



ACTUALIZACIÓN

INFLUENZA A H1N1 DE ORIGEN PORCINO: Métodos diagnósticos

Influenza A H1N1 swine origin: diagnostic methods

Manuel Antonio Vargas-Córdoba

MD. MSc. Profesor Titular Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Correspondencia: mavargasco@unal.edu.co

Resumen

El diagnóstico de la infección por virus influenza reposa sobre técnicas virológicas directas e indirectas. Las diferentes pruebas diagnósticas poseen niveles de sensibilidad y especificidad variables que dependen en gran parte de las características genéticas y antigénicas del virus circulante. En el caso de la aparición de una nueva variante viral las pruebas disponibles en el mercado deben ser validadas para comprobar su eficiencia de detección para el nuevo virus. En caso de baja sensibilidad y especificidad, las pruebas deben ajustarse con el fin de mejorar su poder de detección del nuevo agente. Existen múltiples pruebas diagnósticas que presentan cada una sus ventajas y limitaciones y su selección dependerá de las condiciones específicas de cada laboratorio diagnóstico.

Palabras clave: influenza humana (gripe humana), subtipo H1N1 del virus de la influenza A, infección, virología.

Vargas-Córdoba MA. Influenza A H1N1 de origen porcino: métodos diagnósticos. *Rev.Fac.Med.* 2010; 58: 44-59.

Summary

The diagnosis of infection by influenza viruses relies on direct and indirect virologic techniques. Different diagnostic tests have variable sensitivities and specificities depending to a large extent on the genetic and antigenic features of the circulating virus. When a new viral variant appears, commercially available tests must be validated in order to verify their performance at detecting the new virus.

If a low sensitivity or specificity is found, tests must be adjusted in order to improve their detection power for the new agent. There are multiple diagnostic tests, each one with its own advantages and limitations; so the selection of a test will depend on the specific conditions of a particular diagnostic laboratory.

Key word: influenza, human, influenza A virus, H1N1 subtype, infection, virology.

Vargas-Córdoba MA. Influenza A H1N1 swine origin: diagnostic methods. *Rev.Fac.Med.* 2010; 58: 44-59.

Introducción

En abril de 2009 fue identificado en Texas, California y en una pequeña localidad de La Gloria, Veracruz, México una nueva variante del virus influenza A (1), su denominación SOIV (en inglés *swine origen influenza virus*). El virus inició su transmisión desde México a Estados Unidos y en corto tiempo se diseminó por todo el hemisferio a múltiples países (2). Para el 6 de julio de 2009 la Organización Mundial de la Salud dejó de reportar el número de casos confirmados que para ese momento ya había sido reportado en más de 120 países, con un número que alcanzaba los 94.512 casos, con 429 muertes (2).

Los estudios genéticos del nuevo agente infeccioso determinaron que fue originado por mecanismos de recombinación genética de virus influenza de orígenes porcino norteamericano, porcino euroasiático, virus aviar y virus humanos (3). La aparición de nuevos agentes virales por mecanismos de recombinación genética o de mutación se ha asociado con el surgimiento de pandemias, por cuanto el nuevo virus encuentra una población totalmente desprovista de respuesta inmune previa que pueda conferir una protección parcial a las personas infectadas (4). En junio 11 de 2009 la Organización Mundial de la Salud declaró la fase 6 de estado de pandemia gracias a que se estableció que existía una transmisión sostenida y autóctona del virus en múltiples partes del globo.

Las manifestaciones clínicas de la infección por virus influenza deben diferenciarse de aquellas del resfriado común en cuanto a que son más amplias y severas, pero se debe tener en cuenta que la presentación clínica es muy variada y las solas características clínicas no permiten realizar el diagnóstico etiológico preciso (5). Los casos típicos de influenza pueden tomarse como

entidades clínicas características, pero aun en estas circunstancias el valor predictivo positivo de los signos y síntomas varía de 27 a 70% (6,7). En un primer reporte de perfil clínico del nuevo virus influenza A H1N1 se determinó que 94% de pacientes se observaban con fiebre, 92% con tos, 66% con ardor de garganta y 25% referían síntomas gastrointestinales (3).

Las manifestaciones clínicas, sin embargo, son variables en las diferentes series analizadas y en un amplio grupo de pacientes el conjunto de signos y síntomas puede superponerse con otras patologías (8,9). Por estas razones, el laboratorio clínico juega un papel importante para establecer el diagnóstico definitivo de la enfermedad (9). La presente revisión tiene como fin evaluar la utilidad y las limitaciones de las diferentes herramientas diagnósticas en el curso de la infección por virus influenza A H1N1.

Generalidades del virus

El virus influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* la cual incluye cinco géneros: los virus influenza A, B y C (comúnmente designados como tipo A, B y C), los *Thogotovirus* y los *Isavirus*. La subdivisión en tipos A, B y C se basa en las diferencias antigénicas presentes en la nucleoproteína y la proteína de matriz. El virus es de forma esférica o filamentosa y está compuesto de 1% de ARN, 70% de proteína, 20% de lípido y 8% de carbohidrato. Este agente infeccioso es un virus cubierto de forma esférica o filamentosa, con un diámetro de 80-120 nm y una nucleocápside de simetría helicoidal (10).

La envoltura viral deriva de la membrana plasmática celular y presenta dos glicoproteínas importantes para el funcionamiento viral: la hemaglutinina o proteína H y la neuraminidasa o proteína N (10, 11). Hasta el momento han sido identificados 16 tipos de hemaglutinina y 9 tipos



de neuraminidasa en el género influenza A, sólo los tipos H1, H2, H3 y N1, N2 afectan con mayor frecuencia al hombre; otros tipos de H y N pueden ser causa de infecciones zoonóticas (10). Los virus influenza A humanos tienen preferencia por los receptores de ácido siálico como método de unión a la célula que infectan. La hemaglutinina tiene como rol fundamental la unión a los receptores celulares presentes en glicolípidos o glicoproteínas que presentan residuos de ácido siálico o neuramínico unidos a la galactosa mediante enlaces α 2,6-galactósido, mientras que los virus de origen aviar tienen una mayor afinidad por los receptores con enlaces α 2,3-galactósido; esta afinidad está relacionada con el residuo aminoacídico presente en la posición 226 de la hemaglutinina (12).

La distribución de estos dos tipos de receptores cambia en las células epiteliales, siendo los ácidos siálicos con enlace α 2,3 de localización apical, mientras que los ácidos siálicos con enlace α 2,6 tienen una distribución más amplia en la célula (13). La neuraminidasa tiene como papel específico retirar los residuos de ácido siálico presentes en la superficie celular, para que la hemaglutinina del virus que emerge de la célula infectada no permanezca ligada a los receptores de ácido siálico y de esta manera el virión pueda ser liberado de la célula (10,11). La proteína M2 sólo se encuentra en la membrana del virus influenza A y sirve de bomba de protones, durante el proceso de desnudamiento viral (10,11).

Las nucleocápsides son complejos sensibles a las ARNasas, por lo que los especímenes clínicos para estudios moleculares deben tener una estricta cadena de frío hasta su arribo al laboratorio. Los segmentos genómicos están formados por una cadena de ARN, una molécula de nucleoproteína por cada 27 nucleótidos y un complejo enzimático (ARN polimerasa) formado por tres proteínas: PB1, PB2 y PA (10,11).

El genoma viral del virus influenza A está formado por ocho segmentos de ARN de cadena sencilla de polaridad negativa, de diferente tamaño; estos segmentos genómicos codifican para 11 proteínas diferentes (10). El genoma viral por su polaridad negativa no puede ser leído directamente por los ribosomas; para la formación de los ARNm el agente infeccioso codifica y empaqueta su propia ARN-transcriptasa ARN dependiente que se asocia a cada segmento de ribonucleoproteína y el ARNm es formado después que la partícula viral se ha desnudado en la célula blanco (10,11).

Historia natural de la infección

El virus influenza se transmite de persona a persona por vía aérea, gracias a la presencia de virus en las gotas de saliva expelidas mediante los accesos de tos, estornudo o al hablar (14-16). Las manos contaminadas con secreciones respiratorias pueden ser una fuente de transmisión entre personas, gracias a que con frecuencia las manos se colocan en contacto con los ojos, la nariz y la boca (14,15). El período de incubación de la enfermedad es corto, varía de 24 a 96 horas, en promedio 48 horas; la variación del período de transmisión puede estar relacionada con el tamaño del inóculo (14,15).

Los diferentes estudios muestran una variabilidad en la frecuencia de síntomas, quizá debido a la diferencia de los datos analizados en las distintas encuestas (15) o a diferencias en el comportamiento del agente infeccioso en el transcurso de las diferentes epidemias (8,15,16).

El virus se disemina por vía aérea después de la exposición a aerosoles, siendo el tamaño del inóculo requerido para iniciar el proceso infeccioso (1 a 5 unidades infectantes en cultivo [TCID₅₀]) muy pequeño (16).

El virus permanece infectante después de ser aerosolizado por un día en condiciones de humedad relativa baja (17 a 24%) y sólo por una hora en medios con alta humedad; la transmisión por utensilios infectados no es muy clara. La tasa de ataque es de 70% después de la exposición a una fuente común como el confinamiento en un espacio cerrado (16).

El virus influenza causa enfermedad en la mayoría de las personas expuestas; la severidad de las manifestaciones sin embargo, dependerá de la inmunidad previa que se tenga contra cepas virales antigénicamente relacionadas (16).

La infección tiene una amplia gama de manifestaciones que varía desde los cuadros asintomáticos, los cuadros leves o las neumonías virales severas que progresan hasta la muerte del paciente. La manifestación clínica más frecuente es la fiebre que ha sido reportada con el SOIV entre un 87 y 97% de los casos según diversas series de casos (8). La fiebre descrita en casos de influenza alcanza temperaturas de 38 a 40°C, tiene su pico máximo en las primeras 24 horas de la enfermedad, decrece en los siguientes tres días y desaparece hacia el sexto día; en algunos casos puede ocurrir un aumento de la fiebre hacia el día cuarto o quinto, dándole un curso bifásico característico (15-17).

El segundo síntoma más frecuente en la presente pandemia es la tos, informada en un 77 a un 92% de los casos en las diferentes casuísticas (8), en virus estacional la tos es inicialmente seca y progresa a tos productiva (15-17). El tercer síntoma en frecuencia de los pacientes es el ardor de garganta que se presenta entre un 33 a 82% (8). Otra manifestación informada es la rinorrea, presente en alrededor una tercera parte de los casos; disnea, escalofríos, malestar, mialgias, artralgias, y cefaleas ocurren con una frecuencia variable (8). En el curso de esta pandemia han

sido descritos cuadros clínicos con manifestaciones gastrointestinales como la diarrea informada entre 10 a 28% de casos y el vómito, presente entre un 15 a 46% de casos (8).

Desde el punto de vista topológico el virus influenza puede asociarse a diversas patologías. Los cuadros clínicos relacionados según la región del tracto respiratorio comprometida se clasifican en: resfriado común (rinofaringitis), faringitis, traqueobronquitis, laringotraqueobronquitis (crup), bronquiolitis y neumonía (15-17). La auscultación pulmonar es por lo general normal, aunque puede detectarse unos ruidos un poco rudos, con estertores aislados o roncocalocasionales. Por lo general, no se dan cambios radiológicos, aunque pueden presentarse infiltrados pulmonares intersticiales, locales o diseminados. Una vez han desaparecido los síntomas generales predominan los síntomas respiratorios con tos productiva y expectoración mucosa o purulenta (15-17).

Durante el proceso infeccioso el virus ejerce varios efectos en el hospedero que podrían resumirse como cambios en el tracto respiratorio (alteraciones del epitelio respiratorio, alteraciones en la función ciliar y aumento en la expresión de receptores bacterianos) y cambios en la respuesta inmune innata (18). La pérdida de revestimiento epitelial de las vías respiratorias altas o bajas es un factor que predispone a una mayor adherencia de las bacterias (19) y a complicación del cuadro clínico dando cuadros caracterizados por sobreinfección que se manifiesta como otitis media, sinusitis o neumonía (15-17). En la reciente pandemia en México la evolución clínica se caracterizó por las neumonías severas, los hallazgos radiológicos con múltiples focos de infiltrados nodulares, alveolares y en menor grado opacidades basales; estos cuadros evolucionaron rápidamente a síndromes de dificultad respiratoria junto con insuficiencia renal

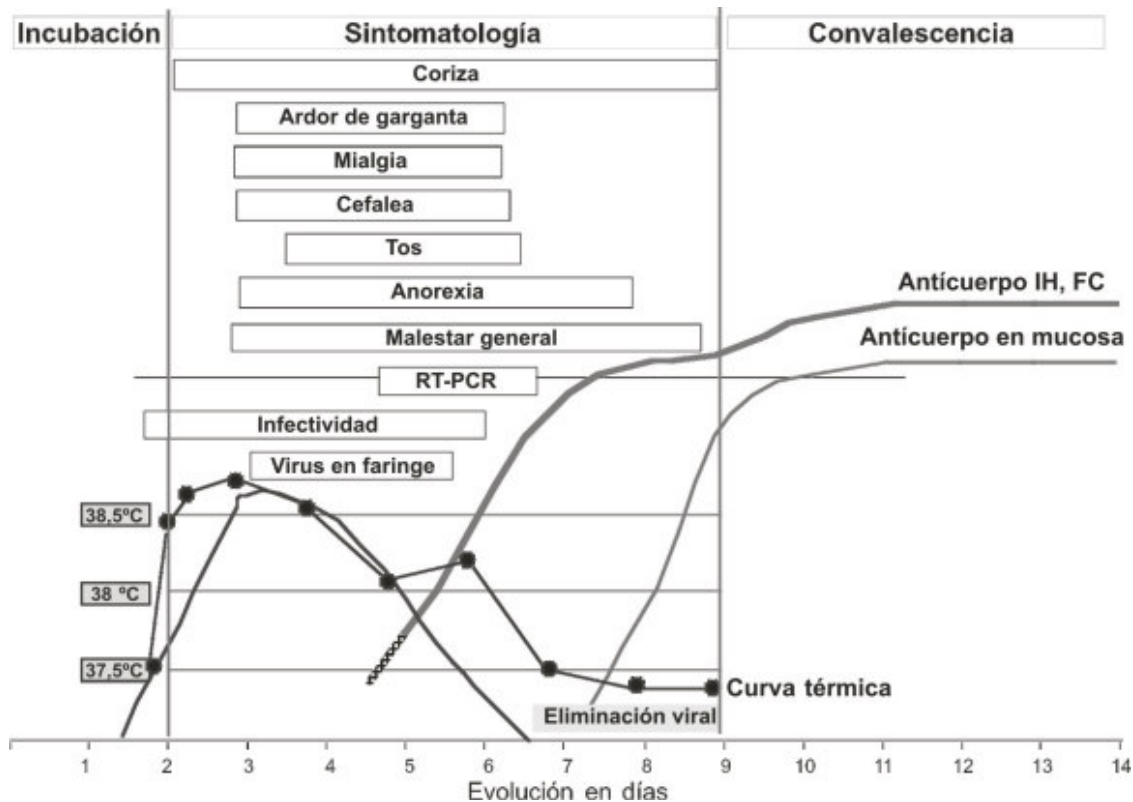


Figura 1. Evolución de diferentes marcadores biológicos, clínicos y curva térmica en caso de infección por virus de la gripe estacional. RT-PCR: detección del virus mediante métodos de retrotranscripción y amplificación genómica. IH: anticuerpos detectados por pruebas de inhibición de la hemaglutinación. FC: anticuerpos detectados por pruebas de fijación del complemento.

y daño multiorgánico en 24 por ciento de casos mortales (8). En una serie de casos mortales en México pudo ser comprobada en la admisión (en tres casos) signos de infección bacteriana: empiema, neumonía necrosante, neumonía asociada a ventilador (8). Mediante la utilización de pruebas moleculares en 21 casos de infección severa se pudo determinar que dos pacientes presentaban coinfección, uno por *Streptococcus pneumoniae* y otro por adenovirus (8) (Figura 1).

Diagnóstico virológico

Las infecciones virales del tracto respiratorio son las entidades más frecuentes en patología hu-

mana, las cuales ocasionan entre seis y nueve episodios al año en niños y entre dos y cuatro cuadros clínicos en adultos. Tienen un alto costo directo por los gastos médicos que implican, pero además pueden conllevar costos asociados a consultas médicas, tratamientos, hospitalizaciones y al aumento del ausentismo escolar o laboral (20). El diagnóstico viral específico permite un tratamiento acorde a la etiología de la enfermedad y disminuye los costos asociados a la sobreprescripción de antibióticos. Puesto que las manifestaciones clínicas no son suficientes para establecer un diagnóstico etiológico preciso, el laboratorio clínico es la única herramienta que permite establecer una causa precisa, permite iniciar una terapia específica, acortar el tra-

tamiento, dirigir la vigilancia epidemiológica y disminuir costos innecesarios (20-22).

En un estudio se pudo demostrar que el conocimiento de la etiología viral permitía disminuir el consumo de antibióticos, el uso de pruebas diagnósticas suplementarias (hemogramas, hemocultivos, radiografías de tórax, parciales de orina y urocultivos), acortaba la estancia hospitalaria y los costos generales de atención médica, con respecto al grupo control en el cual los médicos no tratantes desconocían el resultado del diagnóstico virológico (23).

Muestra clínica

Como regla general podemos afirmar que los resultados de laboratorio clínico diagnóstico nunca podrán sobrepasar la calidad del espécimen clínico enviado para análisis diagnóstico (24). Los tipos de muestras clínicas incluyen entre otros los siguientes: el hisopado nasofaríngeo, el aspirado nasofaríngeo, el lavado nasofaríngeo, el lavado broncoalveolar y la biopsia de tejido pulmonar. La toma de muestra debe seguir estrictamente los protocolos suministrados por los laboratorios diagnósticos, con el fin de obtener los mejores resultados (21,24). Los escobillonajes nasal u orofaríngeo son muestras de fácil realización, pero la sensibilidad para la detección de virus respiratorios con esta técnica es menor (21).

Hay dos elementos fundamentales que condicionan la calidad de la muestra clínica: la celularidad del espécimen y el medio de transporte utilizado. La temperatura de transporte es fundamental por cuanto los títulos virales disminuyen sensiblemente cuando la muestra es mantenida a temperatura ambiente (alrededor de 25°C). En resumen, la muestra clínica debe transportarse a 4°C o a -70°C y en medio de transporte virológico que estabilice las partículas virales presentes (25).

El virus influenza no se replica en las células de la faringe; por lo tanto, las muestras tomadas de hisopado faríngeo no son muy útiles para el diagnóstico virológico. La muestra debe contener células epiteliales respiratorias tomadas apoyándose sobre las paredes de las fosas nasales para desprender el mayor número de células o por aspirado nasofaríngeo, traqueal o bronquial o, en algunos casos, mediante la obtención de material de lavado broncoalveolar (25). Por razones de comodidad y rendimiento la mejor opción para la toma de muestra en pacientes pediátricos es el aspirado e hisopado nasofaríngeos con la ayuda de dispositivos estériles (21).

Métodos diagnósticos

Los métodos diagnósticos pueden agruparse en dos grupos: las pruebas directas y las pruebas indirectas de diagnóstico (Tabla 1).

Métodos indirectos de diagnóstico. Los métodos indirectos de diagnóstico viral se basan en la detección de la respuesta inmune humoral frente a un agente infeccioso. La serología se define como la prueba diagnóstica que permite la detección de anticuerpos específicos (24). Como lo muestra la figura 1, la respuesta inmune es demorada y los anticuerpos específicos aparecen después de la primera semana de infección. Por otra parte, la persona infectada puede poseer anticuerpos producidos por episodios previos de infección; por lo tanto, para que la prueba sea concluyente debe compararse los títulos de anticuerpos en sueros pareados (muestras tomadas durante las fases aguda y de convalecencia de la enfermedad) (24). Por su demora para dar resultados, las pruebas serológicas no son de utilidad clínica para el manejo del paciente durante la fase aguda y sólo tienen interés epidemiológico (16,17,24,25). Los sueros pareados deben procesarse en un mismo ensayo para que los resultados sean correctamente interpretados.



Tabla 1. Comparación de las pruebas virológicas de diagnóstico de infección por virus influenza

PRUEBA	TIPO DE ENSAYO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Aislamiento viral	Cultivos celulares	Amplio rango de detección Mayor sensibilidad que las pruebas rápidas Informa sobre la infectividad del virus detectado. Aislamiento viral disponible para otros estudios virológicos (tipificación, subtipificación, caracterización antigénica, selección de cepas vacunales).	Requiere mayor tiempo Requiere técnico experto. Infraestructura costosa
	Inmunofluorescencia	Resultado rápido Detecta células infectadas. Buenas sensibilidades. Excelente especificidad.	Por lo general menos sensible que el cultivo. Necesidad equipo robusto. Técnico experto Limitado a tipo viral (A o B).
		Inmunocromatografía	Resultado muy rápido. No requiere técnico entrenado No requiere equipo robusto. Detecta virus no viable. Buena especificidad. Utilidad en medio clínico
Detección de antígenos	ELISA	Útil en número elevado de muestras.	No hay pruebas comerciales disponibles
	RT-PCR	Detecta virus no viable. Mayor sensibilidad No tan relacionada con la calidad del espécimen clínico. Detecta infecciones múltiples. Posible detectar nuevos patógenos Puede inactivarse el patógeno	Requiere equipo robusto y técnicos entrenados. Aún no funciona como prueba rápida de aplicación clínica amplia. No informa sobre la infectividad (replicación y rol patógeno) del virus detectado.
		rt-RT-PCR	Detecta virus no viable. Mayor sensibilidad Posibilidad de contaminación menor. Detecta infecciones mixtas. No requiere procesamiento pos-PCR. Es cuantitativa.
	PCR múltiplex	Permite la detección de hasta 15 agentes virales distintos (incluido el virus influenza) en un solo ensayo de laboratorio	Costo elevado. Algunas pruebas requieren de equipos de laboratorio sofisticados.
	Microarreglos moleculares	Detecta virus no viable. Sensibilidad y especificidad altas. Detecta infecciones mixtas. Puede involucrar múltiples patógenos	Requiere equipos robustos. Requiere personal entrenado. Costo elevado. No informa sobre la infectividad (replicación y rol patógeno) del virus detectado.

ELISA: ensayo inmunoenzimático. **RT-PCR:** retrotranscripción y amplificación en cadena de la polimerasa.
rt-RT-PCR: retrotranscripción y amplificación en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Métodos directos de diagnóstico. El diagnóstico virológico de la infección por virus influenza en la fase aguda de la enfermedad se apoya en la detección de componentes virales presentes durante la fase de replicación viral (21,24,25). Los métodos directos de diagnósticos se basan en técnicas que permiten el aislamiento viral, la detección de antígenos virales y la detección del genoma viral; este último método emplea diagnóstico molecular (15-17,24,25).

Aislamiento viral. El virus influenza presente en los especímenes clínicos puede ser cultivado mediante inoculación amniótica en huevos embrionados o en monocapas de células de mamífero (15-17,24,25). En los últimos años han ocurrido cambios en la hemaglutinina viral que dificultan su aislamiento en huevos embrionados; sin embargo, es de gran utilidad en el aislamiento de virus influenza zoonótico de origen aviar (16). La disponibilidad de huevos embrionados de once días, libres de patógenos, no siempre es fácil en países en vías de desarrollo, por lo que es más frecuente el empleo de líneas celulares. Las líneas celulares continuas de riñón canino, de monos rhesus, de babuinos o pollos son usadas con frecuencia (15,16). La línea celular MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) es la que se utiliza de una manera más amplia, ya que posee receptores de tipo sialidásico, que permiten la unión y el ingreso de la partícula viral (11, 15,16, 21, 25). El rendimiento del aislamiento viral mejora, utilizando tripsina para asegurar el clivaje de la hemaglutinina viral en las proteínas H1 y H2, necesarias para la infectividad viral en cultivo celular (15). El rendimiento del aislamiento viral se incrementa centrifugando el espécimen clínico sobre la monocapa de células (25). Dado que el virus es relativamente lábil se requiere que el espécimen clínico sea transportado en medio de transporte viral (VTM); este medio protege la partícula viral de su degradación (15-17, 24, 25).

El transporte del espécimen clínico debe ser rápido y manteniendo la cadena de frío para garantizar la viabilidad de la muestra (24). El virus influenza A puede demorar en producir alteración sobre la monocapa de células (efecto citopático [ECP]) o no producirlo. El ECP también puede ser inespecífico o difícil de detectar; por esta razón, la evidencia de la presencia viral se obtiene mediante el uso de anticuerpos específicos utilizando métodos de inmunofluorescencia indirecta o sospecharse por resultados en pruebas de hemadsorción (unión de eritrocitos a células infectadas que expresan la hemaglutinina viral). El empleo del denominado sistema “*shell vial*” puede dar resultados a las 24-48 horas de inoculación (16,24).

Se ha utilizado una variante del sistema de cultivo celular “*shell vial*” denominado R-Mix el cual constituye una mezcla de dos líneas celulares (MyLu [*Mink Lung Cells*] y A549 [*Human Lung Carcinoma Cells*] para el aislamiento de rutina de ocho virus respiratorios (influenza A y B, virus para influenza 1, 2 y 3, virus respiratorio sincitial, metapneumovirus y adenovirus), eliminando la necesidad del uso de cultivos virales primarios. A pesar de sus dificultades técnicas y su demora relativa que limitan el uso del aislamiento viral de rutina en laboratorios de virología clínica, el cultivo celular sigue siendo la técnica de referencia con la que se comparan otros métodos diagnósticos; es una herramienta indispensable para realizar el seguimiento de la variabilidad genética y antigénica del virus y permite seleccionar los aislamientos virales que puedan ser introducidos en una estrategia vacunal (21,24). Los estudios genéticos amplios requieren de aislamientos virales en los que se puedan realizar los análisis de las diferentes regiones genómicas y los ensayos de patogénesis viral.

Identificación de antígenos virales. Los métodos para la detección de antígenos se basan



en la identificación de proteínas virales presentes en el espécimen clínico; estos métodos no requieren la presencia de una partícula viral viable, por lo que las condiciones de transporte no juegan un papel tan radical en los resultados finales (21). Los métodos de identificación de antígenos virales se basan en técnicas de inmunofluorescencia (I.F.I.), ensayo inmunoenzimático (Elisa o E.I.A) y en técnicas de inmunocromatografía.

•**Inmunofluorescencia:** la inmunofluorescencia es una de las técnicas más efectivas para el diagnóstico viral rápido (24). Los antígenos virales específicos (nucleoproteínas [NP] o proteínas de matriz [M1]) pueden ser detectados al interior de células descamativas del tracto respiratorio con la ayuda de anticuerpos monoclonales específicos del tipo viral Influenza A o B (25). El espécimen clínico más adecuado para este tipo de prueba es el aspirado nasofaríngeo; este tipo de muestra clínica provee la mejor calidad de espécimen para encontrar las células epiteliales respiratorias (11,15-17,24,25). Además de la calidad del espécimen clínico, la sensibilidad de la prueba depende de la calidad de los reactivos empleados y la destreza del examinador; comparada con el cultivo celular, la sensibilidad de las pruebas de inmunofluorescencia varía según los estudios de 65 a 100% (21,24).

En algunos informes se estima que la sensibilidad de detección de las pruebas de inmunofluorescencia es mayor para los virus influenza A que influenza B (71,6% y 51,3%, respectivamente) (25).

•**Pruebas de ensayo inmunoenzimático (E.I.A.):** las pruebas de ensayo inmunoenzimático detectan antígenos virales utilizando métodos de captura por anticuerpos específicos. Estas pruebas han sido realizadas en forma restringida por los laboratorios locales. Comparadas con los aisla-

mientos virales las pruebas EIA tienen una sensibilidad variable de 50 a 90% (26). Por la necesidad de múltiples controles positivos y negativos y la realización de múltiples pruebas en un sólo ensayo, estas técnicas no han sido ampliamente utilizadas en la práctica clínica.

•**Inmunocromatografía:** este método constituye una variedad de EIA; la técnica permite detectar la presencia de antígenos virales sobre membranas en las cuales se ha preabsorbido un anticuerpo específico del virus buscado (influenza A o influenza B). Dada su rápida y fácil elaboración, la ejecución por personal no entrenado y la no necesidad de equipos costosos, estas técnicas han sido objeto de estudios recientes (27-29). Los estudios comparativos de estas técnicas diagnósticas sitúan la sensibilidad entre 47 y 92% con respecto al cultivo (25,27-29).

La especificidad de la prueba comparada con el cultivo varía entre el 92-100%. La sensibilidad de estas pruebas diagnósticas es mayor para virus influenza A que para virus influenza B y la sensibilidad se ve favorecida cuando las pruebas se realizan durante los períodos epidémicos (28). Estas pruebas permiten la identificación del agente viral en muy corto tiempo (20 a 30 minutos) por lo que se adaptan fácilmente a la toma de decisiones clínicas (25,27-29). Las técnicas rápidas fueron evaluadas al inicio de la pandemia por virus influenza A H1N1 de origen porcino y se pudo comprobar que la sensibilidad de detección de este nuevo virus es similar a la del virus endémico. Desde el punto de vista cuantitativo estas pruebas detectan *in vitro* títulos virales similares en caso de SOIV y virus estacional. Durante la actual pandemia, algunas pruebas de diagnóstico viral rápido, permitieron realizar tamizaje de pacientes con síntomas similares a influenza, que consultaron en hospitales locales de la Ciudad de New York (30,31).

Dos pruebas rápidas (*BinaxNOW* y *3M Rapid Detection Flu A+B*) fueron evaluadas en el transcurso de la actual pandemia en la ciudad de New York; de los 6090 especímenes clínicos analizados se pudo concluir que, comparadas con el aislamiento viral, las pruebas utilizadas permitían la detección del virus influenza A H1N1 SIOV: la sensibilidad de las pruebas de detección del antígeno fue de 23,8% para todos los subtipos de influenza A combinados (H1,H3 y nuevo H1N1) y de 21,2% para virus influenza A H1N1 SIOV, comparadas con el cultivo R-mix (31). Comparando las pruebas *BinaxNOW* de detección de antígeno viral por métodos inmunocromatográficos con los métodos de inmunofluorescencia, la prueba *BinaxNOW* presentó una sensibilidad de 29,8% para todos los subtipos de influenza A combinados (H1, H3 y nuevo H1N1) y de 30,6% para virus influenza A H1N1 SIOV. Las pruebas de inmunocromatografía dan mejores resultados en caso de pacientes que eliminen virus con títulos elevados.

- Identificación de genoma viral: todas las pruebas de diagnóstico molecular tienen como principio fundamental la capacidad de los ácidos nucleicos de unirse o hibridarse con secuencias de ácidos nucleicos que le son complementarias (21,22,24). Las infecciones respiratorias son causadas por una gran variedad de virus que pertenecen a un gran número de familias virales distintas con diversos tipos y conformaciones de material genético (32). Las pruebas de diagnóstico viral se basan en la identificación de secuencias genómicas únicas que pueden ser copiadas, amplificadas, cortadas con enzimas de restricción y alineadas con secuencias complementarias en diversas técnicas de laboratorio. El tamaño pequeño del material genético permite que el conocimiento y secuenciación sean más sencillos para los virus que para otros agentes infecciosos (24). Inicialmente, las técnicas de amplificación genómica fueron estandarizadas

para detectar un sólo virus, pero luego fueron diseñadas para la detección simultánea de múltiples agentes infecciosos, permitiendo detectar los virus más frecuentes, entre ellos el virus influenza (22).

RT PCR. La amplificación genómica por métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) requiere de la retrotranscripción (RT) del ácido ribonucleico (ARN) genómico. Los métodos de amplificación genómica no requieren de la presencia de virus infeccioso, por lo que las condiciones de calidad, cantidad, recolección, transporte y conservación no son tan delicadas como cuando se intenta realizar el aislamiento viral (22). Sin embargo, los tejidos poseen ARN asasa que pueden degradar el genoma viral. La alta sensibilidad de la RT-PCR permite que pueda ser detectada la presencia del genoma viral inclusive hasta cinco a seis días después de iniciado el cuadro clínico, momento en el cual otras pruebas diagnósticas incluido el cultivo celular son mucho menos sensibles. La especificidad de algunas pruebas genómicas permite que no sólo sea identificada la presencia del virus influenza, si no que, además, permite reconocer el género (A o B), el tipo de hemaglutinina (H1, H3, H5), la variante genómica H1N1 de origen porcino y la presencia o no de resistencia a la amantadina o a los inhibidores de la neuraminidasa (16).

rt-RT PCR (PCR en tiempo real). Este método de amplificación es rápido y sensible y ha permitido confirmar la presencia específica del virus influenza AH1N1 SOIV (33,34). Las pruebas rt-RT-PCR utilizan diferentes genes blanco que incluyen la proteína de matriz y la hemaglutinina (33,34). Las pruebas de PCR en tiempo real eliminan el paso de confirmación postamplificación, lo cual disminuye el tiempo de respuesta de resultados y elimina el riesgo de contaminación por productos de amplificación.



Estas pruebas diagnósticas fueron rápidamente diseñadas e implementadas en Estados Unidos, el Reino Unido y Australia permitiendo a las autoridades sanitarias responder adecuadamente al diagnóstico de casos índice, contactos y personas sospechosas de estar infectadas por este nuevo agente infeccioso (33). La prueba estandarizada en el centro de control de enfermedades (CDC) de los Estados Unidos fue enviada a laboratorios estatales y otros países de la región. Como queda comprobado, los métodos moleculares permiten una respuesta rápida y específica para la detección de virus que emerjan en el ámbito mundial.

Sistemas múltiplex de detección. El desarrollo de las técnicas de detección de ácidos nucleicos ha permitido la implementación de métodos de amplificación de genomas virales de una gran variedad de agentes infecciosos con genoma de tipo ADN o ARN. El desarrollo de estas pruebas ha permitido la amplificación de varios genomas blanco en un mismo tubo; este método permite disminuir los errores por manipulación de muestras, disminuye los costos por ensayos individuales y mejora la oportunidad de respuesta de los resultados.

Panel de virus respiratorios (Luminex xTAG respiratory virus panel RVP). Debido a la emergencia de nuevos virus respiratorios se han diseñado nuevas pruebas diagnósticas para poder detectar la presencia de los virus endémicos, epidémicos y estos nuevos agentes infecciosos. Recientemente se desarrolló una prueba diagnóstica basada en métodos de PCR múltiplex que permite identificar por métodos espectrofotométricos los productos de amplificación de doce tipos distintos de virus respiratorios y nueve subtipos virales en una sola prueba (35). La prueba es útil para la detección de virus influenza A y B, virus parainfluenza 1, 2, 3 y 4, virus respiratorio sincitial, adenovirus, metapneumovirus hu-

mano, rinovirus, enterovirus y coronavirus. Además, esta prueba es capaz de subtipificar los virus influenza A en H1, H3, H5, los virus respiratorios sincitial en subtipos A y B y los coronavirus en OC43, 229E, NL63 y HKU1 (34).

Durante la pandemia de virus influenza SOIV el RVP mostró una gran posibilidad de identificar los virus influenza A y B de tipo estacional, de discriminar los subtipos H1 y H3 y diferenciar estos virus del virus pandémico, el cual fué reportado por este método como no tipificable (31). Ciento una muestras clínicas identificadas como influenza A y que no fueron subtipificadas por la prueba RVP, fueron procesadas con la prueba rtRT-PCR del CDC y se pudo confirmar que 99 correspondían al virus influenza A H1N1 SOIV (36).

Respifinder. Otro método de amplificación de múltiples blancos genómicos es el denominado sistema Respifinder® (37). El Respifinder está basado en la tecnología de amplificación de señal acoplada a un sistema de detección por electroforesis en tubo capilar MLPA (por multiplex ligation probe amplification) que permite la detección de varios genomas virales presentes en la muestra. Este sistema de análisis permite la detección de 15 virus respiratorios (rinovirus, influenza A y B, Influenza A H5N1, metapneumovirus humano, adenovirus, virus parainfluenza 1, 2, 3 y 4, virus respiratorio sincitial A y B, y coronavirus NL63, coronavirus OC43, coronavirus 229E) y cuatro bacterias de difícil cultivo *Legionella pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Bordetella pertussis*.

Este sistema permite identificar como virus influenza la nueva variante SOIV, pero para su diagnóstico específico de variante viral se requiere de PCR en tiempo real específicas para las proteínas N y M del virus pandémico.

Discusión y análisis

El examen clínico no puede discriminar la etiología viral de más de 200 agentes virales distintos que pueden causar infección respiratoria aguda. Las infecciones respiratorias del tracto respiratorio bajo son una causa frecuente de hospitalización y entre los agentes implicados, el virus influenza juega un rol importante. Debido a que la infección por virus influenza tiene una amplia gama de manifestaciones clínicas, el diagnóstico etiológico basado únicamente en criterios clínicos es incierto y difícil.

Existen múltiples pruebas diagnósticas que permiten confirmar la sospecha clínica de infección por virus influenza. En el contexto de la utilidad clínica es indispensable poder confirmar la etiología específica del virus influenza con el fin de poder ofrecer en las primeras 48 horas una terapia antiviral que disminuya la excreción viral, acorte el curso de la enfermedad y permita disminuir el impacto de salud pública de este nuevo virus pandémico.

Los recursos y la disponibilidad de medicamentos son limitados y deben ser usados de una manera razonable y con precaución, por cuanto existe una gran incertidumbre en cuanto a la duración de la pandemia, a los segundos picos epidémicos o los eventuales cambios en la virulencia del agente infeccioso.

El tratamiento indiscriminado de todos los casos clínicos compatibles con influenza puede malgastar un recurso costoso y escaso en momentos de una segunda o tercera oleada epidémica. El uso adecuado de las pruebas diagnósticas, puede ayudar al médico tratante a tomar decisiones soportadas y racionales. Las bondades y limitaciones de las pruebas diagnósticas (Tabla 1) deben ser analizadas por el personal médico responsable de la prestación de servicios de sa-

lud, para tener claridad en cuanto a la escogencia de una de ellas para su uso en la práctica clínica corriente.

Si se comparan los métodos no moleculares, la sensibilidad de detección de las diferentes pruebas diagnósticas es muy variable y dependiente de múltiples factores, entre los que cuentan la variabilidad del virus influenza en los distintos períodos epidémicos (37). Entre los factores que influyen en los resultados tenemos los siguientes: el tipo y la calidad del espécimen clínico, el período de toma de la muestra dentro del curso de la infección, la edad del paciente, el método diagnóstico empleado y el blanco de detección viral (cambios antigénicos en la proteína blanco). Se debe resaltar que el mejor espécimen clínico lo constituyen los aspirados y lavados nasofaríngeos (la muestra tiene una mayor carga viral si se toman células epiteliales del tracto respiratorio), el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas (más adecuado para el muestreo es hacia las 24-48 horas iniciales del cuadro clínico), los mejores resultados se obtienen en la población pediátrica y de las técnicas rápidas la que mayor sensibilidad informa es la inmunofluorescencia directa. Todas estas condiciones ideales desafortunadamente no son fáciles de tener en la práctica diaria, pero el médico tratante debe tener en cuenta al momento de interpretar y conocer las limitaciones de los resultados (38,39).

El aislamiento viral en cultivo celular ofrece ventajas que pueden ser fundamentales en los laboratorios de referencia o de investigación por los ilimitados estudios virológicos posteriores que pueden ser realizados con los aislamientos virales (39). Desafortunadamente ni la infraestructura física, ni el personal entrenado están disponibles en la mayoría de laboratorios hospitalarios de los países subdesarrollados. Tan solo algunos laboratorios de referencia nacional cuentan con



la infraestructura para procesar y aislar el virus influenza circulante.

Las técnicas de diagnóstico rápido basadas en inmunofluorescencia, inmunoensayo enzimático o inmunocromatografía requieren altas cantidades de antígeno presentes en las muestras clínicas (10^5 - 10^6 partículas virales) y por ende estas condiciones deben favorecerse al momento de la toma de la muestra, cuando no se dispone de otra herramienta diagnóstica con mayor sensibilidad (40). Las pruebas rápidas tienen una alta especificidad pero su sensibilidad es baja, sobre todo en los pacientes mayores de 40 años. Estas pruebas son expeditas y no requieren ni personal técnico, ni equipos sofisticados, por lo que, brindan un recurso práctico en ausencia de un laboratorio virológico sofisticado (21,25,37).

Si se cuenta con un microscopio de fluorescencia se puede capacitar al personal de laboratorio con el fin de realizar el panel viral para los ocho agentes virales detectables con este procedimiento (incluidos los virus influenza A y B), dado que son pruebas de gran sensibilidad que aportan una amplia gama de información. Durante los períodos no epidémicos, las pruebas de IFI tienen una mayor sensibilidad que las pruebas rápidas no-IFI para la detección de antígenos virales (38). Existen preparaciones que emplean mezclas de anticuerpos que permiten detectar un conjunto de agentes infecciosos y en caso de resultado positivo se puede entrar a diferenciar el agente causal específico; este método puede economizar tiempo y recursos.

Los métodos de detección molecular son muy sensibles y por tanto han marcado un nuevo hito en el diagnóstico virológico (41,42). Los métodos de diagnóstico molecular y la secuenciación parcial de los genes de la hemaglutinina y neuraminidasa permite inclusive detectar las mutaciones genéticas asociadas a la resistencia

a los antivirales como el Tamiflu® (43). Desde su aparición las pruebas de diagnóstico molecular han demostrado mayor sensibilidad que los aislamientos virales y si bien aún no son de fácil disposición del médico tratante pueden ser más fáciles de implementar en un laboratorio clínico no muy sofisticado (42).

Las técnicas son sensibles, específicas, permiten detectar infecciones mixtas, su espectro se puede ampliar a múltiples agentes infecciosos virales, bacterianos o micóticos y pueden cambiar en un futuro el manejo adecuado de los pacientes hospitalizados al identificar al agente etiológico (39, 42, 44). La sensibilidad de las pruebas rápidas se ve incrementada por la presencia de títulos virales elevados, los especímenes clínicos positivos en un número menor de ciclos de amplificación mostraron mejores resultados que aquellos que requirieron un número mayor de ciclos, la duración de la enfermedad también juega un papel importante en la sensibilidad de las pruebas rápidas, disminuyendo en pacientes con períodos de evolución de más de siete días, quizá este factor también esté relacionado con la tasa de eliminación de virus (42).

Desde la publicación de la secuencia genómica del virus influenza AH1N1 de origen porcino, se desarrollaron varios métodos diagnósticos moleculares que han prestado un gran servicio a la identificación de las personas infectadas, permitiendo la rápida intervención de las autoridades de salud pública para minimizar el riesgo de expansión (33,36). La escasez de centros en donde se pueda llevar a cabo esta prueba diagnóstica ha demostrado en la práctica que para su aplicación en el campo clínico aún falta un gran camino que recorrer. En un futuro próximo, es necesario permitir que estas pruebas se realicen en múltiples centros diagnósticos y asistenciales, para que la confirmación diagnóstica se realice de una manera rápida y

oportuna, para que de esta manera las pruebas tengan alguna utilidad en la práctica clínica. Los plazos para la obtención de resultados, que en muchos casos son mayores a seis o más días, elimina toda las ventajas que pueden suministrar estas pruebas como aporte al campo terapéutico, profiláctico y de contención epidémica. En este punto se debe resaltar que el oseltamivir (Tamiflu®) tiene una mayor eficacia cuando se administra en las primeras 48 horas de iniciado el cuadro clínico (15, 16).

Finalmente, es necesario recalcar que fuera del diagnóstico virológico hay una gran duda que se presenta en el manejo clínico de los pacientes infectados por el virus influenza. La sobreinfección bacteriana en el curso de la infección viral ha sido motivo de estudio amplio, obteniendo en algunos casos resultados controvertidos (45,46). En los primeros casos reportados de la epidemia de virus influenza, la mortalidad fue asociada al virus influenza mismo y no a coinfecciones bacterianas (47,48). Los reportes de coinfección bacteriana en niños fallecidos por influenza se ha incrementado en los Estados Unidos de América en los últimos años, pasando de 6% a 34% de los casos en el transcurso de los últimos tres periodos epidémicos (45). El agente infeccioso más frecuentemente reportado en niños hospitalizados y fallecidos ha sido el *Staphylococcus aureus* (45,49), el cual ha mostrado en más de la mitad de los casos (seis de 11 aislamientos) ser resistente a la meticilina (50). Es necesario estar atento a las características clínicas de los pacientes en las condiciones de los diferentes ámbitos hospitalarios para poder ofrecer el mejor de los tratamientos médicos incluyendo tanto a los patógenos virales, como a las eventuales sobreinfecciones bacterianas que puedan presentarse; las herramientas de diagnóstico rápido aportarán una gran ayuda en el momento de la toma de decisiones clínicas.

Los métodos de diagnóstico en caso de la infección por virus influenza deben ser continuamente reevaluados y validados por cuanto la rápida evolución genética y antigénica del agente infeccioso puede cambiar la sensibilidad de una misma prueba en el transcurso del tiempo.

Referencias

1. CDC. Update: swine influenza A (H1N1) infections—California and Texas, April 2009. MMWR 2009;58:435–7. 2. Fuente WHO. http://www.who.int/csr/don/2009_07_06/en/index.html.
3. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. N Engl J Med. 2009; 360: 2605-2615.
4. WHO Global Influenza Preparedness Plan. The role of WHO and recommendations for national measures before and during pandemics. World Health Organization. 2005.
5. **Heikkinen T, Järvinen A.** The common cold. Lancet 2003; 361: 51-59.
6. **Carrat F, Tachet A, Rouzioux C, Housset B, Valleton AJ.** Evaluation of clinical case definitions of influenza: detailed investigation of patients during the 1995–1996 epidemic in France. Clin Infect Dis 1999; 28: 283-290.
7. **Monto AS, Gravenstein S, Elliott M, Colopy M, Schweinle J.** Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. Arch Intern Med. 2000;160: 3243-3247.
8. WHO. Human infection with influenza A (H1N1) virus: clinical observations from Mexico and other affected countries. Wkly Epidemiol Rec. 2009; 84: 185-89. www.who.int/wer.
9. **Treanor JJ.** Respiratory infections. En Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. Clinical Virology. Third Edition. Washington DC. 2009; 7-27.
10. **Palese P, Shaw MI.** Orthomyxoviridae: the virus and their replication. En: Knipe DM, Howley PM (eds). Fields Virology. Wolters Kluwer Lippincot-Williams and Wilkins. Fifth edition. New York. 2007;1647-1689.
11. **Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y.** Orthomyxovirus. En: Knipe DM, Howley PM (eds). Fields Virology. Wolters Kluwer Lippincot-Williams and Wilkins, New York. Fifth edition. 2007; 1691-1740.



12. **Sawada T, Hashimoto T, Nakano H, Suzuki T, Ishida H, Kiso M.** Why does avian influenza A virus hemagglutinin bind to avian receptor stronger than to human receptor? Ab initio fragment molecular orbital studies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;351:40-43.
13. **Ulloa F, Real FX.** Differential distribution of sialic acid in α 2,3 and α 2,6 linkages in the apical membrane of cultured epithelial cells and tissues. *J Histochem Cytochem*. 2001; 49: 501-509.
14. **Glezen WP, Couch RB.** Influenza viruses. En: Evans AS, Kaslow RA. *Viral infections of humans: epidemiology and control*. New York. Fourth Edition. Plenum medical book company. 1997: 473-505.
15. **Zambon M, Potter CW.** Influenza. En: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, Griffiths PD, Mortimer P.(eds). *Principles and practice in Clinical Virology*. Wiley-Blackwell. 2009; 373-408.
16. **Hayden FG, Palese P.** Influenza virus. En: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. *Clinical Virology*. Washington DC. Tercera edición. ASM Press, 2009: 891-920.
17. **Naffakh N, Van der Werf S.** Orthomyxoviridae. En Huruau JM, Agut H, Nicolas JC, Peigue-Lafeuille H. *Traité de Virologie Médicale*. Paris. Estem. 2003: 439-457.
18. **McCullers JA.** Insights into the interactions between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev*. 2006;16:571-582.
19. **Avadhanul V, Rodriguez CA, DeVincenzo JP, Yan Wang Y, Webby RJ, Ulett GU, Adderson EE.** Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. *J Clin Virol*. 2006; 80: 1629-1639.
20. **Templeton KE.** Why diagnose respiratory viral infection? *J Clin Virol*. 2007; 40: S2-S4.
21. **Lereuz-Ville M.** Diagnostic virologique des infections respiratoires. *Rev Fr Allergol*. 2006; 46: 538-542.
22. **Brouard J, Vabret A, Perrot S, Nimal D, Bach N, Outterryck A, et al.** Virologie: l'apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic microbiologique en pneumopédiatrie. *Arch Ped*. 2007;14: S197-S202.
23. **Bonner AB, Monroe KW, Talley LI, Klasner AE, Kimberlin DW.** Impact of the rapid diagnosis of influenza on physician decision-making and patient management in the pediatric emergency department: results of a randomized, prospective, controlled trial. *Pediatrics* 2003;112: 363-367.
24. **Boivin G, Mazzulli T, Petric M, Couillard M.** Diagnosis of viral infections. En: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. *Clinical Virology*. Washington DC. Tercera edición. ASM Press, 2009: 265-294.
25. **Freymuth F, Vabret A, Petitjean J, Gouarin S, Gueudin M, Campet M.** Diagnostic de deux principales viroses respiratoires épidémiques: la grippe et le virus respiratoire syncytial. Place de la virologie moléculaire. *Med Mal Infect* 2000; 30: 191-200.
26. **Grandien M, Peterson CE, Gardner PS, Linde A, Stanton A.** Rapid viral diagnosis of acute respiratory infections: comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and the immunofluorescence technique for detection of viral antigens in nasopharyngeal secretions. *J Clin Microbiol*. 1985; 22: 757-760.
27. **Hurt AC, Alexander R, Hibbert J, Deeda N, Barr IG.** Performance of six influenza rapid tests in detecting human influenza in clinical specimens. *J Clin Virol*. 2007; 39:132-5.
28. **Chan K, Lam S, Puthavathan P, Nguyen T, Long H, Pang C, et al.** Comparative analytical sensitivities of six rapid influenza A antigen detection test kits for detection of influenza A subtypes H1N1, H3N2 and H5N1. *J Clin Virol*. 2007; 39: 169-171.
29. **Cruz AT, Cazacu AC, Greer JM, Demmler GJ.** Rapid assays for the diagnosis of influenza A and B viruses in patients evaluated at a large tertiary care children's hospital during two consecutive winter seasons. *J Clin Virol*. 2008; 41: 143-148.
30. **Chan KH, Lai ST, Poon LLM, Guan Y, Yuen KY, Peiris JSM.** Analytical sensitivity of rapid influenza antigen detection tests for swine-origin influenza virus (H1N1). *J Clin Virol*. 2009;45: 205-207.
31. **Ginocchio CG, Zhang F, Manji R, Arora S, Bornfreund M, Falk L, et al.** Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A H1N1 during the New York city outbreak. *J Clin Virol*. 2009;45: 191-195.
32. **Treanor JJ.** Respiratory infections. En: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. *Clinical Virology*. Washington DC. Tercera edición. ASM Press, 2009: 7-27.
33. **Whiley DM, Bialasiewicz S, Bletchly C, Faux CE, Harrower B, Gould AR, et al.** Detection of novel influenza A(H1N1) virus by real-time RT-PCR. *J Clin Virol*. 2009; 45: 203-204.
34. **Carr MJ, Gunson R, Maclean A, Coughlan S, Fitzgerald M, Scully M, et al.** Development of a real-time RT-PCR for the detection of swine-lineage Influenza A (H1N1) virus infections. *J Clin Virol*. 2009;

- 45: 196-199.
35. **Mahony J, Ching S, Merante F, Yaghoubian S, Sinha T, Janeczko R.** Development of a respiratory panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2965-2970.
 36. **Ginocchio CG, St George K.** Likelihood that an unsubtypeable influenza A virus result obtained with Luminex xTAG respiratory virus panel is indicative of infection with novel A/H1N1 (swine-like) influenza virus. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 2347-2348.
 37. **Reijans M, Dingemans G, Klaassen CH, Meis JF, Keijndener J, Mulders B, et al.** RespiFinder: a new multiparameter test to differentially identify fifteen respiratory viruses. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 1232-1240.
 38. **Petric M, Comanor L, Petti CA.** Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J Infect Dis.* 2006; 194: S98-S110.
 39. **Ginocchio CG.** Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods. *J Clin Virol.* 2007; 40: S11-S14.
 40. **Sambol Ar, Abdalmid B, Lyden ER, Aden TA, Noel RK, Hinrichs SH.** Use of rapid diagnostic test under field conditions as a screening tool during an outbreak of the 2009 novel influenza virus: practical considerations. *J Clin Virol.* 2010; 47: 229-233.
 41. **Leland DS, Ginocchio CG.** Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20: 49-78.
 42. **Fox JD.** Nucleic acid amplification test for detection of respiratory viruses. *J Clin Virol.* 2007;40:S15-S23.
 43. **Zepeda HM, Araujo LP, Zarate-Segura PB, Vázquez-Pérez JA, Miliar-García A, Garibay-Orijel C, et al.** Identification of influenza A pandemic (H1N1) 2009 variants during the first outbreak in Mexico city. *J Clin Virol* (2010), doi:10.1016/j.jcv.2010.02.008.
 44. **Rouleau I, Charest H, Douville-Fradet M, Skowronski DM, De Serres G.** Field performance of rapid diagnostic test for influenza in an ambulatory setting. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 2699-2703.
 45. **Falsey AR, Murata Y, Walsh EE.** Impact of rapid diagnosis on management of adults hospitalized with influenza. *Arch Intern Med.* 2007;167: 354-360.
 46. **Finelli L, Fiore A, Dhara R, Brammer L, Shay DK, Kamimoto L, et al.** Influenza-associated pediatric mortality in the United States: Increase of *Staphylococcus aureus* coinfection. *Pediatrics.* 2008; 122: 805-811.
 47. Hospitalized patients with novel influenza A (H1N1) virus infection-California, April-May, 2009. *MMWR.* 2009; 58: 536-541.
 48. Intensive-care patients with severe novel influenza (H1N1) virus infection-Michigan, June 2009. *MMWR.* 2009; 58: 749-752.
 49. **Krief WI, Levine DA, Platt SL, Macias CG, Dayan PS, Zorc JJ, Feffermann N.** Influenza virus infection and the risk of serious bacterial infections in young febrile infants. *Pediatrics.* 2009; 124: 30-39.
 50. CDC. Fluview. A weekly influenza surveillance report prepared by the influenza division. 2008-2009 influenza season. Week 34 ending august 29-2009. http://www.cdc.gov/flu/weekly/pdf/External_F0934.pdf