+	5' GATCAAGTGAKMGRRAGYMGRAAYCCAGG 3'
	NPC3+	5' AAATTGGAATTTGTTTCCTTTCAAGGGACA 3'
	NPAC4-	5' TCTTCAWATGCARSWSMAWKGCATGCCATC 3'
	NPB4-	5' CTTAATATGGAAACAGGTGTTGCCATATT 3'
AdVH	ADV2F+	5' CCCITTYAACCACCACCG 3'
	ADV2R-	5' ACATCCTTBCKGAAGTTCCA 3'
CI	NS	5' GGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGG 3'
	NA	5' AGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAG 3'
Cebadores de la RCP Anidada Múltiple 2		
VPIH1-4	3PIV13	5' ACGACAAYAGGAARTCATGYTCT 3'
	3PIV24	5' CYMAYGGRTGYAYTMGAATWCCATCATT 3'
	4PIV1	5' GACAACAATCTTTGGCCTATCAGATA 3'
	4PIV3	5' GAGTTGACCATCCTYCTRTCTGAAAAC 3'
	4PIV2	5' GCTAGATCAGTTGTGGCATAATCT 3'
EV	4PIV4	5' TGACTIONRCTCGACYTTRAAATAAGG 3'
RV	HER3	5' ACCRASTACTTTGGGTRWCCGTG 3'
CoVH	HER4	5' CTGTGTTGAWACYTGAGCICCCA 3'
OC43,229 E	3HCoV	5' TTGTGCGCAATGTTATAAWGGYAT 3'
	4HCoV	5' GATAARTGAGTRCCATTWCCACA 3'
CI	NS	5' GGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGG 3'
	NA	5' AGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAG 3'
Cebadores de la RCP Anidada Múltiple 3		
MPVH	Matriz 2S	5' GCRGCIATGTCTGTACTIONTCC 3'
	Matriz 2A	5' TCTTGCAKATYYTRCTKATGCT 3'
BoVH	HBOV2F	5' GTGGTGTGGGTTCTACTIONTGGC 3'
	HBOV2R	5' CTACGGTACACATCATCCAG 3'
VSRH A	RSFA8+	5' TTATACTIONCAACAATRCCAAAAAWACC 3'
	RSFA10 -	5' AAATCCCTGGTAATCTCTAGTAGTCTGT 3'
VSRH B	RSFB112+	5' ATCTTCTAACTIONCTTGCTRTTAATGCATTG 3'
	RSFB133B-	5' GATGCGACAGCTCTGTTGATTTACTIONATG 3'
CI	NS	5' GGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGG 3'
	NA	5' AGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAG 3'

Fuente: Coiras y cols., 2003; Coiras y cols., 2004; Acosta., 2012

IV.4.2.3 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) teñido 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 4.

Tabla 4. Longitud de los productos de amplificación para cada uno de los virus investigados y el control interno en las reacciones anidadas.

	Virus	Longitud (pb)
Múltiple 1	Influenza A	301 pb
	Influenza B	226 pb
	Influenza C	111 pb
	AdVH	181 pb
Múltiple 2	VPIH-1	439 pb
	VPIH-2	297 pb
	VPIH-3	390 pb
	VPIH-4	174 pb
	RV	110 pb
	EV	226 pb
	CoVH-OC43	587 pb
	CoVH- 229E	630 pb
Múltiple 3	VS RH A	363 pb
	VS RH B	611 pb
	MPVH	486 pb
	BoVH	243 pb
	CI	887 pb

Fuente: Coiras y cols., 2003, Coiras y cols., 2004, Pozo y cols., 2007

Los procedimientos para la 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 (191).

Criterios para la interpretación del resultado:

- Muestra negativa: Solo se visualizó el producto de amplificación correspondiente con la longitud del CI (tabla 4).
- Muestra positiva: Se visualizaron productos de amplificación correspondiente con la longitud del CI y uno o más de los virus estudiados (tabla 4).
- Muestra inhibida: No se visualizó producto de amplificación correspondiente al CI.

IV.5 Subtipado del virus Influenza A (H3) mediante TR-RCP anidada para la amplificación de un segmento del gen de la HA.

El protocolo designado empleó cebadores para la amplificación del gen completo de la HA (192). Los mismos estuvieron representados por PHA1+ positivo: 5'- GGG GTT AGC AAA AGC AGG RG-3' complementario a los primeros 9 nucleótidos de este extremo y PHA1-negativo: 5'-CAW CCR KCI AYC AKI CCW KIC CAI CC-3' complementario a los últimos 13 nucleótidos. Ambos se utilizaron a una concentración de 5 pmol/ μ L. 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 μ L 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 personnel (Eppendorf).

En la RCP anidada, se emplearon los 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 (H3): H3+SSEQ positivo: 5'-GACACCATGCAGTGCCAA-3' localizado entre los nucleótidos 124 y 141; H3-ASEQ negativo: 5'-CCCTCCCAACCATTTTCTAT-3' localizado entre los nucleótidos 1092 y 1111 publicados previamente (192). Los mismos se emplearon a una concentración de 10 pmol/ μ L. Para llevar a cabo la reacción de amplificación anidada,

se tomaron 2 μ L 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 personnel (Eppendorf).

Controles.

- Control positivo: Consistió en 10 copias de productos clonados en el vector pGEM-T (Promega) de cepas prototipos de virus influenza A (H3), donados por el Laboratorio Nacional de gripe y virus respiratorios del Instituto de Salud Carlos III (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 (191).

IV.5.1 Detección de los productos de amplificación.

La detección de los productos amplificados se realizó mediante el procedimiento descrito en el acápite IV.4.2.3.

Criterios para la interpretación de los resultados.

- La interpretación de los resultados se realizó teniendo en cuenta los criterios descritos en el acápite IV.4.2.3.
- La longitud del producto de amplificación mediante el ensayo descrito previamente es de 1100 pb (192).

IV.6 TR-RCP en tiempo real para el diagnóstico de influenza A (H1N1)pdm09.

Para la detección de un segmento del genoma del virus influenza A (H1N1)pdm09, el ácido nucleico extraído se procesó de acuerdo al protocolo de RCP en tiempo real desarrollado por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta, EUA (CDC, siglás del inglés Center for Diseases Control) (193).

A cada tubo que contenía la mezcla de la reacción se le adicionaron 5 μ L 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.

Tabla 5. Cebadores y sondas para el desarrollo del protocolo de RCP en tiempo real para la detección del virus de influenza A (H1N1)pdm09.

Cebadores y sondas	Proteína diana	Secuencia de cebadores y sondas
Influenza A Universal positivo	M	GACCRATCCTGTCACCTCTGAC
Influenza A Universal negativo	M	AGGGCATTYTGACAAAKACGTCTA
Influenza A Universal sonda		FAM-GCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG-BHQ1
Influenza A Universal porcina Positivo	HA	GCACGGTCAGCACTTATYCTRAG
Influenza A Universal porcina Negativo	HA	GTGRGCTGGGTTTTTCATTTGGTC
Influenza A Universal porcina Sonda		FAM-YACTGCAAGCCCATACACACAAGAGG CA-BHQ1
Influenza A porcina (H1) 2009 positivo	HA	GTGCTATAAACACCAGCCTYCCA
Influenza A porcina (H1) 2009 negativo	HA	CGGGATATTCCTTAATCCTGTRCG
Influenza A porcina (H1) 2009 sonda		FAM-CAGAATATACATCCRGTCACAATTGGA RAA-BHQ1
Rnasa P Positivo	Rnasa P	AGATTTGGACCTGCGAGCG
Rnasa P Negativo	Rnasa P	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT
Rnasa P Sonda		FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ1

Fuente: WHO, 2009.

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 37 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 37 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 (191).

IV.7 Recolección, procesamiento y análisis estadístico de la información.

Los datos clínicos y demográficos se tomaron del modelo para la colecta de muestras. Dichos elementos fueron recogidos en una base de datos en Microsoft Excel para análisis posterior. Los datos se mostraron en tablas y figuras. Para determinar la posible relación de los virus respiratorios circulantes con la IRAG según las características clínicas y demográficas de la población objeto de estudio, se aplicó la prueba Chi-Cuadrado de Pearson utilizando el programa SPSS versión 19. Se consideraron valores significativos de $p \leq 0.05$ con un Intervalo de confianza (IC) de un 95 %.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**V.1 Identificación de los diferentes virus respiratorios en la etiología de las IATRI**

Las IATRI son la principal causa de hospitalización a nivel mundial particularmente en lactantes y en niños menores de 5 años de edad en los países en vías de desarrollo. Dentro de estas infecciones, las que afectan el tracto respiratorio inferior resultan ser clínicamente más severas y se le atribuyen 3,5 millones de muertes anuales a nivel mundial (44). Aunque son varios los agentes etiológicos involucrados, los virus son diagnosticados con mayor frecuencia en este tipo de infección (194).

En el período comprendido entre mayo del año 2012 y junio del año 2013 se estudiaron un total de 1604 muestras clínicas respiratorias (1574 ENF y 30 AB), procedentes de pacientes hospitalizados, con edades comprendidas entre 5 días y 105 años y con diagnóstico clínico de IATRI, de posible etiología viral. Las mismas se procesaron mediante el algoritmo de diagnóstico molecular establecido en los LNR para los virus influenza y otros virus respiratorios del IPK. Considerando la edad de los pacientes, las muestras clínicas estudiadas procedentes de los mismos se dividieron en 5 grupos de edades (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución de las muestras clínicas por grupos de edades en el período comprendido entre mayo 2012 y junio 2013.

Grupos de edades	No de muestras	%
<1 año	448	27.93
1- 4 años	378	23.56
5- 14 años	204	12.71
15- 59 años	331	20.64
60 años y más	243	15.14
Total	1604	

Fuente: LNR, IPK

En el análisis de las muestras procesadas según los grupos de edades, se observó que el mayor porcentaje correspondió al grupo <1 año de edad (27.93%). No es sorprendente que el 51.49% de las muestras pertenecieron a niños menores de 5 años de edad, ya que es conocido que en este grupo de población pediátrica se detectan los mayores índices de morbilidad por IRA (195). Con relación al diagnóstico clínico presuntivo se comprobó que el 83.66% ($n=1342$) de las muestras procedieron de pacientes con IRAG (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución de las muestras según el diagnóstico clínico en el período comprendido entre mayo 2012 y junio 2013.

Tipo de diagnóstico clínico	No de muestras	%
IRAG*	1342	83.66
Laringitis	10	0.62
Laringotraqueobronquitis	7	0.43
Bronquitis	36	2.24
Bronquiolitis	209	13.02
Total	1604	

Leyenda: *Infección Respiratoria Aguda Grave

Fuente: LNR, IPK

La aplicación de varios ensayos de diagnóstico molecular, permitió identificar un segmento del genoma, para uno de los virus respiratorios investigados en el 46.75% (750/1604) de las muestras clínicas estudiadas. Resultados similares se encontraron en diferentes estudios donde el rango de detección fue entre un 36% y un 58% (10, 196-198). El alto porcentaje de positividad a los virus respiratorios confirman que estos son los agentes etiológicos de una proporción notable de los casos de IATRI.

Los RV fueron los agentes identificados con mayor frecuencia (28.93%), seguido de los virus influenza (25.85%) y del VSRH (20.13%). Estos resultados coinciden con los encontrados por Goka y colaboradores (199). Por otro lado, la positividad a los virus respiratorios en Inglaterra en el período 2002-2008, demostró que los agentes predominantes fueron los virus influenza y el VSRH (200). Estudios de metanálisis, identificaron en orden de frecuencia al VSRH, seguido de los RV y de los virus influenza asociados a altas tasas de hospitalización (11, 201, 202). Los VPIH, el BoVH, los EV, los AdvH y el CoVH-229E también se detectaron (Tabla 8). Estos resultados demostraron que múltiples patógenos están asociados a un cuadro clínico similar y la confirmación del agente etiológico definitivo solo es posible a través del diagnóstico de laboratorio.

Tabla 8. Positividad a los virus investigados según diagnóstico clínico en el período comprendido entre mayo 2012 y junio 2013.

Agente/Diag	IRAG*	Bronquiolitis	Laringitis	CRUP	Bronquitis Aguda	Total (%)
RV	170	33	1	2	11	217(28.93)
VPIH¹	69	9	3	1	2	84 (11.2)
VSRH²	69	80	0	0	2	151(20.13)
MPVH	18	2	0	0	0	20 (2.66)
FA³	115	5	0	1	4	125(16.66)
FB	67	0	0	0	1	68 (9.06)
FC	1	0	0	0	0	1 (0.13)
EV	25	1	1	0	0	27 (3.6)
BoVH	28	4	0	0	1	33 (4.4)
AdVH	13	0	0	0	2	15 (2.0)
CoVH 229E	8	1	0	0	0	9 (1.2)
TOTAL	583	135	5	4	23	750

Leyenda: *Infección Respiratoria Aguda Grave, ¹Incluye los virus parainfluenza 1 al 4, ²Incluye los virus sincitial respiratorio A y B, ³Incluye los virus influenza A (H3N2) e influenza A (H1N1) pdm09.

Fuente: LNR, IPK

El papel de los RV en las infecciones respiratorias se ha subestimado, porque hasta hace sólo unos años los métodos de diagnósticos clásicos para la detección de virus respiratorios, eran poco sensibles. Estos agentes tras su descripción inicial, se asociaron con infecciones respiratorias leves como el catarro común y se consideraron virus con poco significado clínico (203). Sin embargo, con el desarrollo de las técnicas de diagnóstico molecular se ha ampliado el espectro de las manifestaciones clínicas producidas por estos agentes. La aplicación de estas técnicas ha demostrado que los RV son uno de los virus más frecuentes en las IATRI, que incluso pueden resultar fatales (204-206).

En este estudio la detección de los RV como el patógeno predominante coincide con resultados obtenidos por diferentes investigadores. Arden y colaboradores en Australia encontraron a este agente en el 37.8% de los pacientes con diagnóstico de IATRI (207). Otro estudio realizado en Holanda, por un grupo de investigadores, encontraron a los RV como el agente más común en los pacientes hospitalizados (197). Más recientemente, un estudio realizado en pacientes inmunocomprometidos hospitalizados, demostró que los RV se detectaron en el 40% de los pacientes con IATRI (208).

La detección de los RV en Cuba se reportó por primera vez por Savón y colaboradores. Aunque el estudio se realizó con un número limitado de muestras, este virus se identificó en el 11% de los niños menores de 1 año de edad con cuadros de bronquiolitis (209). A estos resultados, se suman los encontrados en la presente investigación, donde

el RV fue el agente que se diagnosticó con una elevada frecuencia en todos los grupos de edades, con diferentes tipos de IATRI (Figura 1). Estos resultados apoyan el papel patogénico de este virus en la etiología de las IATRI.

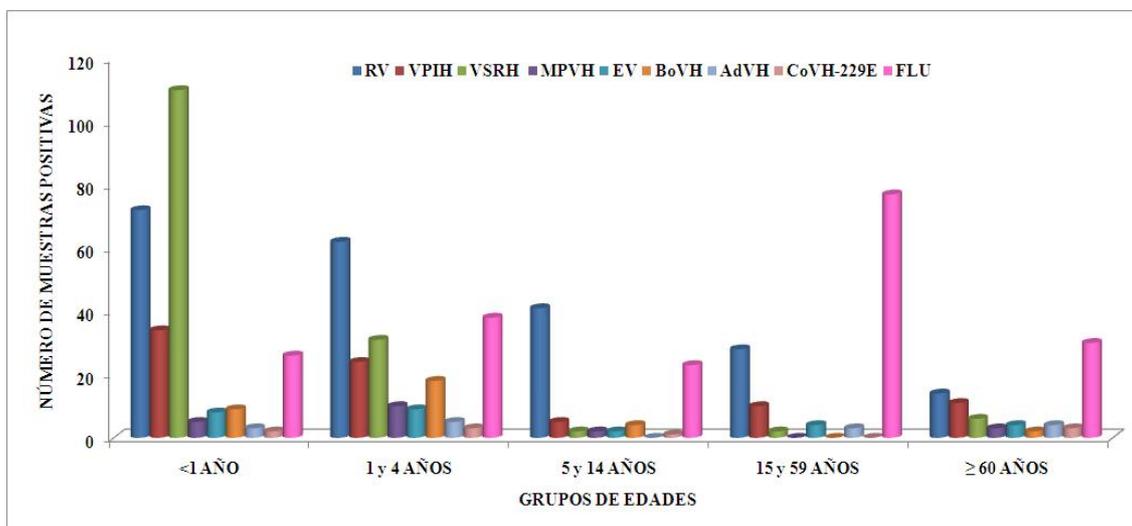


Fig.1 Distribución de patógenos virales identificados en todos los grupos de edades.

Los virus influenza estacionales (influenza A(H3N2), influenza A(H1N1) e influenza B) son los causantes de una enfermedad infecciosa aguda, poseen una elevada transmisibilidad y originan epidemias estacionales a nivel mundial (210). Estos virus se asocian con una elevada morbilidad y mortalidad, principalmente en niños menores de 5 años y en adultos ≥ 65 años de edad que constituyen grupos prioritarios para la aplicación anual de la vacunación (211). Sin embargo, en este trabajo los virus influenza predominaron en los pacientes comprendidos en el grupo de edad entre 15 y 59 años (Figura 1). Resultados similares a los nuestros se encontraron en un estudio de vigilancia realizado en Brasil en un período de 10 años (1). Dangi y colaboradores en el período postpandémico (2010-2012) en la India detectaron a estos virus como los predominantes en este mismo grupo de edad (212). Un estudio reciente en Corea del Sur evidenció la mayor positividad a los virus influenza en el grupo de edad de 19 a 64 años (213). Este resultado podría estar relacionado con el hecho de que el virus influenza más representado en las muestras positivas fue el influenza A (H1N1)pdm09 para el cual se ha descrito desde su emergencia que afecta principalmente a las personas entre 15 y 59 años (214, 215).

Una posible explicación al hallazgo mencionado previamente estaría relacionada con que en este grupo se encuentra el mayor número de personas que no están incluidas en

los grupos priorizados para la vacunación anti-influenza. Por otro lado existen resultados documentados sobre la alta incidencia y carga de enfermedad por influenza en la población adulta (216).

El VSRH es el patógeno más importante que causa IATRI en lactantes y niños menores de cinco años, con diagnóstico clínico de bronquiolitis y neumonía (200, 217). En este estudio, este agente causó un elevado número de IATRI principalmente en los niños menores de un año de edad (Figura 1). Tomando en cuenta el diagnóstico clínico estuvo presente en el 52.98% de los pacientes con bronquiolitis y el 45.70% de los diagnosticados con IRAG.

A pesar de que en Cuba no existen estudios sobre la carga de la infección por el VSRH en la población pediátrica, investigaciones previas llevadas a cabo por los LNR para los virus influenza y otros virus respiratorios del IPK, evidenciaron la circulación de ambos subgrupos antigénicos del VSRH asociados a altos índices de morbilidad y una relación filogenética estrecha con cepas de este virus circulantes a nivel mundial (218, 219).

Resulta importante destacar que en la literatura existen numerosos artículos en los que se estudia la etiología de las IATRI en pacientes pediátricos y son diferentes en lo que se refiere a la variedad de agentes investigados, la estación en la que se realiza el estudio, el año en cuestión, el método de diagnóstico empleado, las definiciones de caso y el diseño de la investigación (4, 220, 221). Sin embargo, son escasos los que incluyen todos los grupos de edades y un espectro extenso de agentes, por esta razón se hace difícil establecer comparaciones de nuestros resultados.

V.2 Relación de la positividad a virus respiratorios circulantes en pacientes con IRAG según las características clínicas y demográficas.

El Programa Mundial y Regional de vigilancia de Influenza ha orientado diferentes estrategias de vigilancia a los países. Las más recientes de ellas: Estándares globales de vigilancia epidemiológica de influenza, OMS (2012-2014) y Actualización de la Guía Operativa de Vigilancia de IRAG, OPS (2013-2014) enfatizan en la necesidad de homogenizar los resultados de la vigilancia de las IRAG, basados en una definición de caso globalizada para identificar eventos inusitados asociados a los virus influenza (2, 222, 223). Como ventaja principal de dichas estrategias, se identifica la posibilidad de fortalecer la vigilancia de otros virus respiratorios, utilizando la plataforma base para los virus influenza que ha documentado que a nivel global las epidemias anuales por estos

virus están asociadas con incrementos substanciales en las hospitalizaciones y muertes por IRAG (202, 224, 225).

El Programa Nacional Integral de Prevención y Control de las IRA en Cuba en su actualización en el 2013, incorpora la definición de caso de IRAG en su estrategia de vigilancia (226, 227). La identificación de la participación de diferentes virus respiratorios aporta datos valiosos para planificar intervenciones oportunas que minimizan el impacto de los eventos epidemiológicos asociados a estos agentes sobre los sistemas de salud.

De las 1604 muestras procesadas, 1342 resultaron ser colectadas de pacientes con IRAG. El 43.44% ($n=583$) de las mismas resultaron positivas a uno de los virus identificados y los diagnósticos clínicos presentes fueron neumonía (326) y bronconeumonía (257) (tabla 9).

Tabla 9. Positividad a los virus investigados en las muestras de pacientes con IRAG en el período comprendido entre mayo 2012 y junio 2013.

Agente viral	No de muestras positivas según diagnóstico clínico de IRAG		
	neumonía	bronconeumonía	Total (%)
RV	108	62	170 (29.16)
VPIH	41	28	69 (11.84)
VSRH	31	38	69 (11.84)
influenza A*	60	55	115 (19.73)
influenza B	40	27	67 (11.49)
influenza C	0	1	1 (0.17)
MPVH	7	11	18 (3.09)
EV	14	11	25 (4.29)
BoVH	16	12	28 (4.80)
AdVH	5	8	13 (2.22)
CoVH-229E	4	4	8 (1.37)
Total	326	257	583

Leyenda: * Incluidas 111 muestras positivas a FAH1pdm09 y 4 FAH3

Fuente: LNR, IPK

Los virus detectados con mayor frecuencia en los pacientes con IRAG fueron los virus influenza ($n=183$, 31.83%) y se demostró asociación significativa (OR 6.437; 95% IC: 3.407-12.159; $p=0,000$). Resultados similares se encontraron en un estudio realizado en seis hospitales en Kentucky, donde identificaron a los virus influenza como los principales agentes causantes de neumonía en pacientes hospitalizados en las UCI (32). Otro estudio en China, demostró que el virus de influenza A estaba presente en el 42.0%

(92/219) de las infecciones virales severas (228). En Kenya y Guatemala se realizó un estudio entre agosto del 2009 y julio del 2011 en pacientes hospitalizados con IRAG, donde los investigadores encontraron asociación significativa entre los virus influenza y la infección respiratoria severa (229). En Cuba existen datos publicados sobre el incremento en el índice de hospitalizaciones debidas a las IRAG durante el enfrentamiento de la influenza pandémica 2009 (230). No resultan sorprendentes esos hallazgos si se toma en cuenta que en el período estudiado circulaba un virus influenza nuevo causante de la primera pandemia del presente siglo. Hasta el momento de concluir la investigación actual, no encontramos artículos cubanos relacionados con el estudio en períodos interpandémicos de la asociación de los virus influenza con la IRAG. Los resultados obtenidos serán valiosos para estimar la carga de IRAG por virus influenza en Cuba, para la toma de decisiones en relación con la necesidad de perfeccionar las estrategias de prevención y control, particularmente la prioridad a la sostenibilidad e incremento del programa de vacunación anti-influenza.

De un total de 583 muestras procedentes de pacientes con IRAG positivas a uno de los virus respiratorios identificados, el 50.77% ($n=296$) perteneció al sexo femenino con un OR 1.618; 95% IC: 1.139-2.299; $p=0,007$. En la literatura consultada no encontramos investigaciones previas con resultados comparables con los obtenidos en este estudio. En este sentido consideramos que podría tratarse de un hallazgo preliminar y que para profundizar sobre esta asociación significativa son necesarios estudios futuros con un número mayor de pacientes.

Cuando analizamos los grupos de edades de los pacientes con IRAG se demostró que el grupo con mayor riesgo fue el de mayores de 60 años con un OR 12.180; 95% IC: 2.958-50.49, sin embargo, no se encontró asociación significativa con ninguno de los agentes virales identificados. Es conocido que los adultos mayores constituyen uno de los principales grupos vulnerables para el desarrollo de las IRA complicadas que requieren hospitalización (231). En los pacientes <1 año con IRAG se encontró asociación significativa con la detección del VSRH ($p=0.000$), en los de 1- 4 años con el MPVH ($p=0.022$) y el BoVH ($p=0.001$), en los de 5-14 con los RV ($p=0.000$) y en la población de 15-59 años con los virus influenza ($p=0.000$). Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Distribución de los virus respiratorios según los grupos de edades en las muestras de pacientes con IRAG.

	<1 AÑO	1 y 4 AÑOS	5 y 14 AÑOS	15 y 59 AÑOS	≥60 AÑOS	Total
RV	41	54	37*	25	13	170
VPIH	22	22	5	9	11	69
VSRH	38*	24	1	0	6	69
MPVH	3	10*	2	0	3	18
FLU	22	37	21	73*	30	183
EV	6	9	2	4	4	25
BoVH	5	17*	4	0	2	28
AdVH	3	5	0	2	3	13
CoVH-229E	1	3	1	0	3	8
Total	141	181	73	113	75	583

Leyenda: * $p \leq 0,05$

Fuente: LNR, IPK.

En la literatura existen reportes de que los virus influenza y el VSRH son causantes de neumonía en los pacientes mayores de 60 años, sin embargo, en el presente estudio esto no se demostró (19, 232-234). Suzuki y colaboradores, encontraron que los virus más frecuentes fueron los RV (30.5% [250/819]), seguido del VSRH (24.1% [198/819]) en niños hospitalizados con neumonía severa (235). En Alemania, un grupo de investigadores detentaron que el MPVH fue el virus de mayor prevalencia en niños de entre 0 y 4 años hospitalizados (236). En un estudio de vigilancia de los virus influenza en Rwanda, se asoció a estos con el 10.4% (101/971) de los casos de IRAG principalmente en pacientes entre 14 y 49 años de edad (237). En Bangladesh en el 2010, la incidencia de IRAG en niños menores de 5 años se asoció con el VSRH y el VPIH-3 (238). Como se puede apreciar estos resultados son coincidentes con los del presente trabajo, a pesar de que solo van dirigidos a un grupo de edad determinada, a diferencia del nuestro que abarca a todos los grupos de edades.

Los síntomas clínicos respiratorios que más se presentaron en los pacientes con IRAG fueron: fiebre, tos, disnea, expectoración, rinorrea y amigdalitis (tabla 11). Al analizar estos datos, pudimos demostrar asociación significativa entre la IRAG y la presencia de fiebre ($p=0.000$). En un grupo de pacientes hospitalizados con IRAG en Chicago, se detectó que los síntomas clínicos más frecuentes fueron la fiebre, la tos y la disnea, principalmente en aquellos a los que se les diagnosticó infección por el virus de influenza A (208). En relación a este resultado debemos resaltar que la IRAG es una definición de caso elaborada por un grupo de expertos de la OMS, con el objetivo de

priorizar la vigilancia de Influenza en aquellas personas con enfermedad respiratoria severa, que necesitan hospitalización para un tratamiento específico. Cuando los datos del número de hospitalizaciones por IRAG, se combinan con un resultado confirmatorio del laboratorio, esta vigilancia contribuye a conocer la carga de la enfermedad por los virus influenza. Así como, completar el conocimiento sobre el espectro clínico de la Influenza, profundizar en su epidemiología y detectar oportunamente cambios de sus características clínicas y epidemiológicas (239).

Tabla 11. Características clínicas de los pacientes con IRAG.

Síntomas clínicos	No de pacientes
FIEBRE	454 (p=0.000)
TOS	531
DISNEA	381
EXPECTORACIÓN	214
RINORREA	209
AMIGDALITIS	6

Fuente: LNR, IPK.

En la literatura médica se describe que la fiebre es el signo clínico más común en la infección por los virus influenza. El mismo está presente en más del 90% de los casos, aunque otros como la tos no productiva (>80%), congestión nasal o rinorrea (>80%), cefalea, amigdalitis no exudativa y otras síntomas generales también están presentes (240).

Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, no son sorprendentes los resultados sobre la detección de los virus influenza como principales agentes causantes de IRAG y con la fiebre como signo clínico más significativo. Se demuestra el beneficio de esta definición de caso para ser utilizada por los programas de vigilancia de influenza de los Ministerios de Salud.

V.3 Patrón de circulación de los virus influenza asociados a muestras recibidas de pacientes con IRAG durante el período de estudio.

De un total de 1342 muestras de pacientes con IRAG, 183 resultaron positivas a los virus influenza (111 influenza A (H1N1)pdm09, 4 influenza A (H3N2) y 67 influenza B). En este estudio, la circulación de los virus influenza se detectó durante todo el año. El virus influenza B circuló principalmente entre los meses de mayo a septiembre del año 2012, con un pico máximo de incidencia en el mes de julio. Durante el 2013, el virus influenza A (H1N1)pdm09 predominó en la circulación y se detectó un

incremento de la positividad entre los meses de abril a junio. Ambos agentes cocircularon durante el período de estudio. El virus influenza A (H3N2) se detectó esporádicamente (Figura 2).

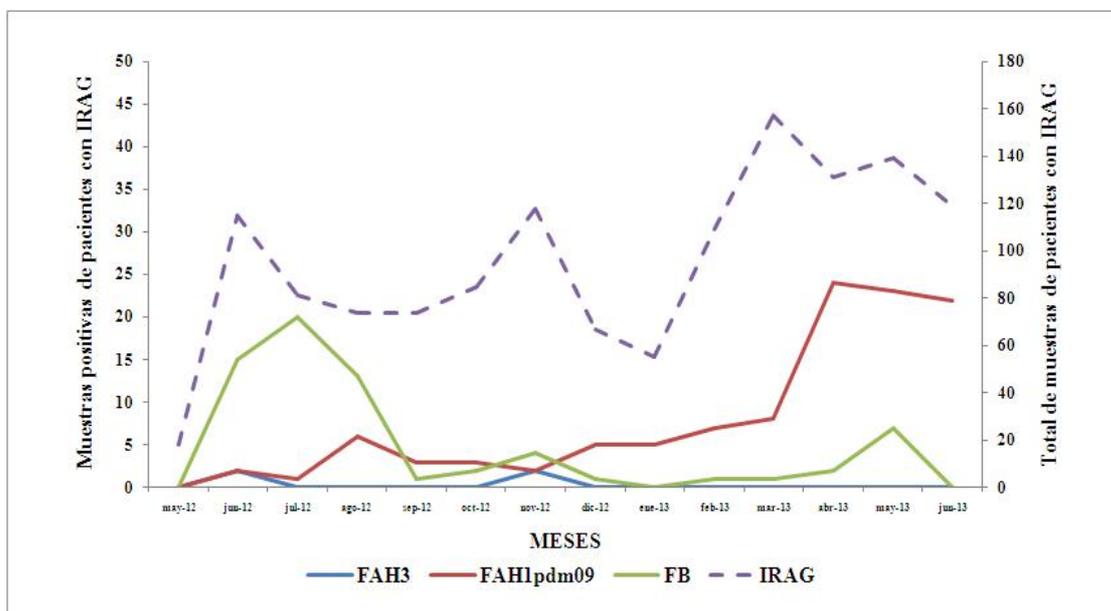


Fig.2. Circulación de los virus influenza asociados a IRAG en el período estudiado.

Fuente: LNR, IPK.

Es conocido que anualmente los virus influenza circulan en todo el mundo ocasionando brotes y epidemias que pueden experimentar variaciones estacionales asociadas a variables climatológicas (241). Los virus influenza A predominan en la mayoría de las estaciones ocasionando altas tasas de hospitalización, aunque están diagnosticadas epidemias por virus influenza B (242, 243). Los períodos de incremento en la circulación de los virus influenza detectados en el presente estudio coinciden con los meses de la estación lluviosa en nuestro país lo que no difiere de lo descrito para los países tropicales y subtropicales (212, 244, 245).

Como se puede observar en la figura 2, ambos picos de incrementos de la positividad a los virus influenza se asociaron con aumentos en la recepción de muestras de pacientes con IRAG. Entre los meses de septiembre y diciembre del año 2012 el aumento en la recepción de muestras de pacientes con IRAG estuvo asociado a la circulación predominante del VSRH, que causó un elevado número de ingresos principalmente en niños menores de 2 años (datos no mostrados). En relación a este resultado, es importante mencionar que una limitación del estudio, está dada por el hecho de que no se asoció los datos de la positividad a los virus influenza con la información sobre el

número de hospitalizaciones por IRAG, lo que hubiese permitido arribar a conclusiones preliminares sobre la carga de enfermedad por Influenza. No obstante, debemos señalar que en la actualidad en las estadísticas semanales de salud se recoge el dato de los ingresos por IRAG en las UCI y no el total de los hospitalizados, por lo que estaría ausente el número de pacientes con IRAG que pudiesen estar ingresados en otro servicio.

En un estudio realizado en la India durante el período post pandémico (agosto 2010-septiembre 2012), se demostró que la positividad a influenza se mantuvo durante todo el año, pero los patrones de circulación de los virus influenza A y B variaron notablemente. En el 2010 el 100% de la positividad a los virus influenza correspondió al subtipo de influenza A (H1N1)pdm09. En el año 2011 se reemplazó por los virus estacionales de influenza A (H3N2) y en el 2012 influenza A (H1N1)pdm09 lo desplazó para predominar nuevamente (214). En los países de clima templado durante el período 2012-2013, se detectó un incremento de la actividad de los virus influenza A y B. En Europa la circulación de A (H1N1)pdm09 fue mayor que la de A (H3N2), sin embargo, en los Estados Unidos y Canadá predominó el virus A(H3N2) (246). En región del Caribe y América Central predominó la circulación del virus influenza A (H1N1)pdm09 (247).

En la actualidad la OMS recomienda que los Estados miembros continúen sus esfuerzos con la actualización de los Programas de vigilancia apoyándose en las guías propuestas y que permiten detectar cualquier comportamiento inusual de los virus influenza ante la emergencia de un nuevo virus (248).

Los resultados presentados en este estudio permiten esclarecer la contribución específica de los diferentes virus respiratorios en la etiología de las IATRI. En el contexto actual del Programa Regional y Mundial de vigilancia de la Influenza aporta información valiosa para el país y la región al evidenciar la carga de los virus influenza en la vigilancia de las IRAG. Al mismo tiempo demuestra la necesidad del esfuerzo de los países por sostener la vacunación anual anti-influenza como principal medida de prevención y control.

VI. CONCLUSIONES

- Los RV fueron los agentes identificados con mayor frecuencia, seguido de los virus influenza y del VSRH, demostrando el papel patogénico de estos agentes en los pacientes con diagnóstico de IATRI.
- La asociación significativa de la positividad a los virus influenza con los diagnósticos clínicos de neumonía y bronconeumonía durante el período de estudio confirma a estos agentes como los principales a tomar en cuenta en la etiología de las IRAG.
- Los patógenos virales involucrados en la etiología de las IRAG varían dependiendo del grupo de edad lo que evidencia la necesidad de disponer en los protocolos de actuación en las instituciones de salud de medidas específicas de manejo de casos.
- El hallazgo significativo de la fiebre en los pacientes con IRAG apoya su utilidad como signo mayor de la definición de caso sugerida por la OMS para ser empleada por los programas de vigilancia de los virus influenza.
- Durante el período estudiado los virus influenza circularon en Cuba a través de todo el año, con dos picos de incremento en la positividad asociados a los virus influenza B y virus influenza A (H1N1)pdm09, ocasionando aumentos en la recepción de muestras de pacientes con IRAG.
- Los resultados de esta investigación alertan a los programas nacionales la necesidad de centralizar los esfuerzos de la vigilancia en los pacientes con IRAG para la identificación oportuna de eventos de salud inusitados por los virus influenza.

VII. RECOMENDACIONES

- Ampliar el estudio a un período de 3 a 5 años con el objetivo de obtener conclusiones determinantes sobre la estacionalidad de los virus influenza.
- Emplear estos resultados para el diseño y ejecución de un estudio de estimación de carga de enfermedad por los virus influenza
- Realizar una investigación sobre la evaluación de la efectividad de la vacuna de Influenza empleando el análisis de la vigilancia de IRAG.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Freitas FT. Sentinel surveillance of influenza and other respiratory viruses, Brazil, 2000-2010. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2013 Jan-Feb;17(1):62-8.
2. OPS/OMS. Protocolo de vigilancia intensificada de IRAG. 2011.
3. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clinical microbiology reviews*. 2010 Jan;23(1):74-98.
4. Kwofie TB, Anane YA, Nkrumah B, Annan A, Nguah SB, Owusu M. Respiratory viruses in children hospitalized for acute lower respiratory tract infection in Ghana. *Virology journal*. 2012;9:78.
5. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;6(102 (36)):12891-6.
6. Arden KE, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. New human coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia. *Journal of medical virology*. 2005 Mar;75(3):455-62.
7. Calza L, Manfredi R, Verucchi G, Chiodo F. [SARS: a new emergency in the world health]. *Recenti progressi in medicina*. 2003 Jul-Aug;94(7-8):284-94.
8. Woo P, Lau S, Chu C, Chan K, Tsoi H, Haung Tea. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of virology*. 2005;79:884-95.
9. Lu G, Hu Y, Wang Q, Qi J, Gao F, Li Y, et al. Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26. *Nature*. 2013 Aug 8;500(7461):227-31.
10. Li H, Wei Q, Tan A, Wang L. Epidemiological analysis of respiratory viral etiology for influenza-like illness during 2010 in Zhuhai, China. *Virology journal*. 2013;10:143.
11. Nair H, Brooks WA, Katz M, Roca A, Berkley JA, Madhi SA, et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2011 Dec 3;378(9807):1917-30.

12. Turner P, Turner C, Watthanaworawit W, Carrara V, Cicelia N, Deglise C, et al. Respiratory virus surveillance in hospitalised pneumonia patients on the Thailand-Myanmar border. *BMC infectious diseases*. 2013;13:434.
13. Loh TP, Lai FY, Tan ES, Thoon KC, Tee NW, Cutter J, et al. Correlations between clinical illness, respiratory virus infections and climate factors in a tropical paediatric population. *Epidemiology and infection*. 2011 Dec;139(12):1884-94.
14. Shek LP, Lee BW. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. *Paediatric respiratory reviews*. 2003 Jun;4(2):105-11.
15. Fang Tang L, Lin Wang T, Feng Tang H, Min Chen Z. Viral Pathogens of Acute Lower Respiratory Tract Infection in China. *Indian pediatrics*. 2008;45:971-5.
16. Calvo C, Garcia-Garcia ML, Blanco C, Pozo F, Flecha IC, Perez-Brena P. Role of rhinovirus in hospitalized infants with respiratory tract infections in Spain. *The Pediatric infectious disease journal*. 2007 Oct;26(10):904-8.
17. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *The New England journal of medicine*. 2005 Apr 28;352(17):1749-59.
18. Jennings LC, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Laing RT, Werno AM, et al. Incidence and characteristics of viral community-acquired pneumonia in adults. *Thorax*. 2008 Jan;63(1):42-8.
19. Falsey AR, McElhaney JE, Beran J, van Essen GA, Duval X, Esen M, et al. Respiratory Syncytial Virus and Other Respiratory Viral Infections in Older Adults With Moderate to Severe Influenza-like Illness. *The Journal of infectious diseases*. 2014 Jan 29.
20. 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. *Journal of virological methods*. 2005 Jun;126(1-2):53-63.
21. Iwane MK, Edwards KM, Szilagyi PG, Walker FJ, Griffin MR, Weinberg GA, et al. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and parainfluenza viruses among young children. *Pediatrics*. 2004 Jun;113(6):1758-64.
22. Peltola V, Ruuskanen O. Respiratory Viral Infections in Developing Countries: Common, Severe, and Unrecognized. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;46:58-60.

23. Bonvehí P, Nacinovich F. Vacunas para la prevención de enfermedades respiratorias de alto impacto. Sociedad Argentina de Infectología. 2012.
24. Deutscher M, Beneden CV, Burton D, Shultz A, Morgan OW, Chamany S, et al. Putting surveillance data into context: the role of health care utilization surveys in understanding population burden of pneumonia in developing countries. *Journal of epidemiology and global health*. 2012 Jun;2(2):73-81.
25. MINSAP. Anuario Estadístico de Salud. República de Cuba. 2012.
26. Savon Valdes C, Goyenechea Hernandez A, Oropesa Fernandez S, Valdes Ramirez O, Acosta Herrera B, Gonzalez Munoz G. Manual de procedimientos para el diagnostico de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiologia viral. Organizacion Mundial de la Salud, Organizacion Panamericana de la salud Area de Tecnologia y Prestacion de Servicios de Salud, Unidad de Medicamentos Esenciales, Vacunas y Tecnología de Salud Servicios de laboratorio y sangre Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. 2003.
27. MINSAP. Programa Integral de Atención y Control de las IRA. Ministerio de Salud Pública República de Cuba. 2000.
28. Rodrigo C, Almirante B. Viriasis respiratorias. *Medicina Interna*, 15ª ed Madrid: Harcourt. 2004:2481-9.
29. Singh AK, Jain A, Jain B, Singh KP, Dangi T, Mohan M, et al. Viral aetiology of acute lower respiratory tract illness in hospitalised paediatric patients of a tertiary hospital: One year prospective study. *Indian journal of medical microbiology*. 2014 Jan-Mar;32(1):13-8.
30. Savon C, Goyenechea A, Valdivia A, Chacon D, Cancio R, Angel-Perez L. Detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by 24-well plate precentrifugation assay using a monoclonal antibody against F protein. *Archives of medical research*. 2000;31(1):93-6.
31. Valdés O, Savon C, Goyenechea A, Palerm L, Gonzalez G, Melero J. Caracterización genética molecular del virus Sincitial respiratorio humano en Cuba. *Biotecnología Aplicada*. 2005;22:34-7.
32. Wiemken T, Peyrani P, Bryant K, Kelley RR, Summersgill J, Arnold F, et al. Incidence of respiratory viruses in patients with community-acquired pneumonia admitted to the intensive care unit: results from the Severe Influenza Pneumonia Surveillance (SIPS) project. *European journal of clinical microbiology & infectious*

diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2013 May;32(5):705-10.

33. Valero N, Larreal Y, Arocha F, Gotera J, Mavarez A, Bermudez J, et al. Viral etiology of acute respiratory infections. *Investigacion clinica*. 2009 Sep;50(3):359-68.

34. Inzaurrealde D, Franchi R, Assandri E, PérezArch C. Infecciones respiratorias agudas graves Ingresos a Unidades de Cuidados Intensivos de pacientes pediátricos usuarios de la Administración de Servicios de Salud del Estado. *Pediatr Urug*. 2011;82(2):78-90.

35. Mizgerd J. Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med*. 2008;358((7)):716-27.

36. Bicer S, Giray T, Col D, Erdag GC, Vitrinel A, Gurol Y, et al. Virological and clinical characterizations of respiratory infections in hospitalized children. *Italian journal of pediatrics*. 2013;39:22.

37. Sung CC, Chi H, Chiu NC, Huang DT, Weng LC, Wang NY, et al. Viral etiology of acute lower respiratory tract infections in hospitalized young children in Northern Taiwan. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2011 Jun;44(3):184-90.

38. PAHO-CDC. Generic Protocol Influenza Surveillance. 2006. Available from: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/flu-snl-gpis.pdf> Accessed 4 March 2013.

39. Cilla G, Onate E, Perez-Yarza EG, Montes M, Vicente D, Perez-Trallero E. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: High rate of viral coinfection. *Journal of medical virology*. 2008 Oct;80(10):1843-9.

40. Calvo C, Casas I, Garcia-Garcia ML, Pozo F, Reyes N, Cruz N, et al. Role of rhinovirus C respiratory infections in sick and healthy children in Spain. *The Pediatric infectious disease journal*. 2010 Aug;29(8):717-20.

41. Martin ET, Kuypers J, Wald A, Englund JA. Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children. *Influenza and other respiratory viruses*. 2012 Jan;6(1):71-7.

42. Cheng VC, Chan JF, To KK, Yuen KY. Clinical management and infection control of SARS: lessons learned. *Antiviral research*. 2013 Aug 28.

43. Kumar A, Zarychanski R, Pinto Rea. Canadian Critical Care Trials Group H1N1 Collaborative Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) infection in Canada. *JAMA internal medicine*. 2009;302(17):1872-9.

44. WHO. The World Health Report 2004. Changing history In: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data WHO, Geneva, Switzerland. 2004:120-4.
45. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet*. 2011 Apr 9;377(9773):1264-75.
46. Heymann D. Virosis agudas de las vías respiratorias. Heymann DL, eds *El control de las enfermedades transmisibles*, 18th ed American Public Health Association. 2005:708-15.
47. Cheung T, Poon L. Biology of influenza A virus. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1102:1-25.
48. Benitez J, Brac E, Frías L. Virus Sincitial Respiratorio. Aspectos generales y básicos sobre la evolución clínica, factores de riesgo y tratamiento. *Revista de Posgrado de la Via Cátedra de Medicina*. 2007;171:9-10.
49. WHO. Surveillance & Monitoring, Updates Disponible en: http://www.who.int/entity/influenza/surveillance_monitoring/updates/2012_12_21_surveillance_update_175.pdf. 2012.
50. Monto A, Gravenstein S, Elliott M, Colopy M, Schweinle J. Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Archives of internal medicine*. 2000;160(21):3243-7.
51. Monto A. Epidemiology of influenza. *Vaccine*. 2008;Suppl 4:45-8.
52. Esposito S, Marchisio P, Principi N. The global state of influenza in children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2008;27(11):149-53.
53. Calvo Rey C, Garcia Garcia M, Casas Flecha I, Martin del Valle F, Centeno Jimenez M, Perez- Brena P. Influenza virus infections in infants aged less than two years old. *Anales de pediatria (Barcelona, Spain : 2003)*. 2005; 63(1):22-8.
54. Ison M. Influenza in hospitalized adults: gaining insight into a significant problem. *The Journal of infectious diseases*. 2009;200(4):485-8.
55. Geddes A. Influenza and bacterial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34(4):293-4.
56. Seki M, Kosai K, Yanagihara K, Higashiyama Y, Kurihara S, Izumikawa Kea. Disease severity in patients with simultaneous influenza and bacterial pneumonia. *Intern Med*. 2007;46(13):953-8.
57. Toovey S. Influenza- associated central nervous system dysfunction: a literature review. *Travel medicine and infectious disease*. 2008;6(3):114-24.

58. Mamas M, Fraser D, Neyses L. Cardiovascular manifestations associated with influenza virus infection. *International journal of cardiology*. 2008;130(30):304-9.
59. Rothberg MB, Haessler SD, Brown RB. Complications of viral influenza. *The American journal of medicine*. 2008 Apr;121(4):258-64.
60. Bozzo P, Djokanovic N, Koren G. H1N1 influenza in pregnancy: risks, vaccines, and antivirals. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC*. 2009;31(12):1172-5.
61. 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):197-201.
62. MMWR. Isolation of avian influenza A(H5N1) viruses from humans--Hong Kong, May-December 1997. *Morb Mortal Wkly Rep*. 1997;46(50):1204-7.
63. Bastien N, Antonishyn N, Brandt K, Wong C, Chokani K, Vegh Nea. Human infection with a triple-reassortant swine influenza A(H1N1) virus containing the hemagglutinin and neuraminidase genes of seasonal influenza virus. *The Journal of infectious diseases*. 2010;201(8):1178-82.
64. Belser JA, Gustin KM, Pearce MB, Maines TR, Zeng H, Pappas C, et al. Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice. *Nature*. 2013 Jul 10.
65. Lipsitch M, Viboud C. Influenza seasonality: lifting the fog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(10):3645-6.
66. Leo Y, Lye D, Chow A. Influenza in the tropics. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(8):457-8.
67. Chanock R, Roizman B, Myers R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation properties and characterization. *Am J Hyg*. 1957; 66:281-90.
68. Collins P, James E, Crowe J. *Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus* 5th Edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2007:1601-46. *Fields Virology*.
69. Inoue Y, Shimojo N. Epidemiology of virus-induced wheezing/asthma in children. *Frontiers in Microbiology | Virology*. 2013;4(391).
70. Schildgen O. The lack of protective immunity against RSV in the elderly. *Epidemiology and infection*. 2009;137(12):1687-90.

71. Collins C, Pollard A. Respiratory syncytial virus infections in children and adults. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2002;45(1):10-7.
72. Yorita KL, Holman RC, Steiner CA, Effler PV, Miyamura J, Forbes S, et al. Severe bronchiolitis and respiratory syncytial virus among young children in Hawaii. *The Pediatric infectious disease journal*. 2007 Dec;26(12):1081-8.
73. Hemalatha R, Swetha G, Seshacharyulu M, Radhakrishna K. Respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infections. *Indian journal of pediatrics*. 2010;77(7):755-8.
74. Halfhide C, and Smyth R. Innate immune response and bronchiolitis and preschool recurrent wheeze. *Paediatric respiratory reviews*. 2008;9: 251-62.
75. Zeng R, Li C, Li N, Wei L, and Cui Y. The role of cytokines and chemokines in severe respiratory syncytial virus infection and subsequent asthma. *Cytokine & growth factor reviews*. 2011;53:1-7.
76. Holberg C, Wright A, Martinez F, Ray C, Taussig L, and Lebowitz M. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol*. 1991;133:1135-51.
77. Cane P. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Reviews in medical virology*. 2001;11:103-16.
78. WHO. Prevención y control de enfermedades respiratorias agudas con tendencia epidémica y pandémica durante la atención sanitaria. *Pautas de la OMS*. 2007.
79. Manoha C, Espinosa S, Aho SL, Huet F, Pothier P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2007 Mar;38(3):221-6.
80. White L, Waris M, Cane P, Nokes D, Medley G. The transmission dynamics of groups A and B human respiratory syncytial virus (hRSV) in England & Wales and Finland: seasonality and cross-protection. *Epidemiology and infection*. 2005;133(2):279-89.
81. 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.
82. Wold William S, Horwitz M. Adenoviruses. *Fields Virology 5ed Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins*. 2007: 2396-436.

83. 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. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37:3940-45.
84. Broor S, Parveen S, Bharaj P, Prasad V, Srinivasulu K, Sumanth Ke, et al. A prospective three- year cohort study of the epidemiology and virology of acute respiratory of children in rural India. *PLoS ONE*. 2007;6:491.
85. Lee J, Choi E, Lee H. Clinical severity of respiratory adenoviral infection by serotypes in Korean children over 17 consecutive years (1991–2007). *J Clin Virol* 2010.
86. Chang S, Lee C, Lin P, Huang H, Chang L, Ko Wea. A community- derived outbreak of adenovirus type 3 in children in Taiwan between 2004 and 2005. *Journal of medical virology*. 2008;80(1):102-12.
87. Callaway Z, Kim S, Kim J, Kim D, Kim C. Adenovirus infection with serious pulmonary sequelae in Korean children. *The clinical respiratory journal*. 2011;5(2):92-8.
88. Gupta P, Tobias J, Goyal S, Hervie P, Harris J, Sadot Eea. Prolonged mechanical support in children with severe adenoviral infection: a case series and review of literature. *Journal of intensive care medicine*. 2011;26(4):267-72.
89. Edmond K, Scott S, Korczak V, Ward C, Sanderson C, Theodoratou E, et al. Long term sequelae from childhood pneumonia; systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2012;7(2):e31239.
90. Allibhai T, Spinella P, Meyer M, Hall B, Kofos D, Di geronimo R, et al. Survival after prolonged pediatric extracorporeal membrane oxygenation support for adenoviral pneumonia. *J Pediatr Surg*. 2008;43(8):9-11.
91. Jonhstone J, Majumdar S, Fox J, Marrie T. Viral infection in adults hospitalized with community acquired pneumonia: Prevalence, pathogens and presentation. *Chest*. 2008;134:1141-48.
92. Kandel R, Srinivasan A, D'Agata E, Lu X, Erdman D, Jhung M. Outbreak of adenovirus type 4 infection in a long – term care facility of the elderly. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2010;31(7):755-7.
93. Hakim F, Tleyjeh I, . Severe adenovirus pneumonia in immunocompetent adults: a case report and review of the literature. *European journal of clinical microbiology &*

infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2008;27:153–8.

94. Metzgar D, Osuna M, Kajon A, Hawksworth A, Irvine M, Russell K. Abrupt emergence of diverse species B adenoviruses at US military recruit training centers. *The Journal of infectious diseases*. 2007;196:1465-73.

95. Russell K, hawksworth A, Ryan Mea. Vaccine-preventable adenoviral respiratory illness in US military recruits 1999-2004. *Vaccine*. 2006;24(15):2835-42.

96. Kajon A, Dickson L, Houg H, Metzgar D, Lee V, Tan B. Outbreak of febrile respiratory illness associated with adenovirus 11a infection in a Singapore military recruit training camp. *J Clin Microbiol* 2010. 48:1438–41.

97. Kajon AE, Dickson LM, Metzgar D, Houg HS, Lee V, Tan BH. Outbreak of febrile respiratory illness associated with adenovirus 11a infection in a Singapore military training cAMP. *Journal of clinical microbiology*. 2010 Apr;48(4):1438-41.

98. Tate J, Bunning M, 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. 2009;199(10):1419-26.

99. Wold W, Horwitz M. Adenoviruses. *Fields virology* 5th ed Philadelphia (PA): Lippincott-Raven; . 2007:2395-436.

100. Hong J, Lee H, Piedra P, Choi H, Park K, Koh Y. Lower respiratory tract infection due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin Infect Dis* 2001. 2001; 32:1423-9.

101. Herrera D, de la Hoz F, Mariño C, Ramirez E, López J, Vélez C. Adenovirus en Niños Menores de Cinco Años. *Patrones de Circulación, Características Clínicas y Epidemiológicas en Colombia, 1997-2003*. *Rev Salud Public* 2007 2007;9(3):420-9.

102. Rojas L, Jaramillo C, Mojica M, Escalante M, Delgado P. Molecular typing of adenovirus circulating in a Colombian pediatric population with acute respiratory infection. *Epidemiology and infection*. 2011;7:1-5.

103. Gray G, McCarthy T, Lebeck M, Schnurr D, Russell K, Kajon Ae, et al. Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006. *Clin Infect Dis* 2001. 2007;45:1120-31.

104. Zhu Z, Zhang Y, Xu S. Outbreak of acute respiratory disease in China caused by B2 species of adenovirus type 11. *J Clin Microbiol* 2009. 2009;47(3):697-703.

105. Lynch JP, 3rd, Fishbein M, Echavarría M. Adenovirus. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2011 Aug;32(4):494-511.

106. Krilov L. Adenovirus infections in the immunocompromised host. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24(6):555-6.
107. 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. *Virology journal.* 2011;8:23.
108. Cherry J, Chen T. Adenoviruses. *Textbook of pediatric infectious diseases*, 6th ed Philadelphia, Pennsylvania: Saunders; 2009. 2009: 1949–72.
109. Hamelin ME, Abed Y, Boivin G. Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2004 Apr 1;38(7):983-90.
110. Heininger U, Kruker AT, Bonhoeffer J, Schaad UB. Human metapneumovirus infections--biannual epidemics and clinical findings in children in the region of Basel, Switzerland. *European journal of pediatrics.* 2009 Dec;168(12):1455-60.
111. Velez Rueda AJ, Mistchenko AS, Viegas M. Phylogenetic and phylodynamic analyses of human metapneumovirus in Buenos Aires (Argentina) for a three-year period (2009-2011). *PloS one.* 2013;8(4):e63070.
112. Hermos CR, Vargas SO, McAdam AJ. Human metapneumovirus. *Clinics in laboratory medicine.* 2010 Mar;30(1):131-48.
113. Pabbaraju K, Wong S, McMillan T, Lee BE, Fox JD. Diagnosis and epidemiological studies of human metapneumovirus using real-time PCR. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2007 Nov;40(3):186-92.
114. van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *The Pediatric infectious disease journal.* 2004 Jan;23(1 Suppl):S25-32.
115. Kahn JS. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clinical microbiology reviews.* 2006 Jul;19(3):546-57.
116. Foulongne V, Guyon G, Rodiere M, Segondy M. Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with respiratory tract disease. *The Pediatric infectious disease journal.* 2006 Apr;25(4):354-9.
117. Boivin G, De Serres G, Cote S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerging infectious diseases.* 2003 Jun;9(6):634-40.

118. 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. *Nature medicine*. 2001 Jun;7(6):719-24.
119. Williams JV, Wang CK, Yang CF, Tollefson SJ, House FS, Heck JM, et al. The role of human metapneumovirus in upper respiratory tract infections in children: a 20-year experience. *The Journal of infectious diseases*. 2006 Feb 1;193(3):387-95.
120. Sloots TP, Mackay IM, Bialasiewicz S, Jacob KC, McQueen E, Harnett GB, et al. Human metapneumovirus, Australia, 2001-2004. *Emerging infectious diseases*. 2006 Aug;12(8):1263-6.
121. Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Ishiko H, Hara M, et al. Human metapneumovirus infection in Japanese children. *J Clin Microbiol*. 2004 Jan;42(1):126-32.
122. Regev L, Hindiyeh M, Shulman LM, Barak A, Levy V, Azar R, et al. Characterization of human metapneumovirus infections in Israel. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Apr;44(4):1484-9.
123. Bastien N, Ward D, Van Caesele P, Brandt K, Lee SH, McNabb G, et al. Human metapneumovirus infection in the Canadian population. *Journal of clinical microbiology*. 2003 Oct;41(10):4642-6.
124. 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 Jun;111(6 Pt 1):1407-10.
125. Robinson JL, Lee BE, Bastien N, Li Y. Seasonality and clinical features of human metapneumovirus infection in children in Northern Alberta. *Journal of medical virology*. 2005 May;76(1):98-105.
126. Chano F, Rousseau C, Laferriere C, Couillard M, Charest H. Epidemiological survey of human metapneumovirus infection in a large pediatric tertiary care center. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Nov;43(11):5520-5.
127. Bouscambert-Duchamp M, Lina B, Trompette A, Moret H, Motte J, Andreoletti L. Detection of human metapneumovirus RNA sequences in nasopharyngeal aspirates of young French children with acute bronchiolitis by real-time reverse transcriptase PCR and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol*. 2005 Mar;43(3):1411-4.

128. Don M, Korppi M, Valent F, Vainionpaa R, Canciani M. Human metapneumovirus pneumonia in children: results of an Italian study and mini-review. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2008;40(10):821-6.
129. Kikuta H. Human metapneumovirus. *Uirusu*. 2006 Dec;56(2):173-81.
130. Lu X, Chittaganpitch M, Olsen SJ, Mackay IM, Sloots TP, Fry AM, et al. Real-time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Sep;44(9):3231-5.
131. Schildgen O, Muller A, Allander T, Mackay IM, Volz S, Kupfer B, et al. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clinical microbiology reviews*. 2008 Apr;21(2):291-304, table of contents.
132. Mazhul LA, Isaeva EI, Zlobin VI, Viazov SO. Human bocavirus. *Voprosy virusologii*. 2009 May-Jun;54(3):4-7.
133. Human bocavirus found in children with lower respiratory tract infection. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2005 Aug;10(8):E050825 2.
134. Foulongne V, Segondy M. [Human bocavirus (HBoV)]. *Pathologie-biologie*. 2009 Mar;57(2):197-202.
135. Calvo C, Garcia-Garcia ML, Pozo F, Carvajal O, Perez-Brena P, Casas I. Clinical characteristics of human bocavirus infections compared with other respiratory viruses in Spanish children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2008 Aug;27(8):677-80.
136. Garcia-Garcia ML, Calvo Rey C, Pozo Sanchez F, Vazquez Alvarez MC, Gonzalez Vergaz A, Perez-Brena P, et al. Human bocavirus infections in Spanish 0-14 year-old: clinical and epidemiological characteristics of an emerging respiratory virus. *Anales de pediatria (Barcelona, Spain : 2003)*. 2007 Sep;67(3):212-9.
137. Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007 Apr 1;44(7):904-10.
138. Gendrel D, Guedj R, Pons-Catalano C, Emirian A, Raymond J, Rozenberg F, et al. Human bocavirus in children with acute asthma. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007 Aug 1;45(3):404-5.

139. 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. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2010 Nov;49(3):158-62.
140. Hengst M, Hausler M, Honnef D, Scheithauer S, Ritter K, Kleines M. [Human Bocavirus-infection (HBoV): an important cause of severe viral obstructive bronchitis in children]. *Klinische Padiatrie*. 2008 Sep-Oct;220(5):296-301.
141. Chuang CY, Kao CL, Huang LM, Lu CY, Shao PL, Lee PI, et al. Human bocavirus as an important cause of respiratory tract infection in Taiwanese children. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2011 Oct;44(5):323-7.
142. Milder E, Arnold JC. Human metapneumovirus and human bocavirus in children. *Pediatric research*. 2009 May;65(5 Pt 2):78R-83R.
143. 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. *Archives of disease in childhood*. 2010 Jan;95(1):35-41.
144. Kaio Silva A, Cordeiro dos Santos M, Alencar de Mello W, Medeiros de Sousa R. Occurrence of Human Bocavirus associated with acute respiratory infections in children up to 2 years old in the City of Belém, Pará State, Brazil. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2010;1(1):87-92.
145. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human Bocavirus infection, Canada. *Emerging infectious diseases*. 2006 May;12(5):848-50.
146. Palmenberg A, Rathe J, Liggett S. Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus. *J Allergy Clin Immunol*(2010) 2010;125:1190-9.
147. Marcone DN, Ricarte C, Videla C, Ekstrom J, Carballal G, Vidaurreta S, et al. Rhinoviruses. Frequency in nonhospitalized children with acute respiratory infection. *Medicina*. 2012;72(1):28-32.
148. Woo KK, James E. Updates in the Relationship Between Human Rhinovirus and Asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 2012 May. 2012;4(3):116-21.
149. Juvén T, Mertsola J, Waris Mea. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J* (2000). 2000;19:293-8.
150. de Almeida M. Rhinovirus C and respiratory exacerbations in children with cystic fibrosis. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:996 –9.

151. Burns J. Respiratory viruses in children with cystic fibrosis: viral detection and clinical findings. *Influenza Other Respir Viruses*. 2012;6:218–23.
152. Lemanske RJ, Jackson D, Gangnon Rea. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol* (2005). 2005;116:571-7.
153. Jackson D, Gangnon R, Evans Mea. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am J Respir Crit Care Med* (2008). 2008;178:667-72.
154. Echavarría M, Marcone D, Ricarte Cea. Detection of 21 respiratory pathogens simultaneously using a commercial multiplex PCR device. XXVI Clinical Virology Symposium of PASCVD, Daytona, Florida, USA. 2011.
155. Casas Flecha I, Eiros Bouza J, Ortiz de Lejarazu R, Pérez Breña P, Pozo Sánchez F, Ruiz Carrascoso G, et al. Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones por virus respiratorios. 2008.
156. Linsuwanon P, Puenpa J, Suwannakarn K, Auksornkitti V, Vichiwattana P, Korkong S, et al. Molecular epidemiology and evolution of human enterovirus serotype 68 in Thailand, 2006-2011. *PloS one*. 2012;7(5):e35190.
157. . Libro de Infectología Pediátrica 2ª edición 2000.
158. Rahamat-Langendoen J, Riezebos-Brilman A, Borger R, van der Heide R, Brandenburg Aea. Upsurge of human enterovirus 68 infections in patients with severe respiratory tract infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011;52:103–6.
159. Meijer A, van der Sanden S, Snijders BE, Jaramillo-Gutierrez G, Bont L, van der Ent CK, et al. Emergence and epidemic occurrence of enterovirus 68 respiratory infections in The Netherlands in 2010. *Virology*. 2012 Feb 5;423(1):49-57.
160. Imamura T, Fuji N, Suzuki A, Tamaki R, Saito M, Aniceto R, et al. Enterovirus 68 among children with severe acute respiratory infection, the Philippines. *Emerging infectious diseases*. 2011 Aug;17(8):1430-5.
161. Hasegawa S, Hirano R, Okamoto-Nakagawa R, Ichiyama T, Shirabe K. Enterovirus 68 infection in children with asthma attacks: virus-induced asthma in Japanese children. *Allergy, asthma & immunology research*. 2011;66:1618–20.
162. Cherry. J. Picornaviridae. Enteroviruses and Parechoviruses. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases Feigin-Cherry- Demmler-Kaplan Saunders* 5th edition. 2004; 2:1984-2030.

163. Méndez Hernández M, Fàbrega Sabaté J, Rodrigo Gonzalo-de-Liria C. VIRAL INFECTIONS OF THE LOWER RESPIRATORY TRACT. *Pediatr Integral* 2008;XII(1):41-52.
164. Cisterna R. Virus respiratorios. *Medicina respiratoria* (2009). 2009;2(2):25-35.
165. Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Itagaki T, Katsushima F, et al. Epidemiology of parainfluenza virus types 1, 2 and 3 infections based on virus isolation between 2002 and 2011 in Yamagata, Japan. *Microbiology and immunology*. 2012 Dec;56(12):855-8.
166. Ren L, Gonzalez R, Xie Z, Xiong Z, Liu C, Xiang Z, et al. Human parainfluenza virus type 4 infection in Chinese children with lower respiratory tract infections: a comparison study. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011 Jul;51(3):209-12.
167. Liu WK, Liu Q, Chen DH, Liang HX, Chen XK, Huang WB, et al. Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. *BMC infectious diseases*. 2013;13:28.
168. Corman V, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2012;17(39).
169. Wong SS, Yuen KY. The management of coronavirus infections with particular reference to SARS. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008 Sep;62(3):437-41.
170. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CSea. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348(20):1953-66.
171. To KK, Hung IF, Chan JF, Yuen KY. From SARS coronavirus to novel animal and human coronaviruses. *Journal of thoracic disease*. 2013 Aug;5(Suppl 2):S103-8.
172. Cherry J, Krogstad P. SARS: The first pandemic of the 21st century. *Pediatric research*. 2004;56:1-5.
173. Van de Hoek L, Pyrc K, Jebbink M, Vermeulen-Oost W, Berkhout J, Woltheurs Kea. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med*. 2004;10:368-73.
174. Koetz A, Nilsson P, Linden M, van der Hoek L, Ripa T. Detection of human coronavirus NL63, human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in children with respiratory tract infections in south-west Sweden. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006 Nov;12(11):1089-96.

175. Bastien N, Robinson J, Tse A, Lee B, Hart L, Y. L. Human coronavirus NL-63 in children. 1 year study. *J Clin Microbiol* 2009. 2005;43:4567-73.
176. Kuypers J, Martin E, Heugel J, Wrigh N, Morrow R, Englund J. Clinical diseases in children associated with newly described coronavirus subtypes. *Pediatrics* (2007). 2007;119:70-6.
177. Sloots T, McErlean P, Speicher D, Arden K, Neissen M, Mackay I. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2006;35: 99-102.
178. de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, Brown CS, Drosten C, Enjuanes L, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of virology*. 2013 Jul;87(14):7790-2.
179. Mailles A, Blanckaert K, Chaud P, van der Werf S, Lina B, Caro V, et al. First cases of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infections in France, investigations and implications for the prevention of human-to-human transmission, France, May 2013. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2013;18(24).
180. A MZ. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*. 2012;367.
181. Wang N, Shi X, Jiang L, Zhang S, Wang D, Tong P, et al. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell research*. 2013 Aug;23(8):986-93.
182. Josset L, Menachery VD, Gralinski LE, Agnihothram S, Sova P, Carter VS, et al. Cell host response to infection with novel human coronavirus EMC predicts potential antivirals and important differences with SARS coronavirus. *mBio*. 2013;4(3):e00165-13.
183. (GAR) GAaR. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) - update. Available from: http://www.who.int/csr/don/2013_10_04/es/index.html.
184. Eiros J, Ortiz de Lejarazu R, Tenorio A, Casas I, Pozo F, Ruiz Gea. Microbiological diagnosis of viral respiratory infections. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2009;27(3):168-77.
185. Krunic 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.

186. Brittain-Long R, Nord S, Olofsson S, Westin J, Anderson L, Lindh M. Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2008;41(1):53-6.
187. Alvarez M, Lopez-Pacheco F, Aguilar-Yanez J, Portillo-Lara R, Mendoza-Ochoa G, Garcia-Echauri S. Specific recognition of influenza A/H1N1/2009 antibodies in human serum: a simple virusfree ELISA method. *PloS one*. 2010;5(4).
188. Coiras M, Perez-Brena P, Garcia M, 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. *Journal of medical virology*. 2003;69(1):132-44.
189. Coiras M, Aguilar J, Garcia M, 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 J*. 2004;72(3):484-95.
190. Acosta Herrera B. Virus respiratorios emergentes en Cuba en el período 2005-2010 [Tesis de Doctorado]: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2012.
191. Kowk S, Higushi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*. 1989;339:237-8.
192. 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. *Journal of medical virology*. 2010;82(5):843-53.
193. WHO. CDC protocol of real-time RT-RCP for Influenza A H1N1[updated 2009; cited 2013 March 3 2009 [Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf].
194. Brunstein J, Cline C, McKinney S, Thomas E. Evidence from multiplex molecular assays for complex multipathogen interactions in acute respiratory infections. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46:97-102.
195. Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *The Lancet infectious diseases*. 2010;375(9730):1969-87.
196. Lina B, Valette M, Foray S, Luciani J, Stagnara J, See DM, et al. Surveillance of community-acquired viral infections due to respiratory viruses in Rhone-Alpes (France)

- during winter 1994 to 1995. *Journal of clinical microbiology*. 1996 Dec;34(12):3007-11.
197. Van Gageldonk-Lafeber AB, Heijnen ML, Bartelds AI, Peters MF, van der Plas SM, Wilbrink B. A case-control study of acute respiratory tract infection in general practice patients in The Netherlands. *Clin Infect Dis* 2001. 2005;41(4):490-7.
198. Yang ZF, Zhan YQ, Wang YT, Luo Y, Zhou H, Li JQ, et al. [A pathogenic and clinical study of 882 cases of adult influenza-like illness in Guangzhou]. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*. 2010 Oct;33(10):742-5.
199. Goka EA, Vallely PJ, Mutton KJ, Klapper PE. Single, dual and multiple respiratory virus infections and risk of hospitalization and mortality. *Epidemiology and infection*. 2014 Feb 24:1-11.
200. Black CP. Systematic review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection. *Respir Care*. 2003 Mar;48(3):209-33.
201. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010 May 1;375(9725):1545-55.
202. Simmerman JM, Uyeki T. The burden of influenza in East and Southeast Asia: a review of the literature. *Influenza Other Respir Viruses*. 2008;2:81-92.
203. Yamaya M, Suzuki T, Sasaki H, Nishimura H, Sekizawa K. [Common cold (rhinovirus)]. 2003.
204. Peltola V, Waris M, Osterback R, Susi P, Hyypia T, Ruuskanen O. Clinical effects of rhinovirus infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2008;43(4):411-4.
205. Zhang C, Zhu N, Xie Z, Lu R, He B, Liu C, et al. Viral etiology and clinical profiles of children with severe acute respiratory infections in china. *PloS one*. 2013;8(8):e72606.
206. Hai LT, Ngoc Bich VT, Ngai LK, Ngoc Diep NT, Huu Phuc P, Hung VP, et al. Fatal Respiratory Infections Associated with Rhinovirus Outbreak, Vietnam. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(11):1886-8.
207. Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *Journal of medical virology*. 2006 Sep;78(9):1232-40.

208. Walker E, Ison MG. Respiratory viral infections among hospitalized adults: experience of a single tertiary healthcare hospital. *Influenza Other Respir Viruses*. 2014 Feb 3.
209. Savón C, Valdés O, Acosta B, Gonzalez Muñoz G, Piñón A, Gonzalez Baez G. Infección por rinovirus en niños hospitalizados menores de 1 año. Cuba 2006. *Rev Biomed* 2008;19:122-3.
210. Lin J, Kang M, Zhong H, Zhang X, Yang F, Ni H, et al. Influenza seasonality and predominant subtypes of influenza virus in Guangdong, China, 2004-2012. *Journal of thoracic disease*. 2013 Aug;5(Suppl 2):S109-17.
211. Zhou H, Thompson WW, Viboud CG, Ringholz CM, Cheng PY, Steiner C, et al. Hospitalizations associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States, 1993-2008. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012 May;54(10):1427-36.
212. Dangi T, Jain B, Singh AK, Mohan M, Dwivedi M, Kumar R. Influenza virus genotypes circulating in and around Lucknow, Uttar Pradesh, India, during post pandemic period, August 2010 - September 2012. *The Indian journal of medical research*. 2014;139:418-26.
213. Seo YB, Song JY, Choi MJ, Kim IS, Yang TU, Hong K, et al. Etiology and Clinical Outcomes of Acute Respiratory Virus Infection in Hospitalized Adults. *Infect Chemother*. 2014;46(2):67-76.
214. Hacimustafaoglu M, Celebi S, Bozdemir SE, Ozgur T, Ozcan I, Guray A, et al. RSV Frequency in Children Below 2 Years Hospitalized for Lower Respiratory Tract Infections. *The Turkish journal of pediatrics*. 2013 Mar-Apr;55(2):130-9.
215. Takahashi K, Suzuki M, Minh le N, Anh NH, Huong LT, Son TV, et al. The incidence and aetiology of hospitalised community-acquired pneumonia among Vietnamese adults: a prospective surveillance in Central Vietnam. *BMC infectious diseases*. 2013;13:296.
216. Broulette J, Yu H, Pyenson B, Iwasaki K, Sato R. The Incidence Rate and Economic Burden of Community-Acquired Pneumonia in a Working-Age Population. *Am Health Drug Benefits*. 2013;6(8):494-503.
217. Collins PL, Graham BS. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol*. 2008 Mar;82(5):2040-55.
218. Valdés O, Savon C, Goyenechea A, Valdivia A, Gonzalez G, Palerm L. [Different circulation patterns of subgroups A and B of human respiratory syncytial

- virus in some provinces of Cuba]. *Revista cubana de medicina tropical*. 2004;56(2):94-102.
219. Savon C, Goyenechea A, Valdes O, Aguilar J, Gonzalez G, Palerm L. Respiratory syncytial virus group A and B genotypes and disease severity among Cuban children. *Archives of medical research*. 2006;37(4):543-7.
220. Shafik CF, Mohareb EW, Yassin AS, Amin MA, El Kholy A, El-Karakasy H, et al. Viral etiologies of lower respiratory tract infections among Egyptian children under five years of age. *BMC infectious diseases*. 2012;12:350.
221. Vong S, Guillard B, Borand L, Rammaert B, Goyet S, Te V, et al. Acute lower respiratory infections in ≥ 5 year -old hospitalized patients in Cambodia, a low-income tropical country: clinical characteristics and pathogenic etiology. *BMC infectious diseases*. 2013;13:97.
222. OPS-CDC. Protocolo genérico para la vigilancia de la influenza. 2006.
223. WHO. Epidemiological Surveillance Standards for Influenza. 2012.
224. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E. Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004;292:1333-40.
225. Wong CM, Yang L, Chan KPea. Influenza-associated hospitalization in a subtropical city. *PLoS medicine*. 2006;3(121).
226. PAHO. Guía Operativa de Vigilancia Intensificada de IRAG 2010 [cited updated 2010 Available from: <http://www.paho.org/AD/DPC/CD/flu-snl-gpis.pdf>].
227. MINSAP. Programa Integral de Atención y Control de las IRA. República de Cuba. 2013.
228. Liu YF, Gao Y, Chen MF, Cao B, Yang XH, Wei L. Etiological analysis and predictive diagnostic model building of community-acquired pneumonia in adult outpatients in Beijing, China. *BMC infectious diseases*. 2013;13:309.
229. Fuller JA, Summers A, Katz MA, Lindblade KA, Njuguna H, Arvelo W, et al. Estimation of the national disease burden of influenza-associated severe acute respiratory illness in Kenya and Guatemala: a novel methodology. *PloS one*. 2013;8(2):e56882.
230. Savon Valdes CE, Acosta Herrera B, Pinon Ramos A, Valdes Ramirez O, Oropesa Fernandez SI, Gonzalez Munoz G, et al. [Severe acute respiratory infection in Cuban patients during the influenza A(H1N1) pandemic in Cuba, 2009]. *Revista cubana de medicina tropical*. 2011 Jan-Apr;63(1):30-7.

231. Faverio P, Aliberti S, Bellelli G, Suigo G, Lonni S, Pesci A, et al. The management of community-acquired pneumonia in the elderly. *European journal of internal medicine*. 2013 Dec 17.
232. Xiang Z, Gonzalez R, Ren L, Xiao Y, Chen L, Zhang J, et al. Prevalence and clinical characteristics of human respiratory syncytial virus in Chinese adults with acute respiratory tract infection. *Journal of medical virology*. 2013 Feb;85(2):348-53.
233. Naorat S, Chittaganpitch M, Thamthitiwat S, Henchaichon S, Sawatwong P, Srisaengchai P, et al. Hospitalizations for acute lower respiratory tract infection due to respiratory syncytial virus in Thailand, 2008-2011. *The Journal of infectious diseases*. 2013 Dec 15;208 Suppl 3:S238-45.
234. Talbot HK, Falsey AR. The diagnosis of viral respiratory disease in older adults. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010 Mar 1;50(5):747-51.
235. Suzuki A, Lupisan S, Furuse Y, Fuji N, Saito M, Tamaki R, et al. Respiratory viruses from hospitalized children with severe pneumonia in the Philippines. *BMC infectious diseases*. 2012;12:267.
236. Reiche J, Jacobsen S, Neubauer K, Hafemann S, Nitsche A, Milde J, et al. Human metapneumovirus: insights from a ten-year molecular and epidemiological analysis in Germany. *PloS one*. 2014;9(2):e88342.
237. Nyatanyi T, Nkunda R, Rukelibuga J, Palekar R, Muhimpundu MA, Kabeja A, et al. Influenza sentinel surveillance in Rwanda, 2008-2010. *The Journal of infectious diseases*. 2012 Dec 15;206 Suppl 1:S74-9.
238. Nasreen S, Luby SP, Brooks WA, Homaira N, Mamun AA, Bhuiyan MU, et al. Population-Based Incidence of Severe Acute Respiratory Virus Infections among Children Aged <5 Years in Rural Bangladesh, June-October 2010. *PloS one*. 2014 Feb 25;9(2):e 89978.
239. WHO. Interim Global Epidemiological Surveillance Standards for Influenza. 2012.
240. Treanor JJ. Influenza viruses, including avian influenza and swine influenza. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2010:2265–88.
241. Chew FT, Doraisingham S, Ling AE, Kumarasinghe G, Lee BW. Seasonal trends of viral respiratory tract infections in the tropics. *Epidemiology and infection*. 1998;121(1):121-8.

242. Sugaya N, Mitamura K, Yamazaki M. Lower clinical effectiveness of oseltamivir against influenza B contrasted with influenza A infection in children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;44(2):197-202.
243. Kawai N, Ikematsu H, Iwaki N. Factors influencing the effectiveness of oseltamivir and amantadine for the treatment of influenza: a multicenter study from Japan of the 2002-2003 influenza season. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;40(9):1309-16.
244. Schlaudecker EP, Heck JP, Macintyre ET, Martinez R, Dodd CN, McNeal MM, et al. Etiology and seasonality of viral respiratory infections in rural Honduran children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2012 Nov;31(11):1113-8.
245. Moura FE, Perdigao AC, Siqueira MM. Seasonality of influenza in the tropics: a distinct pattern in northeastern Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009 Jul;81(1):180-3.
246. WHO. Influenza Laboratory Surveillance Information by the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS)[accessed on 08/02/2013]. Available at: <http://gamapserv.who.int/gareports/Default.aspx?ReportNo=1>.
247. Actualización Epidemiológica Incremento de la actividad de influenza 31 de mayo de 2013. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=21763&Itemid
248. Epidemiological and virological characteristics of influenza in the Western Pacific Region of the World Health Organization, 2006-2010. *PloS one*. 2012;7(5):e37568.

Anexos

Anexo 1. Modelo adjunto para la colecta de muestras.

Minsap. Modelo. Microbiología.

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-Fecha de comienzo de los Síntomas: <input type="text"/>			
19-Síntomas y signos generales:								Día Mes Año	
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"/>	
Espionomegalia <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"/>		IRA: Tos <input type="checkbox"/>	
Disnea <input type="checkbox"/>		Expectoración <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"/>		SNC: Desorientación <input type="checkbox"/>		Rigidez nuca <input type="checkbox"/>		Convulsiones <input type="checkbox"/>		Pérdida de conciencia <input type="checkbox"/>	
Trastornos de conducta <input type="checkbox"/>		Dificultad en la marcha <input type="checkbox"/>		ITS: Secreción Genital <input type="checkbox"/>		Lesión Genital <input type="checkbox"/>		SEPSIS URINARIA: Disuria <input type="checkbox"/>	
Otros: <input type="checkbox"/>									

20-Diagnóstico Clínico:		21-APP:	
22-Tipo de Muestra colectada:		Enfermedad similar en la familia o comunidad:	
Sero <input type="checkbox"/> Sangre <input type="checkbox"/> 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"/> Gargarismo <input type="checkbox"/> Espujo <input type="checkbox"/>		Historia de viajes al exterior:	
Hece <input type="checkbox"/> Exudado <input type="checkbox"/> Cual		SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> País: <input type="text"/>	
Tejido <input type="checkbox"/> Cual		Fecha llegada al país: <input type="text"/>	
**Lámina de: <input type="text"/> Cepa de: <input type="text"/>		Día Mes Año	
Fecha colecta muestra:		Tratamiento Previo:	
<input type="text"/>		SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	
Día Mes Año		Cuál(es): <input type="text"/>	
22-Estudio solicitado:		Antecedente de vacunación PRS	
Diagnóstico <input type="checkbox"/> Referencia <input type="checkbox"/>		SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Fecha: <input type="text"/>	
23-SUEROS PAREADOS		Día Mes Año	
*Fecha de colecta:		24- Nombre del Facultativo:	
1 ^{er} Suero <input type="text"/>		25- RESULTADOS	
Día Mes Año			
2 ^{do} Suero <input type="text"/>			
Día Mes Año			
Confirmatorio (Dengue) <input type="checkbox"/> Referencia <input type="checkbox"/>			
Para el envío de cepas solo se requieren los datos correspondientes a los acápites: 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 22, 24, 25.			