

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

Optimización del diagnóstico microbiológico de la gripe basada en la experiencia de la pandemia de gripe A (H1N1)v de 2009

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Paula López Roa

Directores

Emilia Bouza Santiago
Patricia Muñoz García-Paredes

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**OPTIMIZACIÓN DEL DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO
DE LA GRIPE BASADA EN LA EXPERIENCIA DE LA
PANDEMIA DE GRIPE A (H1N1)v DE 2009**



Doctorando: Paula López Roa

Director de Tesis: Dr. Prof. Emilio Bouza Santiago

Co-directora de Tesis:

Dra. Patricia Muñoz García-Paredes

MADRID, 2013

El Profesor D. Emilio Bouza Santiago, Jefe del Servicio de Microbiología Clínica y de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y Catedrático de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado” **Optimización del diagnóstico microbiológico de la gripe basada en la experiencia de la pandemia de gripe A (H1N1)v de 2009**” ha sido llevado a cabo bajo su dirección por Dña. Paula López Roa, y reúne las condiciones exigibles para ser presentado como tesis para aspirar a la obtención del título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado a



Prof. D. Emilio Bouza Santiago
Director de la tesis

DEDICATORIA

A mis padres por su gran esfuerzo

A mis amigos por su apoyo incondicional

**A mis jefes, adjuntos y compañeros, por sus
enseñanzas.**

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido posible gracias al esfuerzo y al trabajo de muchas personas. Por ello quiero expresar mis sinceros agradecimientos:

Al Dr. Emilio Bouza, mi director de tesis, por su apoyo, sus enseñanzas en el manejo diagnóstico de los pacientes con enfermedades infecciosas. Por haberme brindado la confianza y la oportunidad de formarme como residente e investigadora en el Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas del HGUGM.

A la Dra. Patricia Muñoz por su ayuda en la elaboración de las publicaciones y comunicaciones a congresos derivadas de esta tesis. Por su apoyo y sus enseñanzas.

A Pilar Catalán por su gran apoyo científico y personal en el diseño y en la elaboración de esta tesis

A la Dra. Maddalenna Giannella por su ayuda en los aspectos clínicos de este trabajo.

A Luis Alcalá por su participación en la parte estadística así como en la revisión de las publicaciones que no podría hacer hecho sin su valiosa colaboración.

A los técnicos de virología por su colaboración en el procesamiento de las muestras.

A los residentes, y becarios del Servicio de Microbiología por su amistad y apoyo incondicional que fueron un gran aliento día a día hasta la culminación de este trabajo.

A todos ellos, muchas gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN.....	12
SUMMARY IN ENGLISH.....	22
1. INTRODUCCIÓN.....	33
1.1. GRIPE E HISTORIA DE LAS GRANDES PANDEMIAS GRIPALES	
1.1.1. PANDEMIA DE 1918	
1.1.2. PANDEMIAS DE 1957 (H2N2) Y 1968 (H3N2)	
1.1.3. GRIPE AVIAR (H5N1)	
1.1.4. GRIPE HUMANA DE ORIGEN PORCINO	
1.1.5. NUEVA VARIANTE H2N2V	
1.2. VIRUS INFLUENZA: VIROLOGÍA	
1.2.1 CLASIFICACIÓN	
1.2.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES	
1.2.3. MORFOLOGÍA Y FUNCIONES BIOLÓGICAS	
1.2.4. CARACTERÍSTICAS DE NUEVO VIRUS A (H1N1)V DE 2009	
1.3. EPIDEMIOLOGÍA	
1.3.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA GRIPE ESTACIONAL O INTERPANDÉMICA	
1.3.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA PANDEMIA DE 2009 (H1N1)V	
1.4. ASPECTOS CLÍNICOS	
1.4.1. PATOGÉNESIS Y TRANSMISIÓN.	
1.4.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS HABITUALES	

1.4.3. COMPLICACIONES

1.4.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS ESPECIALES DE LA GRIPE PANDÉMICA DE 2009

1.5. PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS

1.5.1. MÉTODOS DIRECTOS

1.5.2. MÉTODOS INDIRECTOS

1.5.3. DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIVIRALES

1.6. TRATAMIENTO

1.6.1. INHIBIDORES DE LA NEUROAMINIDASA

1.6.2. ADAMANTANOS

1.6.3. RESISTENCIA A ANTIVIRALES

1.6.4. TERAPIA ANTIVIRAL

1.7. PROFILAXIS

1.7.1. QUIMIOPROFILAXIS

1.7.2. VACUNACIÓN

2.	CARENCIAS DE LA LITERATURA.....	95
3.	OBJETIVOS/ESTUDIOS.....	98
4.	ESTUDIO 1: COMPARACIÓN DE LA RT-PCR CON EL SV Y EL CULTIVO CONVENCIONAL EN LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE A (H1N1)V.....	108
	4.1. MATERIAL Y MÉTODOS	
	4.2. RESULTADOS	
	4.3 DISCUSIÓN	

5.	ESTUDIO 2: EXCRECIÓN VIRAL PROLONGADA EN PACIENTES CON GRIPE A (H1N1)V: SIGNIFICADO CLÍNICO Y ANÁLISIS DE LA CARGA VIRAL EN PACIENTES HOSPITALIZADOS.....	119
5.1.	MATERIAL Y MÉTODOS	
5.2.	RESULTADOS	
5.3.	DISCUSIÓN	
6.	ESTUDIO 3: IMPACTO CLÍNICO DE LA BUSQUEDA SISTEMÁTICA DE GRIPE EN PACIENTES INGRESADOS EN UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS.....	134
6.1.	MATERIAL Y MÉTODOS	
6.2.	RESULTADOS	
6.3.	DISCUSIÓN	
7.	ESTUDIO 4: ESTUDIO COMPARATIVO DE EXUDADO NASOFARINGEO VS. ASPIRADO TRAQUEAL EN EL DIAGNOSTICO DE LA GRIPE EN PACIENTES INGRESADOS EN UCIS.....	152
7.1.	MATERIAL Y MÉTODOS	
7.2.	RESULTADOS	
7.3.	DISCUSIÓN	
8.	CONCLUSIONES.....	161
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	164
10.	ARTICULOS PUBLICADOS.....	204

RESUMEN

Introducción

La pandemia de gripe A H1N1 creó la necesidad de incorporar pruebas de diagnóstico rápidas y precisas. Los CDC validaron una RT-PCR en tiempo real que fue ampliamente aceptada como técnica de referencia para la detección de la nueva variante de gripe A. Sin embargo, esta prueba no estaba disponible, o era factible para los laboratorios de Microbiología que venían realizando técnicas convencionales, como el cultivo viral en tubo o en shell vial.

La línea celular continua MDCK es una de las más utilizadas para el aislamiento del virus de la gripe en muestras respiratorias. La línea A549, comúnmente utilizada para el aislamiento de virus respiratorios, es moderadamente sensible para el aislamiento de virus de la gripe estacional, aunque no hay estudios que evalúen esta línea celular en la detección de la gripe pandémica A H1N1.

La gripe es una causa bien conocida de la enfermedad respiratoria aguda. Suele ser una infección autolimitada con síntomas respiratorios y sistémicos que generalmente se resuelve después de 3 a 6 días. La excreción viral puede durar entre 3 y 7 días. Sin embargo, un curso complicado de la enfermedad, exacerbación de enfermedades subyacentes y la necesidad de cuidados intensivos podría prolongar este tiempo. La persistencia de la excreción viral y la dinámica de la carga viral han recibido poca atención en pacientes hospitalizados con gripe estacional o pandémica. La mayoría de los estudios evalúan el impacto de la terapia antiviral, pero existen pocos datos en la literatura sobre el valor de la excreción viral prolongada (EVP) como marcador de mal pronóstico.

La gripe es una causa frecuente de admisión en unidades de cuidados intensivos (UCI) durante la temporada de gripe y pandemias. Sin embargo, esta

infección puede estar infradiagnosticada particularmente en pacientes con manifestaciones clínicas que pueden explicarse por causas infecciosas o no infecciosas alternativas. Además, la sospecha de gripe puede ser especialmente difícil cuando la función respiratoria falla o se deteriora en pacientes ya ingresados en la UCI. En realidad, la información sobre gripe nosocomial adquirida durante la estancia en la UCI es escasa e incompleta. El conocimiento temprano de la presencia del virus en pacientes ingresados en la UCI tiene evidentes consecuencias epidemiológicas, diagnósticas y terapéuticas.

Lo aspirados o exudados nasofaríngeos (ENF) se consideran las muestras de elección para la detección del virus de la gripe mediante RT-PCR en pacientes no intubados. En la mayoría de los pacientes ingresados en UCI están disponibles muestras del tracto respiratorio inferior (TRI) que además se extraen rutinariamente y podrían ser de utilidad para el diagnóstico de la gripe, sin embargo, su rendimiento para la detección de RNA viral de la gripe no ha sido adecuadamente establecido. Además, en los escasos estudios que comparan el rendimiento de muestras del TRI y ENF, las muestras no se obtuvieron al mismo tiempo y no se cuantificó la carga viral. Rello et al. comunicaron en un estudio reciente un 10% de resultados falsos negativos en ENF de muestras procedentes de pacientes ingresados en la UCI.

Objetivos

1. Comparar la RT-PCR diseñada por el CDC, el cultivo en SV y el cultivo convencional para la detección del virus de la gripe A (H1N1)v. Evaluar el rendimiento de dos líneas celulares; Marby-Darby canine kidney (MDCK) y una línea continua de carcinoma de pulmón (A549) para el cultivo del virus pandémico tanto en cultivo convencional como en SV.

2. Estudiar la dinámica de la carga viral y la frecuencia de excreción viral prolongada en pacientes hospitalizados con gripe pandémica y evaluar su papel como marcadores de mal pronóstico en esta población.
3. Evaluar la utilidad clínica de buscar sistemáticamente gripe en aspirados traqueales de pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos durante la temporada post-pandémica 2010-2011.
4. Comparar el rendimiento del exudado nasofaríngeo con el del aspirado traqueal para la detección de gripe mediante RT-PCR en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos

Cada objetivo representa un estudio independiente cuyos métodos y los resultados se resume a continuación:

Estudio 1: Comparación de la RT-PCR con el SV y el cultivo convencional en la detección del virus de la gripe A (H1N1)v

Métodos:

Entre los meses de Octubre y Diciembre de 2009 realizamos un estudio prospectivo comparativo de 5 técnicas diagnósticas (RT-PCR, SV-A549, SV-MDCK, tubo-A549, tubo-MDCK) para la detección del virus de la gripe A (H1N1)v a partir de exudados nasofaríngeos de pacientes adultos con sospecha clínica de gripe, utilizando como estándar de oro la detección del virus por una o más de las 5 técnicas.

Resultados:

Las sensibilidades, especificidades, VPP y VPN para la detección de la gripe A H1N1, utilizando el cultivo convencional como estándar de oro fueron: RT-PCR: 95.6, 82.3, 78.3, 96.5%; SV-A549: 91,2, 99.01, 98.4, 94.4%; SV-MDCK: 82.3, 100, 100, 89.4%; Tubo-A549: 94.12, 100, 100, 96.2%, tubo MDCK: 86,7, 100, 100, 91.9%. Las sensibilidades y VPN utilizando un "estándar de oro ampliado" fueron las siguientes: RT-PCR: 96.5%, 96,6%; SV-A549: 73,3%, 78.5%; SV-MDCK: 65,1%, 73,7%; Tubo-A549: 74.4%, 79,2%; Tubo-MDCK: 68,6%, 75.7%. El tiempo promedio para detectar la gripe pandémica A H1N1 por RT-PCR, shell vial y cultivo convencional fue, respectivamente, 4 horas, 48 horas y 7 días.

Estudio 2: Excreción viral prolongada en pacientes con gripe A (H1N1)v: significado clínico y análisis de la carga viral en pacientes hospitalizados.

Métodos:

Realizamos un estudio prospectivo desde el 20 de septiembre hasta el 31 diciembre de 2009, en el cual incluimos todos los pacientes adultos con un diagnóstico confirmado de gripe A (H1N1)v que permanecieron ingresados en nuestra institución durante al menos 48 horas.

Resultados:

Sesenta y cuatro pacientes aceptaron participar en el estudio; 16 (25%) presentaron EVP. Los factores asociados con EVP fueron el ingreso en la UCI (69% frente al 33%, $P= 0.02$), expectoración purulenta (75% frente al 44%, $P= 0,04$), mayor

dosis de oseltamivir (62,5% frente al 27%, $P= 0.016$), tratamiento del corticoesteroides (50% frente al 21%, $p = 0.05$), requerimiento de ventilación mecánica (VM) (50% frente a 12,5%, $P= 0, 004$) y una mayor estancia hospitalaria (34 vs 7 días promedio, $P= 0, 003$). El análisis multivariado reveló los siguientes factores independientemente asociados con EVP: inmunosupresión (OR; 5.15; 95% CI, 1.2-22.2; $P= 0,03$) y necesidad de ventilación mecánica (OR; 11.7; 95% CI, 2.5-54.4; $P= 0.002$). La carga viral al diagnóstico se correlacionó negativamente con la edad y el shock séptico. La cinética de la carga viral de los pacientes que presentaron SDRA y la mortalidad fueron muy diferentes de la de los otros pacientes estudiados.

Estudio 3: Impacto clínico de la búsqueda sistemática de gripe en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos

Material y métodos:

Diseño

Desde el 15 de diciembre de 2010 hasta el 28 de febrero de 2011 todos los aspirados traqueales (AT) obtenidos de pacientes adultos (≥ 18 años) ingresados en nuestras UCIs con sospecha de infección respiratoria del tracto respiratorio inferior (TRI) se enviaron al laboratorio de Microbiología para la búsqueda sistemática de virus de la gripe.

Los criterios de ingreso en UCI y de manejo de los pacientes, incluyendo la necesidad de intubación y la obtención del AT, se hicieron a discreción del médico tratante.

Los pacientes con gripe confirmada por laboratorio fueron seguidos prospectivamente por un especialista en enfermedades infecciosas. Todos ellos fueron tratados con oseltamivir 150 mg/día durante 5-10 días. Los datos clínicos y microbiológicos se recogieron en un protocolo preestablecido y se registraron en una base de datos.

Las variables recogidas incluyeron; edad, sexo, índice de comorbilidad de Charlson, tipo de unidad de cuidados intensivos, fecha y motivo de ingreso en UCI, APACHE II al ingreso en la UCI, fecha de inicio de los síntomas de gripe, manifestaciones clínicas y hallazgos radiológicos, fecha de la toma de muestras, otras muestras obtenidas para el diagnóstico y su resultado, fecha de inicio del tratamiento antiviral, complicaciones (shock séptico, insuficiencia respiratoria aguda, SDRA), y datos sobre la evolución del paciente incluyendo la mortalidad a los 30 días después del diagnóstico de la gripe, duración de la estancia en UCI y estancia hospitalaria.

Resultados:

Recibimos aspirados traqueales de 100 pacientes con sospecha de infección del TRI; el virus de la gripe fue detectado en 28 pacientes. La enfermedad fue no-sospechada en 15 pacientes (53,7%). Los pacientes con sospecha de gripe se compararon con aquellos con infección no-sospechada. Se encontraron diferencias significativas en cuanto a: edad media (53,5 vs 66,7 años), tipo de UCI (médica; 100% vs. quirúrgica; 21%), clasificación del episodio como comunitario (92% vs 67%) o nosocomial (8% vs 33%), presencia de tos (100% vs 57%), infiltrado pulmonar bilateral (69% contra 13%), días de tratamiento antiviral después de la aparición de los síntomas (2,5 vs 9 días), EVP hasta 21 días (56% vs 8%) y desarrollo de SDRA (77% vs 27%). Aunque la estancia media en la UCI (13,5 vs 27 días) y estancia hospitalaria

(39 vs 66 días) fueron mayores en los casos no-sospechados, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La mortalidad no fue significativamente diferente entre los dos grupos.

Estudio 4: Estudio comparativo de exudado nasofaríngeo vs. aspirado traqueal en el diagnóstico de la gripe en pacientes ingresados en UCIs.

Métodos:

Desde el 15 de diciembre de 2010 hasta el 28 de febrero 2011, realizamos un estudio prospectivo comparativo de muestras pareadas (exudado nasofaríngeo vs. aspirado traqueal) en pacientes adultos ingresados en UCIs de nuestra institución con sospecha de infección del TRI.

Resultados:

Durante el período de estudio ingresaron 618 pacientes en UCIs de adultos de nuestra institución. Uno o más AT de 105 pacientes fueron enviados al laboratorio por sospecha de infección del TRI. Pudimos obtener muestras pareadas en 52 de los 105 pacientes.

Detectamos ARN viral, en alguna de las dos muestras, en 22 pacientes. En 22 de los 52 pacientes detectamos ARN viral en alguno de los dos tipos de muestra. Catorce ENF (63,6%) y 22 AT (90,9%) fueron positivos, distribuyéndose de la siguiente manera (ver Tabla 1)

- En ambos especímenes: 12/22 pacientes
- Sólo en el exudado nasofaríngeo: 2/22 pacientes

- Solo en AT: 8/22 pacientes.

Todos los virus detectados fueron A (H1N1)v, excepto uno que fue un influenza del tipo B.

Tabla 1: Resultados globales y valores de validez (sensibilidad y valor predictivo negativo) de los dos tipos de muestra para la detección de gripe mediante RT-PCR.

	Sensibilidad, % (95%IC) ^a	Especificidad, % (95%IC) ^b	Valor predictivo positivo, % (95%IC) ^c	Valor predictivo negativo, % (95%IC) ^d
RT-PCR	95,6 (87,6-99,1)	82,3 (73,5-89,2)	78,3 (67,9-86,6)	96,5 (90,2-99,3)
SV-A549	91,2 (81,7-96,7)	99,01 (94,6-99,9)	98,4 (91,5-99,9)	94,4 (88,2-97,9)
SV-MDCK	82,3 (71,2-90,5)	100 (96,4-100)	100 (93,6-100)	89,4 (82,3-94,4)
Tubo-A549	94,1 (85,6-98,4)	100 (96,4-100)	100 (94,4-100)	96,2 (90,6-98,9)
Tubo-MDCK	86,7 (76,3-93,7)	100 (96,4-100)	100 (93,9-100)	91,9 (85,1-96,2)

VPN: valor predictivo negativo

La mediana de la carga relativa en AT y ENF fue, respectivamente; 3,55 y 0,55 uqr (unidades de carga relativa). La carga viral en AT fue 3,75 veces mayor que la carga viral en muestras de ENF (prueba de pasa-Bablok; 3,75).

CONCLUSIONES

1. La RT-PCR a tiempo real es un método rápido que presenta una elevada sensibilidad y especificidad para la detección de la gripe pandémica A (H1N1)v en comparación con los métodos convencionales.
2. Tanto el cultivo convencional como en shell-vial siguen siendo métodos útiles aunque más lentos para la detección del virus de la gripe. Puede ser una alternativa en algunos laboratorios, pero teniendo en cuenta que en el contexto de una pandemia se requerirían pruebas adicionales para realizar el subtipado.
3. La línea celular A549, utilizada comúnmente en los laboratorios para el aislamiento de otros virus respiratorios, no es inferior a la línea MDCK en el cultivo de la gripe A (H1N1)v.
4. La excreción viral prolongada (EVP) es una complicación frecuente en los pacientes hospitalizados con gripe pandémica. Se observa más frecuentemente en pacientes inmunodeprimidos y que requieren ventilación mecánica.
5. Las recomendaciones futuras relativas a los períodos de aislamiento respiratorio en pacientes hospitalizados con gripe deberían considerar la frecuencia y las consecuencias de este fenómeno de EVP.
6. Los pacientes con EVP presentan una estancia hospitalaria más larga y peor evolución.
7. El estudio del aclaramiento viral puede ser de ayuda para identificar pacientes con mal pronóstico.

8. La gripe es una causa común de enfermedad respiratoria aguda en pacientes ingresados en la UCI durante la epidemia estacional que a menudo no es sospechada. Esto se asocia a un retraso en el inicio del tratamiento antiviral pudiendo favorecer la transmisión nosocomial de la gripe.
9. Para evitar este infradiagnóstico y sus consecuencias sería recomendable hacer una búsqueda sistemática de gripe en muestras respiratorias obtenidas de pacientes ingresados en UCI con sospecha de infección del tracto respiratorio inferior durante la epidemia estacional.
10. Los aspirados traqueales, que son muestras rutinarias y de fácil obtención en pacientes intubados, son más eficientes en la detección de gripe que los exudados nasofaríngeos. Sin embargo, para un diagnóstico óptimo se deberían analizar ambas muestras.

SUMMARY IN ENGLISH

Introduction

Pandemic influenza A H1N1 created the need for fast and accurate diagnostic tests. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) produced a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay that was widely accepted as a reference for detection. However, this test is not always available, affordable, or feasible for microbiology laboratories that perform more conventional techniques, such as tube cell culture and shell vial culture.

The MDCK continuous cell line is one of the most useful for the isolation of the influenza A virus in respiratory samples. The A549 cell line, which is commonly used for the isolation of respiratory viruses, is moderately sensitive for seasonal influenza A virus, although there are no reports evaluating this cell line in the detection of pandemic influenza A H1N1.

Influenza is a well-known cause of acute respiratory disease. It is generally a self-limiting infection with systemic and respiratory symptoms, and usually resolves after 3-6 days in most patients. Viral clearance in the respiratory tract occurs after 3-5 days. However, a complicated course consisting of severe respiratory illness, exacerbation of underlying diseases, and the need for intensive care has been reported in some patients. The recently reported pandemic influenza A (H1N1)v virus had a more aggressive course in specific populations such as young patients and pregnant women.

Persistence of viral shedding and the dynamics of viral load have received little attention in hospitalized patients with seasonal or pandemic influenza. Most reports assess the impact of antiviral therapy, and data regarding the significance of prolonged viral shedding and viral load as markers of poor outcome are anecdotal.

Influenza is a common cause of admission to Intensive Care Units (ICU's) during influenza season and influenza pandemics. However, it may be overlooked particularly in patients with clinical manifestations that can be explained by alternative infectious or non-infectious causes. Furthermore, suspicion of influenza may be particularly difficult when respiratory function fails or deteriorates in patients already admitted to the ICU.

Actually, information regarding nosocomial influenza acquired during ICU stay is scarce and incomplete. To know early the presence of influenza virus in patients admitted to ICU's has obvious epidemiologic, diagnostic and therapeutic consequences.

Nasopharyngeal aspirates or nose-throat swab (NTS) samples are considered the specimens of choice for RT-PCR in non-intubated patients. However, although lower respiratory tract (LRT) samples are readily available in many ICUs, their yield for detection of influenza viral RNA has not been adequately assessed. Furthermore, in the few studies that compare the yield of LRT and NTS specimens, samples were not collected simultaneously and viral load was not quantified. Rello et al. reported false-negative results in 10% of NTS specimens from patients admitted to the ICU.

Objectives

1. To compare the CDC real-time RT-PCR assay, shell vial culture, and conventional cell culture, in combination with MDCK and A549, for the detection of pandemic influenza A H1N1 in hospitalized patients.
2. To investigate the frequency of prolonged viral shedding (PVS) and the dynamics of viral load in order to assess epidemiologic and prognostic data among hospitalized patients with pandemic influenza A (H1N1)v.

3. To assess the burden of influenza in adult ICU's and the rate of overlooked cases with the routine diagnostic work-up during the influenza season.
4. To compare the yield of paired NTS and endotracheal aspirate (EA) specimens taken simultaneously as the first diagnostic sample for detection of influenza viral RNA by rRT-PCR in patients admitted to adult ICUs. We also evaluated the relative viral loads of paired samples when both specimens were positive.

Each objective represents an independent study whose methods and results are summarized below:

Study 1: Comparison of real-time RT-PCR, shell-vial culture, and conventional cell culture for the detection of the pandemic influenza A (H1N1) in hospitalized patients

Methods:

From October 2009 to December 2009, we performed a prospective comparative study of five diagnostic techniques (RT-PCR, shell vial culture in A549, shell vial culture in MDCK, conventional cell culture in A549, and conventional cell culture in MDCK) using nasopharyngeal swab samples from patients ≥ 18 years of age and hospitalized with clinical symptoms of influenza at our institution. Detection of the virus by conventional culture was considered the gold standard. An "extended gold standard" was also used to re-calculate validity values.

Results:

The sensitivities, specificities, PPVs and NPVs for the detection of influenza A H1N1, determined using conventional culture as the gold standard were: RT-PCR: 95.6, 82.3, 78.3, 96.5%; SV-A549: 91.2, 99.01, 98.4, 94.4%; SV-MDCK: 82.3, 100, 100, 89.4%; Tube-A549: 94.12, 100, 100, 96.2%, Tube-MDCK: 86.7, 100, 100, 91.9%. Sensitivities and NPVs using an “expanded gold standard” were as follows: RT-PCR: 96.5%, 96.6%; SV-A549: 73.3%, 78.5%; SV-MDCK: 65.1%, 73.7%; Tube-A549: 74.4%, 79.2%; Tube-MDCK: 68.6%, 75.7%. The average time to detect pandemic influenza A H1N1 by RT-PCR, shell vial culture, and conventional culture was, respectively, 4 hours, 48 hours, and 7 days.

Study 2: Prolonged viral shedding in pandemic influenza A H1N1: clinical significance and viral load analysis in hospitalized patients**Methods:**

We conducted a prospective study to investigate the frequency of prolonged viral shedding (PVS) and the dynamics of viral load in order to assess epidemiologic and prognostic data among hospitalized patients with pandemic influenza A (H1N1)v

We performed a prospective study of adult patients (>16 years) with laboratory-confirmed influenza A (H1N1)v virus infection who were admitted consecutively to our hospital from September 20th through December 31st 2009.

Ours is a large general tertiary teaching hospital currently serving a population of approximately 715,000 inhabitants in Madrid, Spain. The hospital has 1,550 beds and includes all medical and surgical specialties, including solid organ (heart, liver, and

kidney) and bone marrow transplant programs.

Study patients had laboratory-confirmed influenza A (H1N1)v virus infection and had been hospitalized for at least 48 hours. Written informed consent was obtained and consecutive nasopharyngeal swabs were collected every two days during the first week after diagnosis, then every week or until viral detection was negative. Clinical data were recorded using a pre-established protocol that included the following: demographic characteristics; underlying diseases; influenza vaccination status; clinical, laboratory, and radiographic findings at presentation; data on treatment; influenza-related complications and outcome. The hospital ethics committee approved the study.

During the study period, patients with influenza-like illness were diagnosed and treated according to a standard protocol. Nasopharyngeal swabs were taken in all suspected cases. Patients were admitted to the hospital if they developed serious medical conditions or presented severe underlying diseases. Droplet precautions were implemented and oseltamivir was started until the results of viral detection were available. Patients were then treated and discharged according to usual clinical practice.

Sample processing and (H1N1)v detection

The nasopharyngeal swabs were preserved in 1 ml of viral transport medium and stored at 4°C for no more than 48 hours until processing. Viral RNA was extracted from 200 µl of the sample in a Nuclisens EasyMag device (bioMérieux, Boxtel, Netherlands) following the manufacturer's instructions, eluted in 60 µl of elution buffer, and maintained at 4°C if it was analyzed immediately or at -70°C until assay. Pandemic influenza A (H1N1)v was detected by real time RT-PCR following the WHO/CDC protocol in a Stratagene MX3000 thermocycler (Stratagene, La Jolla, California, US)

Viral quantification

Viral load was determined retrospectively in the diagnostic specimens and in most of consecutive specimens.

Quantification of (H1N1)v was performed by real-time RT-PCR in a LightCycler 2.0 device using the RealTime ready Influenza A/H1N1 Detection Set and RealTime ready RNA virus Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Two independent reactions were performed to quantify the viral hemagglutinin (HA) and human RNaseP genes by means of specific standard curves included in each of the assays. Relative quantification of (H1N1)v was achieved by normalizing the number of HA targets to the number of RNaseP ones in the specimen. Viral load was expressed as relative quantification units (rqu).

To evaluate the reproducibility of the assay, three aliquots of a selection of specimens were analyzed on three consecutive days leading to a standard deviation (SD) of 0.018 ± 0.018 . The analytical sensitivity of the assay was $2.83 \log_{10}$ copies/ml.

To analyze viral load dynamics over time, we classified patients in six groups (0, 2-4, 5-7, 8-10, 11-13, and 14-16) according to the number of days after diagnosis. The available values for each specific time point were averaged.

Statistical analysis

In the univariate analysis, categorical variables were compared using the *chi*-square test. The non-normally distributed continuous variables were compared using the Mann-Whitney U test and expressed as the median and interquartile range (IQR). The normally distributed continuous variables were compared using the *t* test and expressed as the mean (SD). The Spearman rank correlation coefficient was used to assess the correlation between initial viral concentration and age, duration of

symptoms, time of oseltamivir initiation after the illness onset, days of viral shedding, and length of hospital stay. Stepwise logistic regression models were used in the multivariate analysis to analyze risk factors for prolonged viral shedding. Variables with a P value <0.1 in the univariate analysis were included in the multivariate models. Differences were considered to be significant for P values <0.05 . The analysis was carried out using SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA).

Results:

Sixty-four patients agreed to participate in the study; 16 (25%) presented PVS. The factors associated with PVS were admission to the ICU (69% vs. 33%, $P=0.02$), purulent expectoration (75% vs. 44%, $P=0.04$), higher dosage of oseltamivir (62.5% vs. 27%, $P=0.016$), corticosteroid treatment (50% vs. 21%, $p=0.05$), mechanical ventilation (MV) (50% vs. 12.5%, $P=0.004$), and a longer hospital stay (34 vs. 7 median days, $P=0.003$). Multivariate analysis revealed the factors independently associated with PVS to be immunosuppression (OR 5.15; 95% CI, 1.2-22.2; $P=0.03$) and the need for MV (OR 11.7; 95% CI, 2.5-54.4; $P=0.002$). VL at diagnosis correlated negatively with age and septic shock. The kinetic of VL of patients who experienced acute respiratory distress syndrome and/or mortality was very different from that of the other patients studied.

Study 3: Should lower respiratory tract secretions of intensive care unit patients be systematically processed for influenza during the influenza season?

Methods:

Prospective study of patients admitted to 3 adult ICUs (medical, surgical, and heart surgery) during Dec 2010-Feb 2011. All tracheal aspirate (TA) samples were

routinely tested for influenza. We defined influenza as unsuspected if testing was not explicitly requested in TA or other samples (eg, nasopharyngeal swabs) and the patient was not on empirical antiviral therapy immediately after the sample collection.

Results:

We received TA samples from 100 patients with suspected lower respiratory tract (LRT) infection; influenza was detected in 28. The disease was unsuspected in 15 (53.7%) of these. Patients with suspected influenza were compared to those with unsuspected infection. Significant differences were found for mean age (53.5 vs 66.7 years), type of ICU (medical, 100% vs. 21%), classification of episode as community-acquired (92% vs 67%) or nosocomial (8% vs 33%), cough (100% vs 57%), bilateral pulmonary infiltrate (69% vs 13%), median days to antiviral therapy after symptom onset (2.5 vs 9 days), prolonged viral shedding up to 21 days (56% vs 8%), and development of ARDS (77% vs 27%). Although median length of ICU (13.5 vs 27 days) and hospital stay (39 vs 66 days) were higher in unsuspected cases, the differences were not statistically significant. Mortality was not significantly different between the groups.

Study 4: Diagnosis of Influenza in Intensive Care Units: Lower Respiratory Tract Samples Are Better Than Nose-Throat Swabs**Methods:**

From December 2010 to February 2011, we performed a prospective comparative study to detect influenza using RT-PCR in specimens from adults admitted to the ICU with suspected influenza. Relative quantification of viral load was performed when both specimens were positive.

Results:

We obtained paired NTS and EA specimens in 52 of the 77 patients admitted to the ICU with suspected influenza. In 22 of the 52 patients, influenza virus was detected in at least one of the NTS/EA specimens, as follows: in both specimens in 12/22 patients, in the NTS specimen only in 2/22 patients, and in the EA specimen only in 8/22 patients. All the viruses detected were 2009 pandemic influenza A H1N1 except one (influenza B). The validity values of NTS and EA were as follows: sensitivity (63.6%, 90.9%) and negative predictive value (79.5%, 93.9%). The viral load in EA was 3.75 times greater than the viral load in NTS.

CONCLUSIONS

1. RT-PCR is a rapid and accurate method for detection of pandemic influenza A H1N1.
2. Conventional and shell vial cultures remain a useful but slow method for detection of influenza A virus. Moreover, additional testing is required to discriminate between virus subtypes. The conventional A549 cell line is not inferior to the MDCK line.
3. Prolonged viral shedding (PVS) is a common complication in hospitalized patients with pandemic influenza and is associated with longer hospital stay and poorer outcome.
4. Future recommendations regarding periods of respiratory isolation in hospitalized patients with influenza should consider the frequency and consequences of this phenomenon.
5. The study of viral clearance can identify patients with a poorer prognosis.
6. Influenza is a common cause of acute respiratory illness among patients admitted to the ICU during the seasonal epidemic and that it is often

overlooked. This is associated with a delay in the initiation of antiviral treatment and may favoring the nosocomial transmission of influenza.

7. Microbiology departments should search systematically for the presence of influenza in the respiratory samples obtained from patients with suspicion of lower respiratory infection during the seasonal epidemic.
8. For patients with suspected influenza in the ICU, EA specimens are better than NTS specimens. For an optimal diagnosis, both specimens should be tested in the microbiology laboratory.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Gripe e historia de las grandes pandemias gripales

La gripe es una enfermedad respiratoria aguda causada por virus RNA, miembros de la familia *Orthomyxoviridae*. Es la causa más común de infección respiratoria en el hombre y suele ocurrir en forma de epidemias anuales (gripe estacional) durante los meses de invierno aunque también puede presentarse en forma de pandemias (1). La gripe estacional generalmente es una infección autolimitada (gripe no complicada), caracterizada por un inicio brusco con síntomas sistémicos (fiebre, mialgias, cefalea) y respiratorios (tos, rinorrea, obstrucción nasal) que se resuelven en unos 3-4 días. Sin embargo, se asocia con un aumento de morbilidad y mortalidad en ciertos grupos de riesgo. La edad avanzada y las comorbilidades son, entre otros, los factores asociados a una evolución complicada de la gripe (2).

Las epidemias de gripe ocurren anualmente desde hace 400 años. La plaga descrita por Thucydides en Atenas (430-427 AC) (3), una epidemia descrita por Hipócrates en el año 412 AC, y diferentes epidemias descritas durante la edad media han sido atribuidas a la infección por el virus *influenza* o virus de la gripe (4). Sin embargo, no fue hasta 1933 cuando se identificó el virus de la gripe tipo A en humanos (4). En 1939, Francis aisló el virus tipo B (5) y en 1949 Taylor aisló el tipo C (6).

Las pandemias de gripe descritas en poblaciones humanas son atribuidas a la aparición de nuevos subtipos del virus de la gripe tipo A. En el siglo XX se han descrito cuatro grandes pandemias, en 1918, 1957, 1968 y 2009 causadas por los virus de tipo A; H1N1 (gripe española), H2N2 (gripe asiática), H3N2 (gripe de Hong Kong), y H1N1 de origen porcino, respectivamente.

1.1.1. Pandemia de 1918 (gripe española)

El origen de esta pandemia no está del todo esclarecido, se sospechan dos sitios de Origen; China, con la posterior diseminación a Estados Unidos (EE.UU) y Europa por los fenómenos de migración, o EE.UU como primer foco de origen (7).

Lo que si se conoce es el origen filogenético del virus, gracias a los estudios de secuenciación del genoma completo del virus encontrado en tejidos humanos conservados desde 1918 llevados a cabo por Taubenger and Tumpey et al. (8, 9). Estos autores observaron que los ocho segmentos genéticos del virus H1N1 estaban estrechamente relacionados con virus aviares, lo cual indica que el virus H1N1 ancestral procede de un reservorio aviar. El virus aviar penetró en primer lugar en huéspedes mamíferos (cerdos) entre 1882 y 1913 (10). Posteriormente, mediante una re-organización genética humana/porcina se originó el nuevo virus pandémico A H1N1 de 1918 (10). La adaptación de este virus a la especie humana se hizo eficaz en 1915 aproximadamente (10).

Durante esta pandemia se infectó el 50% de la población mundial, aproximadamente el 25% de las personas infectadas desarrollaron clínica infecciosa significativa. Se produjeron aproximadamente 20 millones de muertes en todo el mundo (11). La mayor diferencia epidemiológica que caracterizó a ésta pandemia fue el inusual patrón de mortalidad. La tasa de mortalidad fue muy elevada y afectó principalmente a adultos jóvenes (entre 20 y 40 años) (12).

Las razones de esta elevada mortalidad siguen siendo poco claras, aunque el reciente análisis genético de la cepa de 1918 sugiere que el virus era altamente virulento y presentaba una elevada patogenicidad debido a su capacidad para desencadenar la producción de citoquinas (13). La menor mortalidad en personas de edad avanzada pudo deberse a la exposición previa de este grupo etario a un virus de

la gripe antigénicamente similar al virus de 1918, ya que esta pandemia ocurrió 28 años después una pandemia previa en 1890 (14).

Las manifestaciones clínicas características de la “gripe española” fueron fiebre, escalofríos, cefalea, mialgias, malestar general y anorexia. La complicación más frecuente fue la neumonía, tanto viral primaria como bacteriana secundaria (13). Aunque la neumonía viral primaria fue documentada por primera vez en la pandemia de 1957-1958 (15), parece que este síndrome provocó la muerte de muchos adultos jóvenes sanos durante la pandemia de 1918 (16).

En los casos graves se encontraron signos compatibles con edema agudo de pulmón y neumonía hemorrágica. En las autopsias se evidenciaron otras complicaciones como pericarditis, miocarditis, hepatitis y esplenomegalia (13).

Después de la pandemia de gripe de 1918 la gripe vuelve a su patrón normal de epidemias regionales de menor virulencia en 1930, 1940 y 1950. Fue durante la epidemia de 1930 cuando se observó que la gripe humana se había adaptado a otra especie, el cerdo. El virus estaba produciendo infección simultáneamente en humanos y cerdos norteamericanos, con una presentación clínica y características patológicas similares (17).

1.1.2. Pandemias de 1957 (gripe Asiática) y 1968 (gripe de Hong Kong)

En 1957 el virus de la gripe A (H1N1) desaparece de la especie humana y es sustituido por un nuevo virus que surge de la recombinación genética entre el virus H1N1 humano y un virus aviar H2N2. El nuevo virus contiene tres nuevos segmentos de origen aviar [hemaglutinina (H2), neuroaminidasa y PB1] y mantiene otros cinco segmentos del virus A (H1N1) de 1918 (18).

Este nuevo virus circula en humanos hasta 1968, cuando es reemplazado por el virus H3N2/Hong Kong que surge del reemplazamiento de los genes H2 y PB1 del virus H2N2 por dos nuevos genes aviares; H3, y un nuevo gen PB1 (19). Actualmente los “descendientes” de este virus continúan causando la mayor parte de las infecciones por virus de la gripe en humanos. Aun así, cabe destacar, que cinco de los genes del actual virus H3N2 tienen su origen en el virus de 1918.

Las manifestaciones clínicas de estas dos pandemias fueron las propias de un síndrome gripal típico. A diferencia de lo ocurrido en 1918, la gripe afectó en menor medida a adultos jóvenes (12). La mortalidad fue elevada en niños y en ancianos (14). En esta ocasión se observaron complicaciones graves fundamentalmente en pacientes con enfermedades crónicas de base, siendo la neumonía la complicación más frecuente (20). La mortalidad por neumonía bacteriana secundaria fue menor debido a los avances en la terapia antimicrobiana y aumentó la mortalidad por neumonía viral primaria. En un estudio realizado en un hospital de Nueva York en 1957, se observó que la cardiopatía reumática y el tercer trimestre del embarazo en mujeres, eran factores de riesgo para sufrir complicaciones (20).

En 1977 aparece de nuevo el virus humano A (H1N1) en la Unión Soviética, Hong Kong y sureste de China. Esta pseudopandemia se presenta como un cuadro respiratorio agudo autolimitado que afecta mayoritariamente a personas jóvenes (21).

A partir de 1977 dos subtipos de virus de la gripe tipo A empiezan a cocircular durante las epidemias estacionales aunque con un dominio del subtipo H3N2 (22).

1.1.3. Gripe aviar H5N1

El virus de la gripe A (H5N1) es un virus aviar de elevada patogenicidad, endémico en países asiáticos. Este virus cruzó la barrera de especie infectando a

humanos en 1997, en un brote en Hong Kong en el que se declararon 18 casos en humanos, con una mortalidad del 33%, una incidencia de neumonía del 61% y una estancia en unidades de cuidados intensivos del 51% (23, 24)

La caracterización genética del virus puso de manifiesto que todos sus genes eran de origen aviar lo que sugería un salto de barrera de especie sin adaptación (25). Los estudios serológicos revelaron una baja evidencia de transmisión entre humanos y tras un masivo sacrificio de aves de corral no se comunicaron más casos (24-26).

En 2003 el virus volvió a causar infección en humanos. Estos casos se describieron en una familia que viajó de China a Hong Kong, y los casos fueron confirmados por cultivo viral (27). En 2006 se confirmaron nuevos casos en humanos en Tailandia, Vietnam, Indonesia, Camboya, China, Turquía, Laos, Egipto, Nigeria, Iraq y Paquistán. Las personas infectadas ascendían en ese momento a más de 400 con una mortalidad superior al 60% (28).

Estudios realizados en pacientes infectados por este virus en Hong Kong, Vietnam, Tailandia y Camboya revelaron que los síntomas iniciales más frecuentes en estos pacientes fueron fiebre y tos. En algunos casos se observaron también, durante el curso de la enfermedad, vómitos, diarrea, dolor abdominal y dolor pleurítico. Los pacientes con infección grave no presentaban enfermedades de base subyacentes a diferencia de lo que ocurrió en los periodos inter-pandémicos en los cuales los pacientes con enfermedad grave fueron pacientes con enfermedades crónicas cardiovasculares, pulmonares o renales (29).

1.1.4. Gripe humana de origen porcino

La primera evidencia serológica de infección en humanos por virus de la gripe de origen porcino data de 1958 (30). Sin embargo, no es hasta 1974 cuando se produce

el primer aislamiento de virus de la gripe porcina en un humano (31). En enero de 1976, tuvo lugar un brote de infección respiratoria aguda en una base militar estadounidense, el virus aislado en este brote resultó ser un virus de origen porcino (H1N1 A/New Jersey/76). El virus no se extendió fuera de la base militar.

Como se ha comentado anteriormente, en 1930 el virus A (H1N1) circulaba en una población de cerdos de EE.UU. Sin embargo, no es hasta 1976 cuando el virus se introduce en Europa a través de un envío de cerdos norteamericanos a Italia (32). Unos años después, una nueva variante de origen aviar se introduce en esta población de cerdos europeos y reemplaza al virus clásico norteamericano (33). En China ocurrieron sucesos similares.

En 1998, en el norte de América, se identificó un triple reordenamiento genético en el virus clásico porcino. El análisis genético de este nuevo virus concluyó que cinco segmentos genéticos derivaban del virus clásico porcino H1N1 pero que los segmentos del gen de la polimerasa derivaban de aves (PA y PB2) o humanos (PB1) (34, 35). El primer caso de infección en humanos por este nuevo virus ocurrió en Wisconsin a un granjero de 17 años que estaba en contacto con cerdos (36). Entre 2005 y 2009 se comunicaron 11 casos más, la mayoría de ellos describían contacto con cerdos (35).

El abril de 2009, el gobierno de EE.UU notificó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) la detección de un nuevo virus A (H1N1) de origen porcino en un niño de 10 años y una niña de 9, con un síndrome gripal leve (37). Se determinó que el virus de la gripe aislado en cada niño presentaba una composición genética que no había sido identificada previamente. Las características estructurales, epidemiología, manifestaciones clínicas, diagnóstico, prevención y tratamiento de este nuevo virus se describirán ampliamente en las secciones posteriores.

1.1.5. Nueva variante H3N2v

Se trata de un virus originado del reordenamiento genético de los virus de origen porcino H3N2 y H1N1 de 2009 (38). Los casos empezaron a describirse a partir de julio de 2012 (38, 39). La infección persona-persona no se ha observado hasta el momento. La mayoría de los casos en el año 2012 se produjeron en Indiana y Ohio, pero ocurrieron casos en otros estados. Casi todos los pacientes tuvieron contacto directo o indirecto con cerdos. La mayoría de los pacientes presentaron síntomas leves. Los centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC) han publicado recomendaciones para la prevención de la transmisión de esta nueva variante, que incluyen el lavado de manos frecuente y evitar el contacto con cerdos que parezcan enfermos (40). Además, las personas con alto riesgo de complicaciones asociadas a la gripe deben evitar la exposición a los cerdos, especialmente si se han identificado cerdos enfermos.

1.2 Virus Influenza

1.2.1. Clasificación

Los virus *influenza* son miembros de la familia *Orthomyxoviridae*, que en la actualidad agrupa cinco géneros. Todos ellos son virus con ARN monocatenario, de tamaño medio, simetría helicoidal y provistos de envoltura. La denominación de "myxovirus" se relaciona con su afinidad por la mucina, mucoproteína existente en el moco de diversas secreciones, en algunos receptores epiteliales, en la membrana de los hematíes y en el suero.

Los virus gripales A y B constituyen los géneros más importantes. El virus gripal C constituye un tercer género, con escaso interés en patología humana, que difiere en determinadas características del género anterior. El cuarto género es de descripción

más reciente, se ha denominado "Virus Togoto", con un interés también reducido en el ámbito clínico. El quinto género está integrado por los *Isavirus*, de interés veterinario.

Los virus *influenza* de tipo A son además clasificados en subtipos según las características de las glicoproteínas de superficie, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), de modo que en la actualidad existen dieciséis subtipos HA y nueve subtipos NA (41). La denominación de los virus aislados se establece según la información siguiente: tipo, especie de origen, localización geográfica, número de la cepa en el laboratorio de origen, año del aislamiento y subtipo (solo en virus influenza A).

1.2.2. Características estructurales

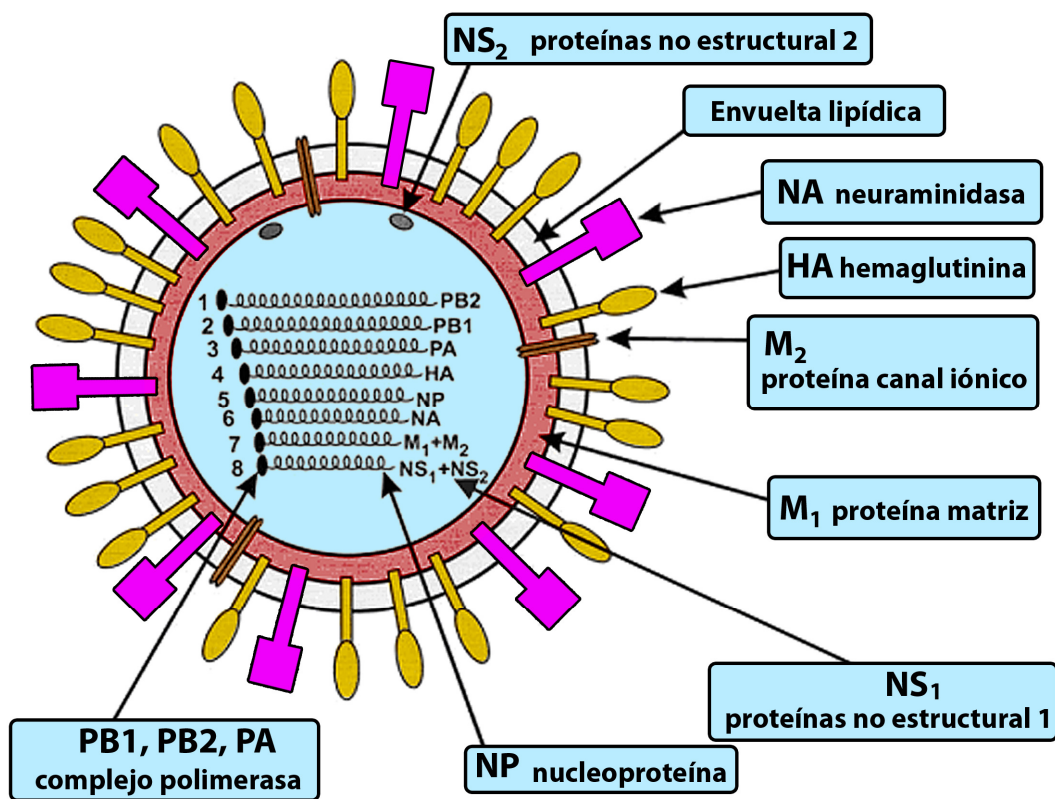
Los *ortomyxovirus* son virus RNA monocatenarios, envueltos, de simetría helicoidal y genoma segmentado de polaridad negativa. Los virus son esféricos y pleomórficos, con diámetros de 80 a 120 nm después de pases seriados en cultivo (12).

La estructura del virus de la gripe aparece representada en la Figura 1. En la parte más externa se sitúa la envoltura que procede de la membrana citoplasmática de la célula huésped y es de naturaleza lipídica. En ella se asientan las glicoproteínas de origen vírico que en el caso de los virus gripales A y B son de dos tipos: HA y NA, mientras que en el virus C solo son de un tipo: hemaglutininaesferasa-fusión con propiedades enzimáticas y hemaglutinantes (1). Debajo de la envoltura lipídica se sitúa la proteína de matriz (M1).

Los tipos A y B tienen cinco proteínas internas no glucosiladas (NP, M, PB1, PB2 y PA), que forman el core vírico, y tres proteínas glucosiladas en la envoltura (HA, NA, M2 o NB) (1).

El RNA contiene entre 12000 y 15000 nucleótidos. Los virus A y B tienen ocho segmentos y el C siete segmentos. El tamaño del genoma es mayor en los virus B ya que tiene secuencias no codificantes más largas (1).

Figura 1: Estructura del virus de la gripe (42)



En los virus A y B, los ocho segmentos de RNA codifican diez proteínas virales; ocho estructurales y otras dos no estructurales (NS) que aparecen exclusivamente en la célula infectada. De estas proteínas no estructurales, la NS2 puede aparecer en los viriones. Los tres segmentos genómicos de mayor tamaño codifican tres polipéptidos

que constituyen el complejo RNA polimerasa formado por las proteínas PB1, PB2 y PA.

1.2.3. Morfología y funciones biológicas

El componente glucoproteico más importante es la **HA**, que constituye en torno al 40% de las proteínas víricas (1). En cada virión existen unas 350-400 de estas proyecciones. Esta glicoproteína es un trímero formado por tres subunidades idénticas de 80 kD cada una, con un peso molecular total de 250 kD (43). Entre sus funciones biológicas cabe destacar que es causante tanto de la fijación del virus a los receptores mucoproteicos de las células del epitelio respiratorio (que contienen ácido N-acetil-neuramínico) como de la fusión entre la envoltura vírica y la membrana celular (44). La HA se sintetiza como un monomero (HAo) que por acción de las proteasas celulares del huésped se divide en HA1 y HA2. Esta escisión es necesaria para la fusión de la membrana vírica y celular y para la entrada del virus en las células diana (1). Es la molécula responsable de la infectividad del virus gripal, y los anticuerpos generados contra ella son de carácter neutralizante y protector (44)

La **NA** representa alrededor del 5% de las proteínas totales del virión, aproximadamente 200 moléculas de la misma. Éstas están constituidas por cuatro subunidades idénticas que forman un tetrámero de 240 kD. Es una enzima con actividad N-acetilneuraminilhidrolasa (sialidasa) que provoca la ruptura de las uniones glucosídicas del ácido N-acetilmurámico (Ácido sialico) presente en casi todas las cadenas de oligosacáridos de las mucinas y en los receptores celulares para la HA (1). Tiene función estabilizadora del virus frente a la acción hidrolítica de las enzimas presentes en el moco de las vías respiratorias, de modo que permite que el virus acceda a las células del epitelio respiratorio (45).

La **proteína M2** es un tetrámero que actúa en las primeras etapas de penetración del virus. Actúa como canal iónico de modo que permite la acidificación del interior del virus, necesaria para la liberación de los segmentos de la nucleocapside vírica en el citoplasma celular (46). La región extramembrana de este canal iónico presenta estabilidad antigénica, lo que la convierte en una potencial diana vacunal. Además esta proteína es la diana de las aminas cíclicas (antivirales de tipo amantaditas). En los virus influenza de tipo B esta proteína se denomina NB y en los de tipo C el equivalente funcional es la proteína CM2.

Como hemos mencionado anteriormente, debajo de la envoltura lipídica se sitúa la proteína de matriz (M1), de 17 kD, que está implicada en el control de la RNA polimerasa vírica.

La **ribonucleoproteína (RNP)** forma el core del virus, compuesto por los segmentos de RNA encapsidados de forma independiente por la **nucleoproteína (NP)**. La NP forma un tubo flexible enrollado sobre sí mismo en forma de espiral (simetría helicoidal) y asociado a su vez al complejo RNA polimerasa que interviene en la transcripción y síntesis del RNA complementario (1).

Los antígenos internos principales son la NP y la proteína de matriz M1, ambos son específicos de tipo y por lo tanto, distintos entre los virus gripales A, B y C. Los anticuerpos frente a ellos no son neutralizantes y su papel está limitado a la inmunidad celular frente a la reinfección.

Variaciones antigénicas:

Los virus de la gripe presentan una marcada capacidad para sufrir variaciones en sus antígenos lo cual les otorga una especial transcendencia desde el punto de vista epidemiológico, fundamentalmente cuando estas variaciones afectan a los

antígenos de superficie de los que hemos hablado anteriormente (47). En este sentido, se pueden establecer dos grandes grupos de variaciones.

A. Las **variaciones menores o deslizamientos antigénicos** (*antigenic drift*): son mutaciones puntuales de los antígenos de superficie de los virus gripales A y B. Afectan sobre todo a la HA y suponen la aparición de una nueva cepa o variante frente a la cual la población tiene sólo una inmunidad parcial por exposiciones anteriores a las cepas originarias (12). Con el cambio gradual de los antígenos superficiales surge una serie de nuevas variantes, cada una diferente de su predecesora y más alejada del subtipo inicial, pero conservándose éste. Los casos de gripe estacional o brotes epidémicos están producidos por las variaciones menores.

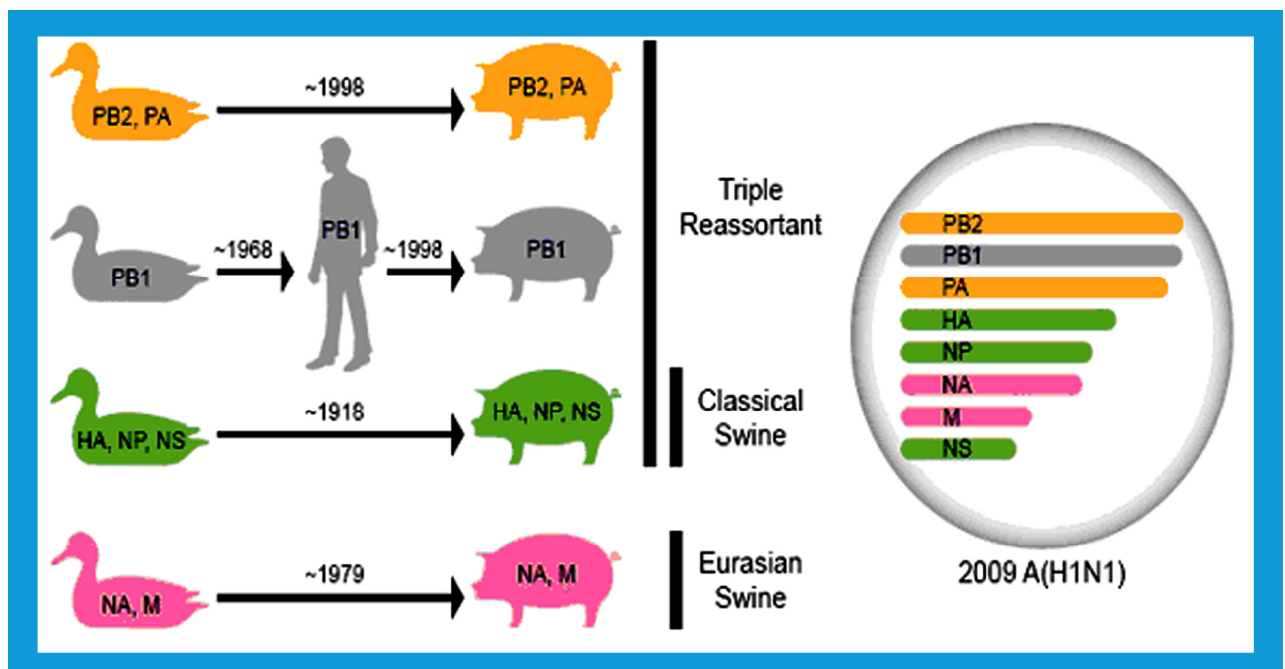
B. Las **variantes mayores o sustituciones antigénicas** (*antigenic shift*): Tienen lugar en los virus de la gripe de tipo A e implican el cambio total del antígeno HA, del antígeno NA o de ambos. Suponen la aparición de un subtipo diferente del difundido hasta entonces en la población, frente al cual ésta carece totalmente de memoria inmunológica y, por consiguiente, de inmunidad. Las pandemias gripales ocurren como consecuencia de la aparición de un nuevo subtipo del virus gripal A por una variación mayor. (47).

Hasta ahora se han descrito 16 subtipos de HA (H1-H16) y 9 subtipos de NA (N1-N9). La plasticidad de estos virus, que les permite incorporar pequeños y grandes cambios, es la base de su evolución constante y de su naturaleza de agente zoonótico con capacidad para adaptarse a nuevos hospedadores y llegar a adquirir capacidades pandémicas para el ser humano.

1.2.4. Nuevo virus pandémico A (H1N1)v de 2009

El nuevo virus es el resultado de un reordenamiento genético entre el virus porcino americano reordenado de 1997-1998 y el de Eurasia de 1976 (ver antecedentes de gripe humana de origen porcino) (48, 49). Esta combinación de segmentos genéticos del nuevo virus no había sido vista antes. Los segmentos NA y M proceden del linaje porcino euroasiático; los segmentos HA, NP y NS del porcino americano; los segmentos PB1, PB2 y PA, o complejo polimerasa, del virus porcino con reordenación triple, si bien el primero procede del componente humano que tuvo su origen en el virus humano H3N2 de 1968, y los otros dos del componente aviar (35). Por lo tanto, el nuevo virus contiene 5 segmentos de origen porcino, 2 aviares y 1 humano. (Figura 2).

Figura 2: Segmentos genéticos, hospedador y año de introducción (48)



En un principio se pensaba que esta nueva variante no presentaba ninguna característica molecular conocida que confiriera un incremento de la transmisibilidad o de la patogenicidad. Sin embargo en 2010, un estudio realizado en China demostró que existen mutaciones localizadas en el dominio de la función viral que pueden tener un papel en la adaptación del virus al humano y en su virulencia (50). Un estudio posterior en el que describen la aparición una mutación en la HA (Q310H) sugiere que puede haber una asociación entre esta mutación y el aumento de la mortalidad de los pacientes hospitalizados (51).

1.3. Epidemiología

Los virus gripales A y B son los causantes principales del síndrome gripal, implicándose en menor medida el tipo C. Los virus gripales de tipo A están ampliamente difundidos en la naturaleza en diferentes especies animales. Los mamíferos, en particular los cerdos, caballos y mamíferos marinos (focas, ballenas), sufren epizootias importantes (1). Entre los mamíferos, el ganado porcino ocupa un lugar destacado por la posibilidad de persistencia de determinados subtipos y por constituir un probable eslabón para la infección humana (12). Las aves salvajes, y en particular los patos y otras especies migratorias, constituyen el reservorio central de la gripe A. Las aves, además, representan un depósito natural de un amplio *pool* de genes, es decir, un reservorio genético en el que frecuentemente se pueden producir recombinaciones genéticas con la posterior diseminación y difusión de los virus por todo el mundo (12). La transmisión interespecies de los virus gripales A es un hecho comprobado, pero la especificidad de especie es importante. Son raros los casos de infección humana con un virus de origen animal bien documentado (52).

La principal fuente de infección es el hombre enfermo o portador de formas paucisintomáticas. La transmisión ocurre siempre por mecanismo aéreo directo. Los

fenómenos de agregación, más frecuentes en los meses fríos y en las instituciones cerradas, favorecen la difusión de los virus gripales cuya transmisibilidad es una de las más elevadas entre todas las infecciones humanas (53). Toda la población es susceptible; la única limitación se debe a la existencia de inmunidad por contactos previos con virus idénticos o antigénicamente próximos (53).

La gripe se presenta en forma de brotes epidémicos (gripe estacional) más o menos importantes, habitualmente todos los años y durante los meses fríos, como consecuencia de **las variaciones menores** de los virus A y B (ver variaciones antigénica en la sección anterior) (52). Las epidemias progresan en la población a través de los grupos familiares y en las instituciones cerradas y pueden afectar a la mayoría de la población (53).

La gripe A puede, además, ocasionar pandemias como consecuencia de la aparición de **variaciones mayores** frente a las que la población carece absolutamente de inmunidad. Se presentan varias ondas epidémicas, que no ocurren necesariamente en los meses fríos, y afectan en pocos meses a todo el mundo.

1.3.1. Epidemiología de la gripe estacional

La incidencia de la gripe estacional suele aumentar en otoño y empieza a declinar a mediados de primavera. En el hemisferio norte, lo que corresponde a noviembre y marzo, en el hemisferio sur, lo que corresponde a abril y septiembre (53). En los países tropicales, la gripe se presenta esporádicamente durante todo el año, pero la incidencia es mayor en los meses lluviosos (53). También están bien documentados brotes de gripe estacional inter-pandémicos, particularmente cuando el virus se disemina en comunidades con poca o nada inmunidad preexistente a los virus circulantes. La intensidad de la gripe estacional varía de año a año y depende en gran medida el tamaño de la población susceptible, que a su vez depende del grado de

variación antigénica que ha ocurrido en las temporadas anteriores (53). Tanto las infecciones previas naturales como la vacunación reducen la población susceptible si los anticuerpos neutralizantes del virus están presentes, pero si se produce un cambio antigénico esto deriva en una población más vulnerable y en consecuencia, mayor incidencia de la enfermedad (1).

Las tasas promedio de ataque durante las epidemias varían desde 10% a 20%, pero puede ser tan alta como 40% a 50% en las poblaciones particularmente susceptibles (2). La tasa de ataque suele ser mayor en niños y ancianos (1, 2). En los brotes estacionales, la incidencia específica por edad por lo general sigue un curso predecible, siendo los niños afectados a principios de la epidemia, seguido de sus cuidadores adultos, y, por último, las personas mayores (12).

Las tasas de hospitalización y mortalidad son mayores en pacientes con enfermedades crónicas, fundamentalmente enfermedad cardiopulmonar (54).

La mortalidad promedio de la gripe en los países desarrollados es de aproximadamente 12 de cada 100.000 personas, pero en algunas poblaciones la morbilidad y la mortalidad son significativamente más altas (53). Esto ocurre en los extremos de la vida, con un aumento importante en la mortalidad por encima de los 64 años de edad, en personas asmáticas y con otras enfermedades pulmonares crónicas, enfermedades cardiovasculares, diabetes, cirrosis hepática, inmunodeficiencia, hemoglobinopatías, enfermedades malignas, y disfunción renal (1, 2).

1.3.2. Epidemiología de la gripe pandémica

Como se ha mencionado anteriormente, la gripe A puede ocasionar pandemias como consecuencia de la aparición de variantes mayores frente a las que la población carece absolutamente de inmunidad (55). La epidemiología de las anteriores pandemias se ha revisado en la sección 1.1.

Pandemia de 2009: gripe A (H1N1) de origen porcino

En abril de 2009, el gobierno de EE.UU notificó a la OMS la detección de un nuevo virus influenza A (H1N1) de origen porcino [A (H1N1)v] en un niño de 10 años y una niña de 9, con un síndrome gripal leve (37). Se determinó que el virus de la gripe aislado en cada niño presentaba una composición genética que no había sido identificada antes. La ausencia de antecedentes epidemiológicos de exposición con cerdos sugería la posibilidad de que se tratara de una transmisión persona-persona. (37). Posteriormente se notificaron en EE.UU 4 casos más en California y 2 en Texas, en los que se detectó el nuevo virus. Los CDC informaron que la misma cepa viral se había aislado en muestras de pacientes provenientes de México (56).

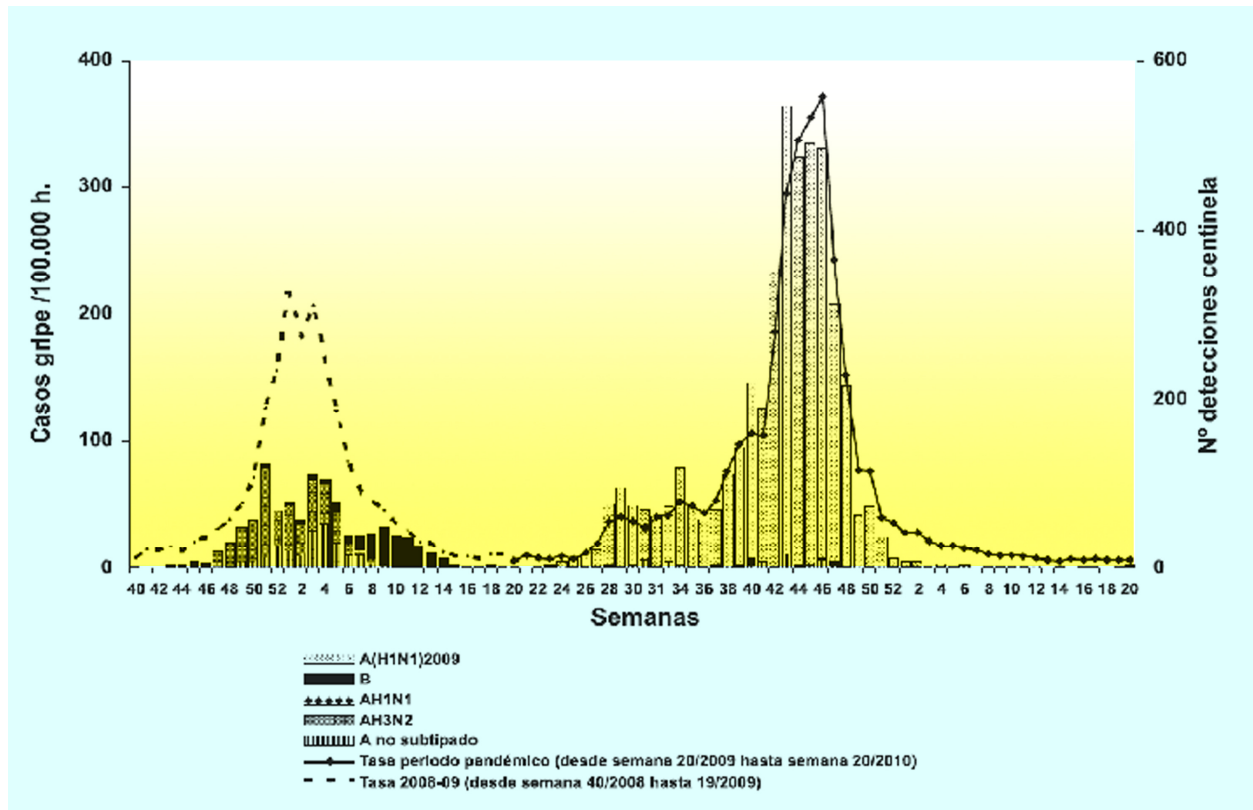
El 27 de abril la OMS elevó el nivel de alerta pandémica de fase 3 a 4, tras verificar la existencia de transmisión interhumana capaz de causar brotes a nivel de la comunidad (57). El nuevo virus continuó diseminándose alcanzado en poco tiempo una amplia diseminación internacional. En mayo había 23 países afectados, con 1.893 casos declarados y se elevó en nivel de alerta a 5 (58). La diseminación continuó intensamente en los meses de mayo y junio, de manera que a fecha de 1 de junio había 62 países afectados, con 17.410 casos y 115 muertes (58).

En junio, la OMS elevó la fase de alerta de pandemia, de la 5 a la 6, o de pandemia establecida, al verificarse la existencia de transmisión comunitaria mantenida en al menos un país de una región de la OMS distinta.

En España, el 26 de abril se inició el estudio de tres pacientes que habían vuelto de México, confirmándose dos de ellos el día 27, como infección causada por el nuevo virus de la gripe A. De este modo, España, fue el primer país europeo que llevó a cabo el diagnóstico específico del virus A (H1N1)v.

España, como la mayoría de países del hemisferio Norte, experimentó una circulación de virus A (H1N1)v durante el verano de 2009, fuera del periodo habitual de actividad gripal, que evolucionó de forma creciente hasta la presentación a principios del otoño de 2009 de la primera onda pandémica en nuestro territorio (37). El nivel de actividad gripal en España permaneció por encima de los valores propios del periodo estival y se notificaron brotes localizados por virus A (H1N1)v durante todo el verano. En la Figura 3 se muestra la evolución de la tasa de incidencia de gripe semanal durante el periodo habitual de vigilancia de la temporada 2008-2009 y durante el periodo pandémico en España, con tasas máximas de incidencia de gripe de 211 y 372 casos/100.000 habitantes, respectivamente.

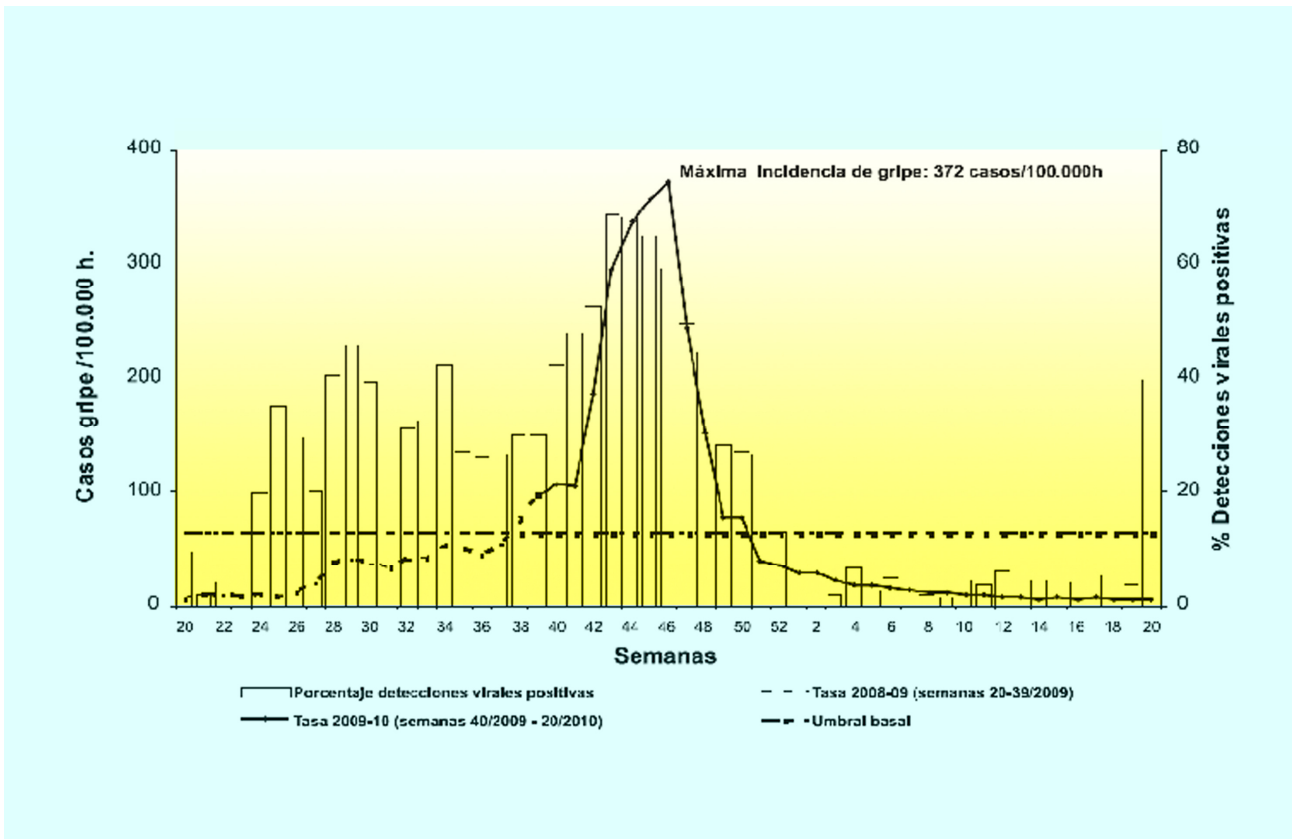
Figura 3: Tasas de incidencia y detecciones virales semanales en España. Temporada 2008-2009 y periodo pandémico. (59)



La tasa global de incidencia de gripe aumentó progresivamente durante el verano de 2009, aunque no se superó el umbral basal hasta la semana 38/2009 (del 20 al 26 de septiembre). Se considera que el inicio de la onda pandémica por gripe A (H1N1)v en España se produjo en la semana 40/2009 (del 4 al 10 de octubre). Esta fecha de inicio de la onda pandémica podemos calificarla de precoz si la comparamos con la de las ondas epidémicas de temporadas anteriores.

El pico máximo de incidencia de gripe se alcanzó en la semana 46/2009 (del 15 al 21 de noviembre) con 372,15 casos por 100.000 habitantes (Figura 4).

Figura 4: Periodo pandémico en España. Tasa de incidencia semanal y porcentaje de virales positivas. (59)



La intensidad de la onda pandémica fue moderada en comparación con ondas estacionales previas. El mayor nivel de transmisión de la enfermedad ocurrió en menores de 15 años, tanto en España como en Europa (60). La incidencia en los mayores de 64 años fue inferior en la pandemia, en relación a ondas estacionales de gripe previas (60). Se acepta que una posible explicación a este hecho reside en un cierto grado de protección frente al virus A (H1N1)v en personas de edad avanzada, debido a una inmunidad residual por exposición a cepas antigénicamente similares que circularon en la primera mitad del siglo pasado (61).

La tasa de letalidad de la enfermedad sintomática se estimó en 0,048% en EE.UU y 0,026% en el Reino Unido. En nuestro país se calculó una cifra de letalidad global de 0,43 defunciones por 1.000 casos de gripe pandémica (60). La menor tasa de letalidad se observó en el grupo de 5-14 años (60). En general, en nuestro país, esta pandemia se caracterizó a por un carácter leve, teniendo en cuenta tasas de letalidad o mortalidad, si bien se observó un desplazamiento de las defunciones confirmadas por el virus pandémico a edades más jóvenes (60).

Las tasas de hospitalización más altas fueron en niños menores de 5 años, en especial los menores de 1 año, y menor para las personas de 65 años de edad (60).

En EE.UU, entre los pacientes que fueron hospitalizados con gripe pandémica, entre el 32 y el 45% eran menores de 18 años (62). Entre un 9 y un 31% de los pacientes hospitalizados fueron ingresados en una unidad de cuidados intensivos (UCI), donde del 14 al 46% de los pacientes murieron (62). En general, la tasa de letalidad entre los pacientes hospitalizados fue más alta entre los pacientes de más de 50 años y más baja entre los niños.

1.4. Aspectos clínicos de la gripe

1.4.1 Patogénesis y transmisión

La infección producida por el virus de la gripe comienza con una infección local en el tracto respiratorio superior. El virus se transmite por vía aérea mediante aerosoles y penetra en el sujeto susceptible a través de las vías respiratorias. En el tracto respiratorio superior el virus se une a los receptores de ácido neuroamínico de las células ciliadas del epitelio respiratorio. Tras esta primera etapa de unión del virus a las células, mediada fundamentalmente por la glicoproteína NA, el virus entra en la célula y comienza el ciclo replicativo que dura alrededor de 6 h. La replicación del virus está mediada fundamentalmente por la otra glicoproteína, la HA, que es la principal causante del poder patógeno del virus. El virus se multiplica en las células de las vías respiratorias, desencadenando rápidamente un proceso inflamatorio local que se activa secuencialmente, en cascada, con una importante secreción de citoquinas, especialmente proinflamatorias, responsables en gran medida del síndrome clínico gripal.

El virus de la gripe está presente en las secreciones respiratorias de personas infectadas, por lo que la infección se transmite a través de las gotículas generadas durante los estornudos y la tos (63, 64). Aunque los síntomas sistémicos son frecuentes, la replicación viral parece ocurrir solamente en el tracto respiratorio.

La adquisición del virus a través de gotículas requiere un contacto estrecho con una persona infectada, ya que estas partículas no permanecen suspendidas en el aire y viajan sólo distancias cortas (64). Algunos estudios sugieren que estas gotículas pueden convertirse en aerosoles y permanecer suspendidos en el aire durante largos períodos de tiempo (65). Sin embargo, la transmisión por el aire a través de distancias largas no se ha documentado. El contacto con superficies contaminadas con estas

gotículas respiratorias es otra fuente potencial de transmisión, pero no es una vía de transmisión bien establecida.

El periodo de incubación varía entre 1 y 6 días (66). Durante este periodo, la cantidad de virus y el grado de infección de la mucosa van aumentando progresivamente hasta que se inician los síntomas, lo cual coincide con la máxima concentración de virus.

En adultos sanos la excreción del virus se puede detectar a las 24- 48 horas antes de inicio de la enfermedad, aunque en títulos mucho menores que durante el período sintomático (67). La duración de la excreción viral es de aproximadamente 5 días (68). Se han documentado períodos más largos de excreción viral en niños, adultos de edad avanzada (69), pacientes con enfermedades crónicas (70), y pacientes inmunodeprimidos (71, 72).

1.4.2 Manifestaciones clínicas habituales

Generalmente la gripe es un cuadro de inicio brusco que se caracteriza por la presencia de fiebre, cefalea, mialgia y malestar general después de un período de incubación de uno a seis días. Estos síntomas se acompañan de manifestaciones de infección de vías respiratorias, como tos no productiva, dolor de garganta y rinorrea (73). Sin embargo, la gripe también puede producir un amplio espectro de otras presentaciones que pueden ir desde enfermedades respiratorias afebriles similares al resfriado común, hasta enfermedades en la que los signos y síntomas sistémicos predominan sobre la afección del tracto respiratorio.

En los casos de gripe no complicada, los hallazgos físicos en general son escasos. El paciente suele presentar fiebre, hiperemia, dolor de garganta intenso. A la exploración el paciente puede presentar linfadenopatía cervical leve que es más

frecuente en los pacientes más jóvenes. No suelen aparecer alteraciones importantes a la exploración física del tórax, aunque se han descrito leves defectos ventilatorios y aumento del gradiente de difusión alveolar-capilar (74).

Los pacientes con gripe no complicada generalmente mejoran gradualmente en un periodo de dos a cinco días, aunque la enfermedad puede durar una semana o más. Algunos pacientes presentan síntomas persistentes de debilidad, conocido como astenia postgripal, que puede durar varias semanas.

1.4.3 Complicaciones

Complicaciones pulmonares:

Existen dos tipos de neumonía asociadas a la gripe: la neumonía viral primaria y la bacteriana secundaria. Además, durante un brote de gripe pueden aparecer otros síndromes pulmonares menos claros y más leves como la traqueobronquitis, neumonía focal o mixta viral-bacteriana (75-77).

Neumonía viral Primaria: ocurre cuando la infección del virus involucra directamente a los pulmones, produciendo, por lo general, una neumonía grave. Afecta sobre todo a personas con enfermedades de base, clasificados como pacientes de alto riesgo para el desarrollo de esta complicación (Tabla 1). Raramente se produce en adultos jóvenes aparentemente sanos (78). La sospecha clínica de neumonía viral primaria se produce cuando los síntomas de la gripe persisten y aumentan en lugar de resolverse en un paciente con gripe aguda. Los síntomas que pueden orientar hacia esta complicación son: fiebre alta, y cualquier causa de deterioro respiratorio (78, 79). Este tipo de neumonía es la más grave, aunque menos frecuente. Las manifestaciones típicas radiológicas de la neumonía viral primaria incluyen opacidades reticulares bilaterales o un patrón reticulonodular con o sin consolidación superpuesta (80). Con

menor frecuencia, las radiografías muestran áreas focales de consolidación, sobre todo en los lóbulos inferiores, sin opacidades reticulares o reticulonodulares.

Neumonía bacteriana secundaria: es una complicación importante de la gripe y causa aproximadamente el 25% de todas las muertes asociadas a esta entidad (81).

El sello distintivo de la presentación clínica en los pacientes con neumonía bacteriana secundaria es la exacerbación de la fiebre y síntomas respiratorios después de una mejoría inicial. La fiebre puede disminuir durante uno o más días pero posteriormente el paciente sufre recaídas con fiebre, tos, expectoración purulenta, y evidencia radiográfica de infiltrados pulmonares.

El patógeno bacteriano más común es *Streptococcus pneumoniae* que representa al rededor del 48% de los casos de neumonía bacteriana secundaria (82). *Staphylococcus aureus*, es el segundo microorganismo más frecuente (19%). *Streptococcus pyogenes* y *Haemophilus influenzae* también pueden aparecer como agentes etiológicos de la neumonía bacteriana secundaria (82).

Como hemos dicho anteriormente, los pacientes con gripe pueden sufrir exacerbación de sus enfermedades de base como asma, EPOC o enfermedades cardiovasculares, lo cual contribuye a un aumento de la mortalidad y morbilidad de estos pacientes.

Otras complicaciones pulmonares:

Crup: en los brotes de gripe de los tipos A y B aparecen cifras significativas de casos de este cuadro. El cuadro asociado a la gripe de tipo A parece ser más grave pero menos frecuente que el provocado por el virus parainfluenza o virus respiratorio sincitial.

Exacerbación de EPOC: la exacerbación aguda de una bronquitis crónica es bastante frecuente. Otras enfermedades que puede verse afectadas por la gripe son el asma y la fibrosis quística.

Complicaciones no pulmonares

Otras complicaciones importantes de la gripe incluyen la miositis y rabdomiolisis, que se han descrito con mayor frecuencia en niños (83, 84). Raramente pueden aparecer otras complicaciones como encefalopatía, mielitis transversa, miocarditis, pericarditis y síndrome de Reye.

Los pacientes clasificados como pacientes de alto riesgo para el desarrollo de complicaciones están resumidos en la tabla 1.

Tabla 1: Grupos de riesgo para el desarrollo de complicaciones de la gripe.

1	Niños menores de 2 años
2	Adultos ≥ 65 años
3	Pacientes con enfermedades pulmonares crónicas (incluyendo asma), cardiovasculares, renales, hepáticas, hematológicas (incluyendo la enfermedad de células falciformes), metabólicas (incluyendo diabetes mellitus), neurológicas, neuromusculares y los trastornos del desarrollo neurológico.
4	Pacientes inmunodeprimidos (incluyendo inmunosupresión causada por medicamentos o por el virus de inmunodeficiencia humana).
5	Mujeres embarazadas o en el postparto (dentro de las 2 semanas después del parto).
6	Obesidad mórbida (índice de masa corporal [IMC] ≥ 40 para adultos o IMC $> 2,33$ desviaciones estándar por encima de la media para los niños).
7	Pacientes que vivan en residencias de ancianos u otras instituciones sanitarias.

1.4.4 Características clínicas de la gripe pandémica de 2009

Los mecanismos de transmisión persona a persona del virus de la gripe A (H1N1)v fueron similares a los de la gripe estacional, pero el papel de las pequeñas partículas de los aerosoles, las gotas grandes, y fómites es incierto (85). El período de incubación varió entre 1 y 7 días, similar al de la gripe estacional (86). Los datos publicados sugieren que hasta un 80% de los pacientes eliminaron virus durante 5 días, 40% durante 7 días, y el 10% durante 10 días o más (71). Los pacientes inmunodeprimidos pueden excretar el virus hasta 3 semanas después de la aparición

de los síntomas (87). No existen datos que evalúen la posible asociación de una excreción prologada (EVP) con mal pronóstico o evolución de estos pacientes.

Los signos y síntomas de la gripe pandémica A (H1N1)v fueron similares a los de la gripe estacional (88), aunque las manifestaciones gastrointestinales aparecieron con más frecuencia en los pacientes con gripe A (H1N1)v (89, 90). La gravedad de los síntomas fue inferior a la descrita durante la pandemia de gripe de 1918 (91).

En un estudio de vigilancia epidemiológica en el que se compararon las características clínicas de la gripe pandémica A (H1N1)v, la gripe estacional H1N1, y la gripe estacional H3N2, los resultados sugieren que las manifestaciones clínicas y la tasa de hospitalización fueron similares entre los pacientes infectados con cada una de las tres cepas (90). Sin embargo, se observó una mayor tasa de neumonía tanto viral primaria como bacteriana secundaria en pacientes con gripe A (H1N1)v.

También se sabe que los pacientes con gripe A (H1N1)v presentaron tasas más altas de complicaciones extrapulmonares, mayor número de ingresos en unidades de cuidados intensivos y mayor mortalidad, a pesar de que los pacientes eran más jóvenes y con menos comorbilidades (92).

Adultos y adolescentes: Los hallazgos clínicos más frecuentes fueron fiebre, tos, dolor de garganta, malestar general y cefalea. Los vómitos y diarrea fueron relativamente frecuentes, lo cual es una característica diferencial con la gripe estacional (93-95). Otros hallazgos incluyeron escalofríos, mialgias, y artralgias.

Mujeres embarazadas: Las mujeres embarazadas y sus fetos o recién nacidos presentaban mayor riesgo de infección por la gripe A (H1N1)v y mayor riesgo de sufrir complicaciones. En diferentes series publicadas, las mujeres embarazadas representaron un 6-10% de los pacientes que requirieron hospitalización o murieron durante la pandemia (96-99).

Niños: los síntomas y signos más comunes entre los niños con gripe A (H1N1)v fueron fiebre, tos, rinorrea, e hipoxemia. Además se observaron sibilancias y las molestias gastrointestinales fueron frecuentes (100). Durante la pandemia, los niños pequeños (<5 años y en especial <2 años) presentaban mayor riesgo de sufrir complicaciones (101).

Complicaciones:

Complicaciones pulmonares: Durante la pandemia reciente se registraron casos de neumonía rápidamente progresiva, insuficiencia respiratoria, y síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) (77, 102). En un estudio observacional realizado en 13 hospitales españoles, un 43% de los pacientes hospitalizados por gripe A (H1N1)v, a los que se realizó una radiografía de tórax, tuvieron neumonía (103). De estos, el 83% tenían neumonía viral primaria y 36% tenían neumonía bacteriana concomitante o secundaria. Los pacientes con neumonía presentaron tasas más altas de shock, mayor duración de la ventilación mecánica, más días de estancia en cuidados intensivos, y mayor mortalidad (103).

En cuanto a la neumonía bacteriana secundaria, esta representó entre un 4 y un 30% de los casos hospitalizados en Estados Unidos, Argentina, Australia, Nueva Zelanda y España (104-106). En el estudio español, citado anteriormente, *Streptococcus pneumoniae* fue la causa de complicación bacteriana más frecuente, aislándose como agente etiológico en un 70% de los casos (103). Comparando la incidencia de los microorganismos implicados en esta entidad durante la pandemia de 2009 con la epidemia anterior, y sólo *S. aureus* fue significativamente mayor (19 vs. 6%) (82).

Complicaciones no pulmonares: Las siguientes complicaciones neurológicas también ocurrieron en pacientes con gripe A (H1N1)v: encefalopatía o encefalitis, meningitis y síndrome de Guillain-Barré. Otras manifestaciones menos frecuentes incluyeron;

confusión, cuadriparesia, encefalomielitis diseminada aguda grave, accidentes cerebrovasculares y ataque isquémico transitorio (77, 92, 107, 108).

Otras complicaciones descritas en pacientes con gripe pandémica A (H1N1)v incluyeron miocarditis, insuficiencia renal, rabdomiolisis, síndrome hemofagocítico y fallo multiorgánico (108, 109).

1.5. Procedimientos diagnósticos:

El diagnóstico de laboratorio de la gripe puede llevarse a cabo mediante dos estrategias. Por un lado están los métodos directos, como el aislamiento del virus en cultivo celular y los métodos que permiten detectar el virus en las secreciones respiratorias del paciente (detección de antígenos y de ácidos nucleicos). Por otro lado está la estrategia de diagnóstico indirecto que mide la respuesta inmunitaria de tipo humoral a través de la detección de anticuerpos específicos en suero.

El aislamiento en cultivo celular es un método diagnóstico lento y tardío pero de extraordinaria importancia para la caracterización del virus y la realización de estudios epidemiológicos, antigénicos, y filogenéticos. Por el contrario, la detección de antígenos y ácidos nucleicos permite la realización de un diagnóstico de laboratorio rápido y preciso ayudando a la toma de decisiones terapéuticas. La aplicación de la serología reside principalmente en la realización de estudios poblacionales de cobertura vacunal.

Las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la gripe tienen limitaciones que pueden dar lugar a falsos resultados por lo que siempre deben interpretarse junto con la historia clínica del paciente. Podemos tener *falsos negativos* debido a una cantidad insuficiente de muestra o baja carga viral, recogida inapropiada, transportes inadecuados, aparición de nuevos subtipos para los cuales las técnicas disponibles no

son sensibles ni específicas. También podemos tener *falsos positivos* por baja especificidad.

Recogida y transporte de muestras. El requisito fundamental a la hora de valorar las muestras obtenidas a partir del tracto respiratorio es que éstas deben contener el mayor número posible de células epiteliales, que son en las que fundamentalmente se replica el virus. En este sentido, resultan apropiadas para la investigación de virus gripales las muestras respiratorias tales como los frotis de faringe o nasofaringe y los lavados o aspirados nasales o bronquiales. Estas muestras deben ser tomadas durante los primeros días de la enfermedad. En cuanto a muestras del tracto respiratorio inferior (TRI), disponible en pacientes intubados, no existen suficientes datos en la literatura sobre el valor de éstas muestras en la detección de virus de la gripe.

El transporte de las muestras debe realizarse a 4 °C (o en su defecto congeladas a -70 °C) con objeto de asegurar la infectividad del virus. La recuperación de los virus gripales a partir de la muestra se favorece utilizando un medio de transporte adecuado, que consiste en una solución salina a pH neutro con estabilizadores de proteínas, como el suero de albúmina bovina, y los antibióticos para reducir el crecimiento de bacterias que integran la microbiota acompañante.

1.5.1 Métodos directos

Aislamiento del virus: técnicas de cultivo

El Virus de la gripe fue aislado por primera vez en 1933, mediante la inoculación de muestras en la cavidad amniótica de huevos de gallina embrionados (110). En este método de aislamiento viral, los huevos inoculados se incuban a 33-35°C durante tres días para los aislados de virus de la gripe procedentes de mamíferos, y a 37°C para los aislados aviares de virus de la gripe A. Una vez finalizada la incubación, se analizan por hemaglutinación los fluidos amniótico y alantoideo en busca de la presencia de actividad vírica. Esta técnica ya no se aplica habitualmente para el aislamiento del virus. Solo se utiliza en laboratorios de referencia para lograr una alta sensibilidad para la detección y para obtener alto título reservas de virus.

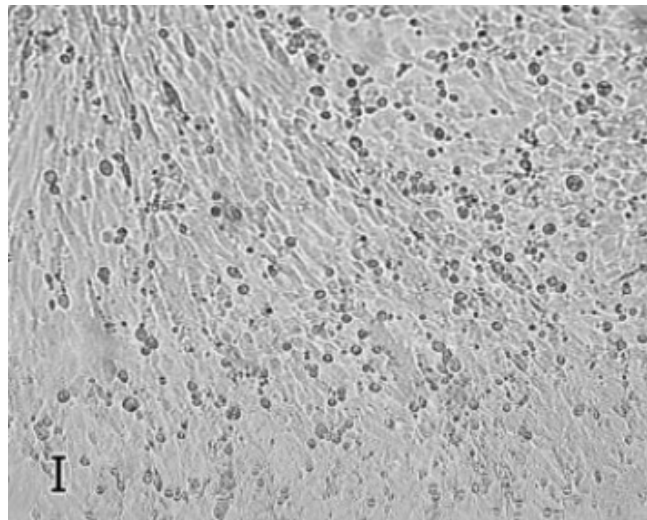
Cultivo convencional:

Los virus de la gripe son capaces de replicarse en diferentes líneas celulares primarias, diploides o continuas, aunque la susceptibilidad a la infección es baja en la mayoría de ellas. La línea celular más comúnmente utilizada son las células Madin Darby de riñón de perro (MDCK).

Las líneas celulares inoculadas con las muestras respiratorias de los pacientes se incuban a 33-35°C en presencia de tripsina para asegurar la activación proteolítica de los virus. La identificación de la existencia de crecimiento del virus sobre la monocapa de células se realiza mediante la observación del efecto citopático (ECP) causado sobre ellas, que consiste en la aparición de células degenerativas y redondeadas que se desprenden de la monocapa (Figura 5). El ECP puede ser causada por varios virus respiratorios, y no siempre se observa en las líneas de

células infectadas, por lo que la infección viral debe confirmarse por otros métodos que identifiquen el crecimiento vírico, como son la hemaglutinación, la hemadsorción o la detección de antígenos víricos mediante técnicas de inmunofluorescencia (110).

Figura 5: efecto citopático producido por virus de la gripe A en células RhMk. (111)



Cultivo rápido:

Como se ha comentado anteriormente, una de las principales desventajas del aislamiento de los virus de la gripe es el tiempo necesario de crecimiento e identificación en cultivo celular (4-7 días). Existen varios métodos capaces de detectar la presencia de los virus de la gripe de modo más precoz, entre uno y tres días después de la inoculación de la línea celular y antes de la aparición del efecto citopático. El más comúnmente utilizado es el *shell vial* (SV), en el que las muestras son directamente centrifugadas sobre la monocapa celular para facilitar la adherencia y penetración vírica. A las 24-48 horas se detecta la presencia de proteínas víricas mediante inmunofluorescencia (110). El diagnóstico por cultivo en SV es más rápido

que el diagnóstico por métodos convencionales (24-48 h vs. 7-13 días), con una sensibilidad equivalente (112).

Para el cultivo rápido en SV pueden utilizarse las líneas celulares habituales para el aislamiento del virus de la gripe comentadas anteriormente (MDCK) o líneas de células mixtas (por ejemplo, R-Mix) para detectar además otros virus respiratorios (113).

Aunque el cultivo viral juega un papel cada vez menos importante en el diagnóstico microbiológico de la gripe, muchos laboratorios que no tenían acceso a los ensayos moleculares durante la pandemia realizaron cultivo en SV para la detección de la nueva variante pandémica. La mayoría de estos laboratorios utilizaron líneas de células mixtas (114). Algunos estudios compararon el rendimiento de las células mixtas R-Mix con los métodos moleculares. Estos estudios muestran unas sensibilidades del cultivo en R-Mix que van desde 88,9% a 96,9% y una especificidad del 100% para la detección del virus influenza A (H1N1)v (115, 116).

Detección de antígenos víricos:

Los métodos más utilizados para la detección de antígenos víricos son la inmunofluorescencia y EIA (enzimo-inmuno análisis) que se pueden realizar directamente en la muestra clínica o bien en las células del cultivo en las que previamente se ha inoculado la muestra (117). Los antígenos víricos que se detectan mediante estos métodos son generalmente la HA y la NA. No obstante, debido a la variación antigénica que sufren estas glicoproteínas, también es posible diseñar métodos capaces de detectar otras proteínas menos variables como la nucleoproteína (NP) (110). En la actualidad, la mayoría de estas pruebas rápidas permiten distinguir virus tipo A de virus tipo B, pero su papel en la identificación de los diferentes subtipos de virus de la gripe A no está claro.

La principal ventaja de estos métodos es que son independientes de la infectividad del virus. Otra de sus ventajas es el hecho de que permiten una rápida obtención de resultados, generalmente en unas pocas horas después de la recepción de la muestra. Como limitación reseñable cabe apuntar que los resultados a menudo son difíciles de interpretar, la especificidad dependerá de la experiencia del personal que los realice y la sensibilidad suele ser baja (117).

Los tipos de muestras que se pueden utilizar para estos test rápidos de detección de antígeno son en orden decreciente de sensibilidad: aspirados nasofaríngeos, exudado/lavado nasofaríngeos, y exudado faríngeo (118). La sensibilidad del test va a depender de la calidad de la muestra y del momento de la toma de la muestra en relación con el tiempo de aparición de los síntomas (119). La sensibilidad óptima se logra cuando las muestras se recogen en los primeros días de la enfermedad, ya que el pico máximo de carga viral tiene lugar dentro de las primeras 48 horas desde la aparición de los síntomas (120). Los datos de sensibilidad y especificidad que se encuentran en la literatura son muy variables. Hay datos de sensibilidad entre 57% y 90% y de especificidad entre 65% y 99% que se ven influidos por el tipo de población del estudio, el tipo de muestra, y el momento de la recogida de la misma (119).

La sensibilidad de los tests rápidos para la detección del virus pandémico A (H1N1)v es inferior a la que presentan para la detección de los virus estacionales (116, 121-124) aunque algunos estudios sugieren que la sensibilidad es comparable (125, 126) o superior (127).

La utilización de estos tests rápidos con sensibilidades subóptimas tuvo importantes implicaciones en el manejo clínico de los pacientes durante la pandemia. Como consecuencia de esto se recomendó que los resultados negativos de la prueba no debían utilizarse para descartar la infección, y que todo resultado negativo debía

confirmarse con una técnica más sensible. También se recomendó que en pacientes en los que el tratamiento con antivirales estaba indicado debían ser tratados empíricamente con independencia del resultado de un test rápido negativo hasta la confirmación del resultado.

Métodos de detección de ácidos nucleicos:

Las técnicas de diagnóstico molecular son consideradas como las más sensibles, específicas, y versátiles para el diagnóstico de la gripe y están sustituyendo al aislamiento viral como método de referencia (128, 129). El método más utilizado para la detección de ácidos nucleicos del virus de la gripe es la transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Normalmente los genes diana (target) de estas técnicas de RT-PCR son genes muy conservados como los que codifican para la proteína matriz (M), la nucleoproteína (NP) o el segmento génico NS, que permiten diferenciar entre los tres géneros: virus de la gripe A, B o C. Otros genes diana considerados de interés, en concreto en la detección de virus tipo A, son la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), los cuales permiten conocer el subtipo del virus gripal.

Con respecto a la detección mediante técnicas de PCR convencional a tiempo final, además de las técnicas "caseras" o *in house*, existen *kits* comerciales, en formato múltiple, que tienen como objetivo aumentar la especificidad. Uno de los principales inconvenientes de la PCR convencional o a tiempo final es que se trata de un método cualitativo y que el tiempo requerido para la emisión de los resultados es de 48-72 horas.

El empleo de la PCR a tiempo real utilizando diferentes sondas marcadas fluorogénicamente (TaqMan, sondas de hibridación, *molecular beacon*), cebadores marcados que dan lugar a un amplicón autofluorescente (*primers scorpions*, *primers*

sunrise) o agentes intercalantes, como el Sybr-Green, están desplazando el uso de la PCR convencional. Estos métodos de PCR a tiempo real permiten la cuantificación, además de reducir el riesgo de contaminaciones y el tiempo requerido para la emisión de los resultados ya que no es necesario el análisis posterior de los amplicones obtenidos.

También es posible realizar una PCR múltiple que además de detectar los tres géneros del virus permitiría el subtipado del virus A y/o la detección simultánea de otros virus respiratorios.

Ninguna de las otras técnicas de diagnóstico disponibles es capaz de subtipar. La tipificación de los virus de influenza A, no se realiza rutinariamente en la mayoría de los laboratorios clínicos. Realmente, el subtipado se limita en gran medida a los laboratorios de salud pública.

La capacidad de determinar el subtipo de los virus de la gripe tipo A fue crítico durante la pandemia para tener conocimiento de la extensión geográfica de la propagación y comprender las principales características virológicas, en particular la capacidad de transmisión de la nueva cepa.

1.5.2. Métodos Indirectos

Las pruebas serológicas se basan en la detección de anticuerpos específicos frente al antígeno HA del virus gripal en el suero del paciente. Estos anticuerpos aparecen por primera vez alrededor de las 2 semanas posteriores al inicio de la infección y alcanzan los niveles máximos a las 4-7 semanas (130). Estos métodos raramente se utilizan en la práctica clínica habitual, no obstante, un análisis retrospectivo puede establecer un diagnóstico clínico en ausencia de otra prueba

diagnóstica (110). Además, constituyen una herramienta útil en la vigilancia epidemiológica de la circulación de los virus gripales.

Una de las principales dificultades del diagnóstico serológico es la necesidad de evaluar muestras de sueros pareadas ya que debe constatarse un incremento significativo del título de anticuerpos entre dos muestras consecutivas separadas entre dos y cuatro semanas (110). Los ensayos serológicos más frecuentemente utilizados son la reacción de fijación del complemento, la inhibición de la hemaglutinación y la neutralización.

La reacción de fijación del complemento se utiliza para la detección de anticuerpos frente a la NP del virus, que está altamente conservada (131). Estos ensayos tienen un valor importante en el caso de la circulación de nuevas variantes antigénicas, frente a las cuales no haya disponibilidad de anticuerpos monoclonales frente a la HA (132). No obstante, el aumento en el título de fijación del complemento después de una infección gripal es lento y el ensayo por sí solo tiene una sensibilidad relativamente baja (131).

La inhibición de la hemaglutinación se usa habitualmente para el diagnóstico y de los virus de la gripe A y B y para el subtipado de los virus de la gripe A. El título de anticuerpos presentes en una muestra de suero se relaciona de manera directa con la protección o susceptibilidad del paciente frente a la infección gripal (130). Se utiliza ampliamente para medir la respuesta del paciente a la administración de la vacuna de la gripe (131). Sin embargo, la realización e interpretación de esta técnica es compleja y, frecuentemente, subjetiva, por lo que precisa personal cualificado para su realización. Es por ello muy habitual que esta técnica carezca de reproducibilidad cuando se realiza por distintos laboratorios. Por otro lado, aunque su ventaja más evidente es su elevada especificidad, se contrarresta por la baja sensibilidad.

El principio básico del ensayo de neutralización del suero es la inhibición de la replicación vírica mediante anticuerpos específicos. Los títulos de anticuerpos neutralizantes presentes en el suero del paciente, obtenidos mediante esta técnica, se correlacionan perfectamente con los obtenidos en los ensayos de inhibición de hemaglutinación (130). El mayor inconveniente que presenta esta técnica es que los anticuerpos monoclonales utilizados tienen que ser validados a menudo con objeto de comprobar que son capaces de reaccionar frente a las nuevas variantes del virus de la gripe (130).

1.5.3 Métodos de detección de resistencia a antivirales.

En la actualidad, los métodos existentes para la detección de resistencia a antivirales incluyen: (i) el ensayo de inhibición enzimática de la NA y (ii) ensayos para detectar marcadores moleculares de resistencia antiviral como la secuenciación convencional de Sanger, la pirosecuenciación, y los métodos basados en RT-PCR.

Ensayo de inhibición de la NA:

Es un método tradicional para detectar la resistencia del virus de la gripe basado en cultivo celular. El resultado final del estudio (reducción de la sensibilidad o resistencia) puede determinarse independientemente de la patogénesis molecular de tal resistencia.

Las elevaciones en la concentración inhibitoria 50% (CI50), sin embargo, no son suficientes para definir la resistencia y se utilizan en combinación con la secuenciación para identificar marcadores moleculares de resistencia (133, 134).

Una limitación de este método es que el virus de la gripe B presenta mayor CI50 basales lo que puede dar lugar a interpretación errónea de la resistencia del virus en pacientes con infecciones mixtas por virus A y B. Otras limitaciones de la utilización

de este ensayo son; la necesidad de aislamiento viral y la sobrestimación de la resistencia debido a la selección o expansión de mutantes resistentes durante la propagación viral.

A pesar de estas limitaciones, este método sigue siendo una técnica esencial para determinar el papel de las nuevas mutaciones identificadas por secuenciación.

Pirosecuenciación:

Es una técnica que ha surgido en los últimos años. Ha sido utilizada con éxito para identificar y detectar los marcadores moleculares de resistencia antiviral de los virus de la gripe estacional H1N1 y H3N2 (135, 136), el virus H5N1 (137), el virus de la gripe pandémica (H1N1)v (138), y los virus de la gripe B (139).

Es el método es empleado por el CDC para la detección de la resistencia antiviral directamente en muestras clínicas y se utiliza en combinación con los ensayos de inhibición de la NA para detectar marcadores moleculares de resistencia.

Entre las ventajas de la pirosecuenciación se encuentran: (i) presenta una elevada sensibilidad con un tiempo de respuesta reducido, con resultados disponibles en menos de 5 h, (ii) permite identificar nuevas mutaciones en el área del genoma que se secuencia, y por lo tanto, detectar nuevos marcadores de resistencia, y (iii) permite detectar mutantes presentes, con prevalencias de un 5 a un 10%, en poblaciones virales mixtas. (140).

Esta tecnología también presenta algunas limitaciones como: (i) los determinantes moleculares de la resistencia a inhibidores de la NA no están del todo caracterizados, (ii) el diseño de los cebadores requiere un conocimiento previo del

subtipo de virus, dado que resistencia a la NA es tipo y subtipo específico, (iv) requiere tecnología y personal especializados.

Métodos basados en RT-PCR en tiempo real:

Varios estudios recientes (141-143) han descrito el desarrollo de RT-PCR en tiempo real para la detección de la mutación H275Y que está asociada con resistencia a oseltamivir y demostró estar presente en todos virus A (H1N1)v resistentes analizados hasta el momento.

Una ventaja importante de estos ensayos es que muchos laboratorios clínicos ya cuentan con la infraestructura y los conocimientos necesarios para el desarrollo y ejecución de ésta técnica. Otra ventaja es que el tiempo de respuesta es de 3 a 4 horas. Además se trata de una técnica automatizada y de una elevada sensibilidad.

El papel de las pruebas de sensibilidad a antivirales en la rutina clínica es causa de debate, aunque han demostrado ser de utilidad en el contexto de la epidemiología de la gripe local, anual. Un posible enfoque sería su aplicación en estudios de vigilancia de resistencia en poblaciones de alto riesgo como pacientes con EVP y aquellos que estén en áreas con mayores tasas de resistencia a antivirales (144-148).

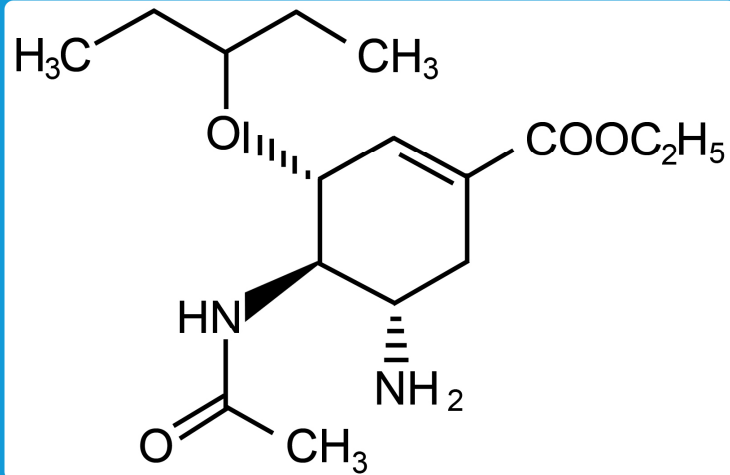
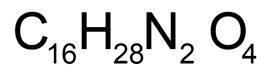
1.6 Tratamiento:

En la actualidad existen 2 grupos de agentes antivirales aprobados para el tratamiento/profilaxis de la gripe: los inhibidores de la neuroaminidasa y los adamantanos.

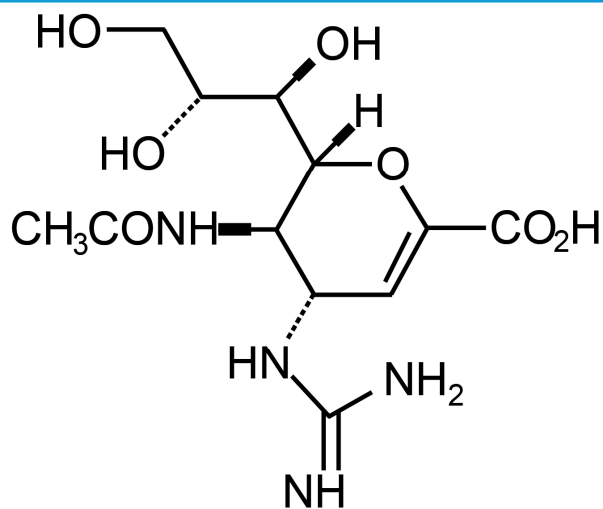
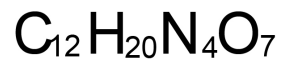
1.6.1 Inhibidores de la Neuroaminidasa:

Zanamivir y oseltamivir son los dos antivirales que pertenecen al grupo de los inhibidores de la neuraminidasa.

Oseltamivir



Zanamivir



Mecanismo de acción:

Los inhibidores de la NA son análogos de ácido siálico que inhiben de manera selectiva y competitiva las neuraminidasas del virus de la gripe A y B. Como ya se ha comentado anteriormente, estas enzimas son glucoproteínas situadas en la superficie del virión cuya actividad es esencial para la liberación de partículas virales nuevamente formadas a partir de la célula infectada de así como para la propagación de éstas en el organismo (149).

Farmacocinética:

Oseltamivir se absorbe fácilmente en el tubo digestivo después de la administración oral del profármaco (oseltamivir fosfato) y se transforma ampliamente en su metabolito activo (oseltamivir carboxilato), sobre todo por las esterasas hepáticas. Como mínimo, el 75 % de la dosis oral llega hasta la circulación sistémica en forma del metabolito activo. Las concentraciones plasmáticas del profármaco y del metabolito activo son proporcionales a la dosis y no se alteran con la administración concomitante de los alimentos. El volumen medio de distribución de oseltamivir carboxilato es de aproximadamente 23 litros. Los estudios in vitro han demostrado que ni oseltamivir ni el metabolito activo son sustratos, ni tampoco son inhibidores, de las principales isoformas del citocromo P450. El oseltamivir absorbido se elimina principalmente (>90 %) mediante su conversión en oseltamivir carboxilato que ya no se metaboliza, sino que se elimina en la orina. El metabolito activo se elimina exclusivamente por excreción renal. La insuficiencia renal reduce el aclaramiento del oseltamivir siendo necesaria una reducción de la dosis. En los pacientes con disfunción hepática, no cabe esperar un aumento significativo de la exposición al oseltamivir ni tampoco una disminución significativa de la exposición a su metabolito activo.

En las personas de la tercera edad (edad entre 65 a 78 años) la exposición al metabolito activo en el estado de equilibrio resultó un 25 a 35 % más alta que en adultos menores de 65 años, cuando se trataron con dosis comparables de oseltamivir. Las semividas observadas en ancianos se asemejaron a las de los adultos jóvenes. Teniendo en cuenta la exposición y la tolerancia a este medicamento, no se precisa ningún ajuste posológico en los pacientes ancianos, a menos que haya evidencia de alteración de la función renal (aclaramiento de creatinina inferior a 30 ml/min)

Zanamivir no es biodisponible por vía oral, se comercializa como un polvo seco para inhalación. Se deposita directamente en el tracto respiratorio a través de un inhalador (Diskhaler, Glaxo Wellcome). Zanamivir alcanza concentraciones muy elevadas en el tracto respiratorio, del 10 al 20% del compuesto activo llega a los pulmones, y el resto se deposita en la orofaringe. La excreción es fundamentalmente renal, pero teniendo en cuenta la biodisponibilidad sistémica limitada, no hay necesidad de modificar la dosis en pacientes con insuficiencia renal. La vida media pulmonar es de 2,8 horas (150). Zanamivir no debe ser reconstituido en formulaciones líquidas y no se recomienda para su uso nebulizadores o ventiladores mecánicos.

Efectos adversos:

Tanto zanamivir como oseltamivir son generalmente bien tolerados.

Oseltamivir:

Los efectos adversos más comunes asociadas al uso de oseltamivir son náuseas y vómitos. Ocurren en aproximadamente un 15% de los pacientes. Estos efectos secundarios son generalmente leves y se limitan al primer o segundo día de tratamiento (151-155).

Informes posteriores a la comercialización han notificado efectos adversos raros pero graves en pacientes tratados con oseltamivir (156). Estos eventos incluyen efectos neuropsiquiátricos (delirio, alucinaciones, confusión, comportamiento anormal, convulsiones y encefalitis) y reacciones cutáneas graves (incluyendo necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de Stevens-Johnson y eritema multiforme).

Zanamivir:

- Generalmente no se recomienda la administración de zanamivir inhalado (polvo seco) en pacientes con enfermedades respiratorias como asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (149).
- No está recomendado el uso del polvo de inhalación en nebulizadores o ventiladores mecánicos ya que la lactosa pueden obstruir los tubos respiratorios (157)
- Pueden producirse episodios vasovagales poco después de la inhalación de zanamivir.
- Debe evitarse en pacientes con alergia a proteínas de leche, debido a la presencia de lactosa.

Eficacia del tratamiento:

Se sabe que el inicio inmediato de la terapia antiviral puede acortar la duración de los síntomas del cuadro gripal de uno a tres días, el beneficio es mayor cuando se administra en las primeras 24 a 30 horas y especialmente en pacientes que se presentan con fiebre (158-160). Poco o ningún beneficio se ha demostrado cuando el tratamiento se inicia a partir de las 48 horas después de la aparición de los síntomas de una gripe no complicada (158).

En cuanto a la excreción viral, algunos estudios sugieren que la duración de ésta disminuye en los pacientes tratados, sin embargo, los estudios que aportan datos

sobre la duración de la replicación viral son inconsistentes (153, 161-163). Las relaciones temporales y causales entre los cambios en la excreción viral y los resultados clínicos no han sido bien establecidos.

Los datos sobre la eficacia de zanamivir y oseltamivir en el tratamiento y la prevención de complicaciones graves relacionadas con la gripe son limitados. En un metanálisis de 10 ensayos clínicos, el riesgo de neumonía entre los pacientes con gripe confirmada tratados con oseltamivir fue de aproximadamente un 50% menor que entre los pacientes que recibieron un placebo, y un 34% inferior en los pacientes con riesgo de complicaciones ($p < 0,05$ para ambas comparaciones) (164).

En cuanto a las complicaciones relacionadas con exacerbación de las enfermedades de base, en un estudio aleatorizado y controlado realizado en niños con asma, se encontró una mayor mejoría de la función pulmonar y menos exacerbaciones de asma entre los niños tratados con oseltamivir en comparación con los niños que recibieron placebo (165).

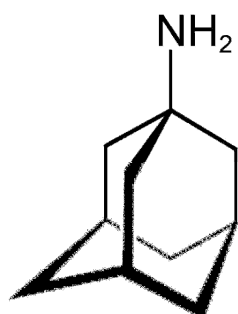
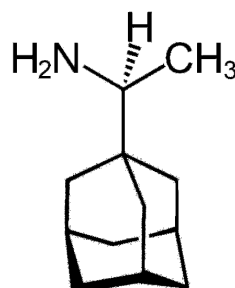
Varios estudios observacionales han demostrado que oseltamivir tiene un efecto positivo en la morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados (166, 167). Un estudio prospectivo observacional evaluó los resultados clínicos de 327 adultos hospitalizados con gripe confirmada por laboratorio. La edad media de los adultos fue de 77 años, y el 71% inició tratamiento más allá de las 48 horas después del inicio de la enfermedad. El análisis multivariable demostró que el tratamiento con oseltamivir se asoció con un riesgo significativamente menor de muerte dentro de los primeros 15 días de hospitalización. El beneficio se observó incluso entre los pacientes que iniciaron tratamiento pasadas las 48 horas después de la aparición de los síntomas. Sin embargo, el tratamiento con oseltamivir no redujo ni la duración de la hospitalización ni la mortalidad a los 30 días (164).

Hasta el momento, varios estudios observacionales sugieren que el tratamiento con inhibidores de la neuraminidasa se asocia con enfermedad menos grave, y tiene un beneficio de supervivencia en pacientes hospitalizados con infección por el virus A (H1N1)v (96, 168, 169). Sin embargo, no hay suficientes datos adicionales sobre el impacto del tratamiento antiviral en las complicaciones graves asociadas a la gripe pandémica.

Estudios clínicos en humanos han indicado que zanamivir y oseltamivir tienen actividad contra el virus de la gripe tipo B (148, 153, 170). Sin embargo, un estudio observacional realizado en Japón en niños con gripe confirmada y tratada con oseltamivir demostró que los niños con infección por gripe A presentaron una resolución más rápida de la fiebre y una menor duración de la excreción viral que los niños infectados por virus del tipo B, lo que sugiere que el oseltamivir podría ser menos eficaz para el tratamiento de la gripe B (145).

1.6.2 Adamantanos:

Amantadina (A) y rimantadina (B) pertenecen a la clase de antivirales conocidos como adamantanos.

**A****B**

Mecanismo de acción:

Actúan a nivel de la proteína M2 inhibiendo la replicación viral en las fases tempranas, durante la decapsidación. Estos fármacos son activos frente al virus de la gripe de tipo A, pero no frente al tipo B.

Farmacocinética:

La amantadina se excreta principalmente inalterada en la orina. En pacientes con un aclaramiento de creatinina inferior a 50 ml/min, la dosis diaria habitual para adultos (100mg/12h) debe reducirse a 100 mg/24h. Una reducción similar se recomienda para los pacientes mayores de 65 años.

La rimantadina se metaboliza extensamente en el hígado, conociéndose tres metabolitos hidroxilados (171). Se recomienda reducir la dosis de 100 mg dos veces al día a 100 mg al día en pacientes con disfunción hepática severa, insuficiencia renal (aclaramiento de creatinina <10 ml/min), y pacientes de edad avanzada.

Efectos adversos:

Tanto la amantadina como la rimantadina son generalmente bien tolerados, especialmente en jóvenes y adultos sanos. Sin embargo, están bien descritos los efectos adversos a nivel del sistema nervioso central (SNC) con amantadina que incluyen; ansiedad, insomnio, dificultad para pensar, confusión, mareos y alucinaciones. Estos efectos parecen estar relacionados con la concentración pico del fármaco (172) y son más comunes en pacientes de edad avanzada. Efectos adversos similares a nivel del SNC se han descrito con rimantadina (173)

Tanto la amantadina como rimantadina puede estar asociados con una mayor tasa de ataques epilépticos en pacientes con esta patología, por lo que se debe utilizar con precaución en tales individuos. La amantadina tiene efectos anticolinérgicos que

pueden causar sequedad de boca y midriasis, y como resultado, está contraindicado en pacientes con glaucoma de ángulo cerrado sin tratamiento.

Eficacia del tratamiento:

En los últimos años, la resistencia a los adamantanos se ha extendido entre las cepas del virus A (H3N2) lo que ha hecho que sean menos útiles en la práctica clínica. Además, las cepas circulantes del virus A (H1N1)v de 2009 son resistentes a los adamantanos (174). Por todo esto, la amantadina y la rimantadina no se recomiendan para el tratamiento antiviral o quimioprofilaxis de las cepas de los virus de la gripe circulantes en la actualidad.

1.6.3 Resistencia a antivirales:

Resistencias a los inhibidores de la neuroaminidasa:

Resistencia a oseltamivir:

Influenza A:

Se conocen varios mecanismos de resistencia a los inhibidores de la neuroaminidasa (175, 176):

Mutación H274Y: Es la mutación responsable de la resistencia a oseltamivir que surgió en las cepas del virus de la gripe estacional H1N1 en 2007. Es una sustitución de una histidina por una tirosina en el aminoácido 274 (H274Y) de la NA, esta mutación se denomina a veces "H275Y" dependiendo de la NA que se utilice como referencia (177). Esta mutación reduce la sensibilidad del virus A H1N1 a oseltamivir más de 400 veces, pero no causa resistencia a zanamivir in vitro (134, 178). También se ha detectado esta mutación en cepas de virus A (H1N1)v pandémico resistentes a oseltamivir (179).

Mutación S247N: es una nueva mutación en el residuo 247 del gen de la NA (S247N) que confiere baja o moderada resistencia a oseltamivir y zanamivir. Se ha detectado en la región de Asia desde diciembre de 2010 en cepas del virus A (H1N1)v pero también en virus estacionales H1N1 y en la gripe aviar H5N1 (180).

Otras mutaciones: Estudios in vitro han demostrado que la presión del antiviral puede promover el desarrollo de resistencia a los inhibidores de la neuraminidasa. Subcultivos del virus en medios con zanamivir han evidenciado la presencia de mutaciones consistentes en cambios de ácido glutámico por glicina en el aminoácido 119 de gripe A y 117 de la B, el efecto resultante es una disminución de afinidad del antiviral y reducción de la estabilidad del enzima (181-183).

Epidemiología - Antes de 2007, la resistencia a oseltamivir era poco frecuente, solo se describía en un 5% de los casos en diferentes ensayos clínicos (144, 184). Sin embargo, a finales de 2007, hubo un aumento de cepas resistentes en Europa (185). Durante la temporada 2007-2008, la prevalencia media de resistencia a oseltamivir en las cepas de gripe A H1N1 estacional de Europa fue del 20%, siendo la tasa más alta del 67%, en Noruega (186, 187). Ninguno de los pacientes incluidos en los informes iniciales de resistencia a oseltamivir había estado en tratamiento con dicho antiviral, lo que sugiere que la adquisición de la resistencia era por transmisión del virus persona a persona (185).

Entre octubre de 2008 y enero de 2009, 185 de 190 (97%) virus A H1N1 aislados en EE.UU eran resistentes a oseltamivir (188) Todos los aislamientos fueron sensibles a zanamivir, amantadina y la rimantadina. Además de en EE.UU, se observaron tasas altas de resistencia a oseltamivir del virus A H1N1 en muchas otras regiones como África del Sur (100%), Australia (93%) y Filipinas (91%) durante la temporada 2008-2009 (189).

Con la aparición del virus pandémico (H1N1)v, la cepa pandémica, predominantemente susceptible a oseltamivir, sustituyó a la cepa estacional H1N1 resistente a oseltamivir, aunque, como hemos dicho anteriormente, a partir de 2010 surgieron algunas cepas de la variante pandémica A (H1N1)v con una mutación en el residuo 247 del gen de la neuraminidasa (S247N) (180).

Desde julio de 2011, los CDC han reportado casos de una nueva variante H3N2 (H3N2v) que se ha originado como consecuencia de la reordenación genética de los virus de los virus de origen porcino H3N2 y H1N1. Esta nueva variante H3N2v es sensible a oseltamivir y a zanamivir, pero resistente a los adamantanos (39).

Las mutaciones de resistencia de los virus de la gripe a oseltamivir y/o zanamivir parecen emerger con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos (190). El riesgo de aparición de resistencia en esta subpoblación de pacientes puede resultar en la diseminación viral prolongada a pesar de la terapia antiviral (191)

En cuanto a la gravedad de la enfermedad, durante la temporada 2007 -2008, la severidad de las infecciones por cepas de gripe A H1N1 resistentes a oseltamivir fue similar a las producidas por cepas sensibles (192). Sin embargo, los datos que comparan las manifestaciones clínicas de las infecciones con cepas resistentes y sensibles de virus son limitados.

Influenza B:

La mayoría de los casos de resistencia a oseltamivir se han producido en virus de la gripe tipo A, la resistencia a oseltamivir raramente se ha observado entre los virus de tipo B. Las mutaciones de la NA que pueden causar resistencia a oseltamivir en los virus gripales de tipo B son: D198N, G402S, y otras.

1.6.4 Terapia antiviral:

Indicaciones del tratamiento:

Como se ha mencionado anteriormente, tanto el inicio temprano del tratamiento antiviral (primeras 48 horas desde el inicio de la enfermedad) como el tratamiento administrado en los primeros 5 días después de la aparición de los síntomas, se asocia con una reducción de la morbilidad y la mortalidad, observándose un mayor beneficio cuanto más temprano sea el inicio del tratamiento (77, 96, 193). Además, el tratamiento antiviral precoz puede reducir el riesgo de complicaciones (por ejemplo, neumonía, insuficiencia respiratoria e incluso muerte).

El tratamiento antiviral se recomienda tan pronto como sea posible en cualquier paciente con confirmación o sospecha de gripe que este hospitalizado, tenga una enfermedad grave, complicada o progresiva, o este en mayor riesgo de sufrir complicaciones (Tabla 2). Entre los pacientes ambulatorios, el tratamiento antiviral con un inhibidor de la neuraminidasa se recomienda en todos aquellos pacientes con gripe probable o confirmada que estén en mayor riesgo de sufrir complicaciones debido a su edad o condiciones médicas subyacentes (Tabla 2.).

Los pacientes con infecciones leves, sin complicaciones que no tienen factores de riesgo de enfermedad grave o complicada no son susceptibles de beneficiarse de la terapia antiviral.

Tabla 2: Recomendaciones del tratamiento antiviral

• El tratamiento antiviral se recomienda tan pronto como sea posible en pacientes con confirmación o sospecha de gripe que:

- Se encuentre hospitalizado

- Tenga una enfermedad grave, complicada o progresiva

- Este en mayor riesgo de sufrir complicaciones.

• Las personas con mayor riesgo de complicaciones son:

- niños <2 años*

- adultos \geq 65 años

- Pacientes con enfermedades pulmonares crónicas (incluyendo asma), cardiovasculares (excepto hipertensión solo), renal, hepática, hematológica, enfermedades metabólicas (incluyendo diabetes mellitus), o neurológicas.

- Inmunodeprimidos

- Las mujeres que están embarazadas o en el postparto (dentro de 2 semanas después del parto).

- obesidad mórbida (es decir, índice de masa corporal \geq 40)

- residentes de hogares de ancianos y otros centros de cuidados crónico.

• Cuando esté indicado, el tratamiento antiviral debe iniciarse tan pronto como sea posible después del inicio de la enfermedad.

• El mayor beneficio ocurre dentro de las primeras 48 horas desde la aparición de la enfermedad. Sin embargo, el tratamiento antiviral todavía puede ser beneficioso en pacientes con enfermedad grave, complicada o progresiva y en pacientes hospitalizados aunque se administra por >48 horas desde el inicio de la enfermedad.

• El tratamiento antiviral también puede ser considerado en pacientes ambulatorios previamente sanos, sintomáticos, en base al criterio clínico.

*Aunque todos los niños <5 años se consideran en mayor riesgo de complicaciones, el mayor riesgo es para los de <2 años, con mayores tasas de hospitalización y mortalidad entre los lactantes de <6 meses. Debido a que muchos niños con enfermedad respiratoria febril leve pueden tener otras infecciones virales, el conocimiento de otros virus respiratorios, así como las cepas del virus de influenza que circulan en la comunidad es importante para la toma de decisiones.

Elección del antiviral:

Es importante evaluar el riesgo de que el paciente esté infectado por una cepa resistente a oseltamivir antes de elegir la terapia. Los médicos deben revisar los datos de gripe locales o estatales de vigilancia semanales para determinar qué tipos de influenza (A o B) y subtipos de influenza A (H1N1 o H3N2) están circulando (194). Las indicaciones del tratamiento antiviral para pacientes con infección por la nueva variante H3N2v son las mismas que para los pacientes con infección por gripe estacional.

Como se indica en la tabla 3, en los pacientes con sospecha de gripe en los que está indicado el tratamiento, se recomienda el tratamiento con un inhibidor de la neuraminidasa (oseltamivir o zanamivir), siempre que no se sospeche resistencia a este grupo de antivirales (tabla 3) (194).

Tabla 3: Dosis diaria recomendada de antivirales para el tratamiento y profilaxis de la gripe en adultos

Antiviral	Dosis
Zanamivir	
Tratamiento gripe A y B	10 mg (2 inhalaciones)/12 horas durante 5 días
Quimioprofilaxis gripe A y B	10 mg (2 inhalaciones)/24 horas Δ
Oseltamivir	
Tratamiento gripe A y B	75 mg/12h durante 5 días \diamond
Quimioprofilaxis gripe A y B	75 mg/24h $\Delta\diamond$

Δ Duración de la profilaxis depende de varios factores. (Ver "La prevención de la gripe estacional en adultos").

\diamond Está recomendado reducir la dosis de oseltamivir en pacientes con aclaramiento de creatinina <30 ml/min.

Dosis:

La dosis usual de oseltamivir para el tratamiento de la gripe es de 75 mg por vía oral dos veces al día y la de zanamivir es de 10 mg (2 inhalaciones) dos veces al día (Tabla 3). Oseltamivir se excreta principalmente por vía renal por lo que la dosis debe ser modificada en caso de insuficiencia renal.

En algunos pacientes gravemente enfermos por gripe aviar H5N1 o gripe pandémica H1N1, la duplicación de la dosis de oseltamivir a 150 mg por vía oral dos veces al día ha sugerido ser de utilidad (195).

La formulación intravenosa de zanamivir está disponible para ser utilizada en estados de emergencia mediante solicitud expresa a la Administración de Alimentos y Drogas (FDA). Esta formulación fue el tratamiento antiviral recomendado para pacientes críticos con alto grado de sospecha o confirmación de infección por una cepa de gripe A H1N1 de 2009 resistente a oseltamivir (194). También es el tratamiento más adecuado para pacientes infectados con cepas no pandémicas de gripe A (H1N1)v resistentes a oseltamivir que requieren tratamiento, pero no puede tolerar zanamivir inhalado.

Embarazo: La gripe causa enfermedad más grave y una mayor tasa de mortalidad entre las mujeres embarazadas (196). Oseltamivir y zanamivir son medicamentos de categoría C en el embarazo, por lo que no hay ensayos clínicos que evalúen la seguridad de su uso durante el mismo (197).

Las mujeres embarazadas que cumplen la definición de caso confirmado, probable o sospechoso de gripe deben recibir tratamiento antiviral con oseltamivir, ya que el potencial beneficio supera el riesgo teórico para el feto (198). Oseltamivir se prefiere frente a zanamivir porque sólo el profármaco se absorbe sistémicamente.

Además de la terapia antiviral, el control de la fiebre con terapia antipirética es importante ya que la hipertermia durante el primer trimestre se ha asociado con defectos del tubo neural y otros defectos de nacimiento (199, 200). Además, la fiebre durante el parto es un factor de riesgo para las convulsiones neonatales, encefalopatía, parálisis cerebral, y la muerte neonatal (199).

Los pacientes en tratamiento con antivirales que no respondan al tratamiento podrían tener una infección con un virus resistente a antivirales.

Duración:

La duración recomendada de la terapia antiviral es de cinco días (194). Sin embargo, se puede considerar una mayor duración de la terapia en pacientes gravemente enfermos o personas inmunodeprimidas.

1.7. Profilaxis:

La gripe es una enfermedad viral infecciosa que se puede prevenir. La inmunización anual es la medida preventiva más importante (201), y se recomienda para todas las personas mayores de seis meses de edad en los EE.UU (202). Los fármacos antivirales también están disponibles como medida preventiva (quimioprofilaxis) y tienen un papel importante adyuvante para pacientes que no han sido vacunados o que no pueden desarrollar inmunidad de la vacuna.

1.7.1. Quimioprofilaxis

Quimioprofilaxis pre-exposición:

Debe administrarse quimioprofilaxis pre-exposición durante brotes generalizados cuando no se dispone de vacuna (como ocurrió durante gran parte de la pandemia H1N1 de 2009). La quimioprofilaxis pre-exposición debe administrarse durante el tiempo en el que la exposición podría ocurrir. Sin embargo, no se conocen los efectos adversos asociados a la administración de estos fármacos a largo plazo y se sabe que el uso prolongado de los antivirales puede dar lugar a la selección de cepas resistentes. Por lo tanto, la quimioprofilaxis pre-exposición debe utilizarse solamente en pacientes que tienen un riesgo muy alto de sufrir complicaciones relacionadas con la gripe que no pueden ser protegidos por otros medios y tienen un alto riesgo de exposición.

En diferentes estudios realizados en adultos sanos que recibieron antivirales como medida profiláctica durante el periodo de actividad gripal, oseltamivir y zanamivir mostraron una eficacia similar en la prevención de la gripe (155, 203). Los estudios también han demostrado la eficacia de estos antivirales en la prevención de la gripe en pacientes institucionalizados (204-206).

Quimioprofilaxis post-exposición:

Se debe administrar profilaxis post-exposición a los individuos que hayan tenido contacto cercano con un caso de gripe confirmado o sospechoso durante el periodo infeccioso (un día antes de la aparición de los síntomas hasta 24 horas después) y que se encuentran en alto riesgo de sufrir complicaciones (202).

El tratamiento temprano es una alternativa a la quimioprofilaxis en el manejo de ciertas personas que han tenido exposición al virus de la gripe (196). Las personas con factores de riesgo para complicaciones que hayan tenido contacto estrecho con casos confirmados o sospechosos y personal de salud que sufra una exposición ocupacional son candidatos a recibir tratamiento temprano ante la presencia de los primeros signos y síntomas de la gripe.

La profilaxis post-exposición debe utilizarse sólo cuando los antivirales pueden ser iniciados dentro de las 48 horas de la exposición más reciente (202). Las personas que no tienen factores de riesgo y que no son contactos cercanos de personas con alto riesgo de complicaciones, no requieren profilaxis post-exposición.

Elección del antiviral:

Oseltamivir y zanamivir son los antivirales recomendados para la profilaxis de la gripe. Es importante evaluar el riesgo de que el paciente este infectado por una cepa resistente a oseltamivir antes de elegir un medicamento antiviral para la profilaxis de la

gripe. En condiciones normales, se recomienda oseltamivir (75 mg una vez al día) (194). Zanamivir se debe utilizar cuando se sospeche resistencia a oseltamivir (2 inhalaciones una vez al día).

Duración:

La duración habitual de la quimioprofilaxis varía de acuerdo con las siguientes indicaciones:

- Durante brotes en residencias de ancianos la profilaxis debe continuar durante al menos dos semanas, o 10 días después de la aparición de síntomas en el último paciente afectado.
- En personas no vacunadas que tienen indicación de profilaxis post-exposición (ver tabla de pacientes con alto riesgo de sufrir complicaciones) debe administrarse la vacuna (207) y profilaxis antiviral durante 10 días (194).
- Durante los brotes en la comunidad, la profilaxis pre-exposición en personas no vacunadas que tienen una indicación para profilaxis, se puede administrar durante todo el período de máxima actividad de gripe (generalmente de seis a ocho semanas) (155, 207, 208).

1.7.2. Vacunación

Vacunación de la gripe estacional:

Actividad gripal: Los CDC, en colaboración con la OMS tienen una red de información sobre los virus de la gripe aislados en todo el mundo para controlar la actividad de la enfermedad y predecir los componentes adecuados para la vacuna anual de la gripe. Esta información, que se actualiza cada semana durante la temporada de gripe, está disponible a través del sitio web de los CDC (www.cdc.gov/flu/semanal).

Diseño de la vacuna: como ya se ha mencionado en secciones anteriores, el virus de la gripe se caracteriza por su elevada capacidad de mutación (209). Como consecuencia de ello, las vacunas se diseñan nuevamente cada año para que incluyan los virus mutados circulantes en ese momento (201). La decisión de qué antígenos se deben incluir en la vacuna se realiza antes de cada temporada y se basa en la vigilancia mundial de los virus así como en la aparición y propagación de nuevas cepas.

La estrategia de vacunación actual es vulnerable a la aparición de cepas epidémicas o una pandemia que no están representados en la vacuna actual. En este momento, las investigaciones en curso se centran en el desarrollo de una vacuna universal que induciría la producción de anticuerpos protectores dirigidos contra las proteínas virales conservadas.

La OMS recomienda que la vacuna para su uso durante la temporada de gripe 2012 en el hemisferio sur (mayo a octubre) contenga los siguientes componentes (210).

- A/California/7/2009 (H1N1)-like virus (frente a la gripe pandémica H1N1 de 2009)
- A/Perth/16/2009 (H3N2)-like virus
- B/Brisbane/60/2008-like

La OMS recomienda que las vacunas contra la gripe para su uso durante la temporada de influenza 2012-2013 en el hemisferio norte (noviembre a abril) contengan los siguientes componentes (211):

- A/California/7/2009 (H1N1)-like virus (frente a la gripe pandémica H1N1 de 2009)
- A/Victoria/361/2011 (H3N2)-like virus

- B/Wisconsin/1/2010-like

Aunque el virus de la gripe A H1N1 es el mismo, el virus H3N2 y el virus de B son diferentes de los que se seleccionaron para el hemisferio norte de la vacuna de la temporada 2011-2012.

La vacuna contra la gripe estacional no se espera que proporcione protección frente a la variable H3N2 que empezó a propagarse en Julio de 2011 y de la que hemos hablado en secciones anteriores.

En febrero de 2012, la FDA aprobó una formulación tetravalente de la vacuna antigripal viva atenuada, que contiene dos cepas de virus A y dos cepas de virus B (212). Se espera que esté disponible para la temporada de gripe 2013-2014.

2. CARENCIAS DE LA LITERATURA

1. La pandemia de gripe causada por el virus A (H1N1)v creó la necesidad de incorporar métodos de detección viral rápidos y sensibles. En el contexto de la pandemia, el CDC desarrollo una RT-PCR que fue aceptada como método de referencia. Sin embargo, esta técnica no estaba disponible ni era abordable por muchos laboratorios de microbiología que venían realizando hasta el momento técnicas convencionales como el cultivo viral y la detección de antígenos. Al tratarse de un nuevo virus, no existían en la literatura estudios que compararan la RT-PCR con el cultivo convencional y el cultivo rápido en SV. Del mismo modo, no existían datos sobre la línea celular más adecuada para el aislamiento de este nuevo virus.
2. La persistencia de la excreción viral y la dinámica de la carga viral del virus de la gripe han sido poco estudiados en pacientes hospitalizados con gripe estacional o pandémica. La mayoría de los estudios están encaminados a evaluar el impacto de la terapia antiviral pero hay pocos datos sobre el significado de la excreción viral prolongada y la carga viral como marcadores de mal pronóstico.
3. La gripe es una causa común de ingreso en unidades de cuidados intensivos (UCIs). Sin embargo, la frecuencia de este hecho puede estar subestimada, particularmente en pacientes con manifestaciones clínicas que pueden ser atribuidas a otro agente infeccioso o a causas no infecciosas. Además, la sospecha de infección por virus de la gripe puede ser particularmente difícil en pacientes ya ingresados en UCI que presentan una función respiratoria deteriorada. Actualmente, la información sobre gripe adquirida durante el ingreso en UCI es escasa e incompleta.
4. La muestra de elección para el diagnóstico de la gripe en pacientes no intubados es el aspirado o exudado nasofaríngeo. En pacientes ingresados en UCI están además disponibles muestras del tracto respiratorio inferior que

podrían ser de utilidad para el diagnóstico de la gripe. Sin embargo, el rendimiento de este tipo de muestras para la detección de virus de la gripe no ha sido evaluado de forma adecuada hasta el momento.

3. OBJETIVOS

Objetivo-Estudio 1:

Comparar la RT-PCR diseñada por el CDC, el cultivo en SV y el cultivo convencional para la detección del virus de la gripe A (H1N1)v.

Evaluar el rendimiento de dos líneas celulares; Marby-Darby canine kidney (MDCK) y una línea continua de carcinoma de pulmón (A549) para el cultivo del virus pandémico tanto en cultivo convencional como en SV.

Objetivo-Estudio 2:

Estudiar la dinámica de la carga viral y la frecuencia de excreción viral prolongada en pacientes hospitalizados con gripe pandémica y evaluar su papel como marcadores de mal pronóstico en esta población.

Objetivo-Estudio 3:

Evaluar la utilidad clínica de buscar sistemáticamente gripe en aspirados traqueales de pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos durante la temporada post-pandémica 2010-2011.

Objetivo-Estudio 4:

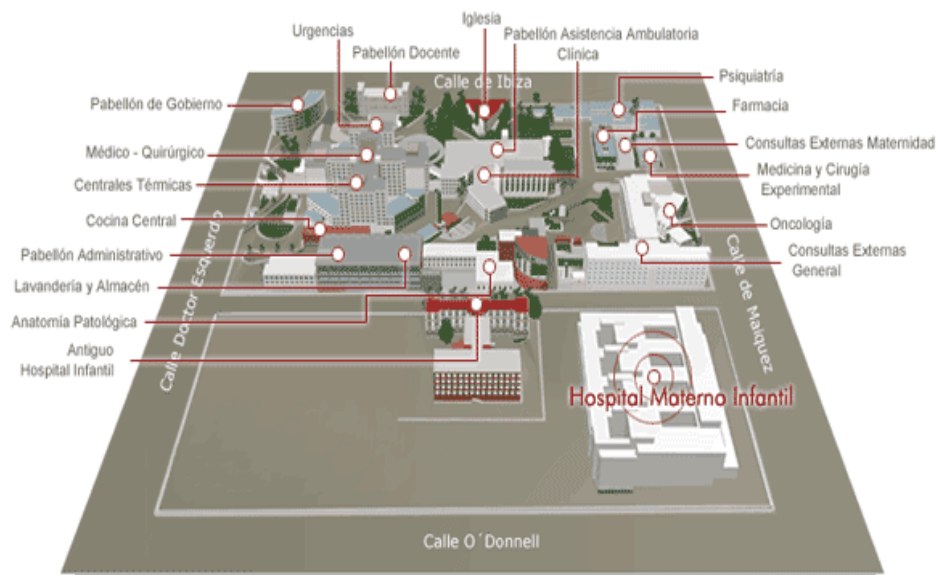
Comparar el rendimiento del exudado nasofaríngeo con el del aspirado traqueal para la detección de gripe mediante RT-PCR en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos.

Cada objetivo está diseñado como un estudio independiente y por lo tanto cada uno de ellos presenta una estructura propia con 3 apartados bien diferenciados: material y métodos, resultados y discusión.

Marco de realización de los estudios

Los cuatro estudios que constituyen esta tesis han sido realizados en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), un hospital terciario con 1.500 camas, que atiende a una población rural y urbana de 715.000 habitantes en la provincia de Madrid

Figura 6: Mapa del Hospital General Universitario Gregorio Marañón



El servicio de Microbiología, está dotado de una sección de virología que está ubicada en un edificio anexo junto con las secciones de serología y diagnóstico molecular. Es una sección dirigida a la detección de virus en diferentes muestras clínicas que cuenta con el siguiente arsenal diagnóstico:

- Cultivo celular convencional.
- Cultivo celular rápido o *Shell-vial*.

- Tests rápidos de inmunocromatografía para detección de antígenos de virus respiratorios en muestra clínica directa (VRS e influenza A/B)
- Inmunofluorescencia directa para la detección virus herpes simple y virus varicela zoster.
- Antigenemia pp65 para la detección citomegalovirus en sangre periférica.
- PCR cuantitativa a tiempo real para la detección citomegalovirus y Ebstein-Bar en plasma.

El esquema diagnóstico utilizado hasta junio de 2009 a partir de una muestra del tracto respiratorio está representado en la tabla 4.

Tabla 4: Esquema diagnóstico para la detección de virus respiratorios a partir de una muestra clínica

Día 0	Día +1	Día +2
<ul style="list-style-type: none"> - Test rápido en muestra directa según petición. - SV de screening de en A549. - Dos tubos para cultivo convencional (A549 y MRC5). 	<ul style="list-style-type: none"> - Lectura del SV de screening. <p>Naranja: VRS (informar)</p> <p>Verde: parainfluenza, influenza o adenovirus*</p> <p>*Hacer un 2º SV para la detección de estos virus (según época del año)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Lectura del 2º SV

En España, como ya se ha comentado anteriormente, la circulación autóctona del virus pandémico (H1N1)v se detectó en la semana 21/2009 (del 24 al 30 de mayo).

En los primeros días, en que no existía un método de diagnóstico molecular específico de la gripe A (H1N1)v, en nuestro hospital se procesaban las muestras como se ha descrito anteriormente de manera que solo se podía detectar el virus de la gripe a nivel de tipo.

El 2 de Junio de 2009 se puso en marcha la RT-PCR recomendada por el CDC. Las peticiones se registraron en una base de datos donde se recogían las siguientes variables: número de registro, fecha de petición, servicio peticionario, tipo de muestra, técnica diagnóstica utilizada y virus detectado en el caso de positividad de cualquiera de las técnicas.

Durante el brote pandémico (junio-diciembre de 2009), en la sección de virología se analizaron 2.329 muestras respiratorias. De estas 2.329 muestras, se realizó RT-PCR para la detección de gripe A (H1N1)v en 1.524 muestras.

La principal muestra clínica enviada para la detección de gripe A (H1N1)v fue el exudado-nasofaríngeo, seguido del aspirado traqueal y del lavado nasofaríngeo. La distribución por tipo de muestra respiratoria está representada en la figura 1. La muestra más solicitada corresponde con la muestra de elección recomendada por el CDC para la realización de la RT-PCR y que el servicio de microbiología recomendó a los diferentes servicios médicos del hospital mediante circulares informativas en las que se ilustraba en modo de hacer la toma de la muestra, la conservación y el transporte de la misma al laboratorio de microbiología.

De las 2.329 muestras analizadas, en 754 se detectaron virus respiratorios y 1.575 fueron negativas. Los virus respiratorios detectados están representados en la figura 2. Se detectaron 33 virus Influenza A (no tipados), 420 virus Influenza A

(H1N1)v, 267 virus respiratorios sincitiales, 27 virus parainfluenza y en 7 muestras se detectaron 2 virus respiratorios; 4 infecciones mixtas de (H1N1)v y parainfluenza, 1 influenza A y parainfluenza, 1 influenza A y virus respiratorio sincitial, y un parainfluenza y virus respiratorio sincitial.

Figura 1: Distribución por tipo de muestra solicitada.

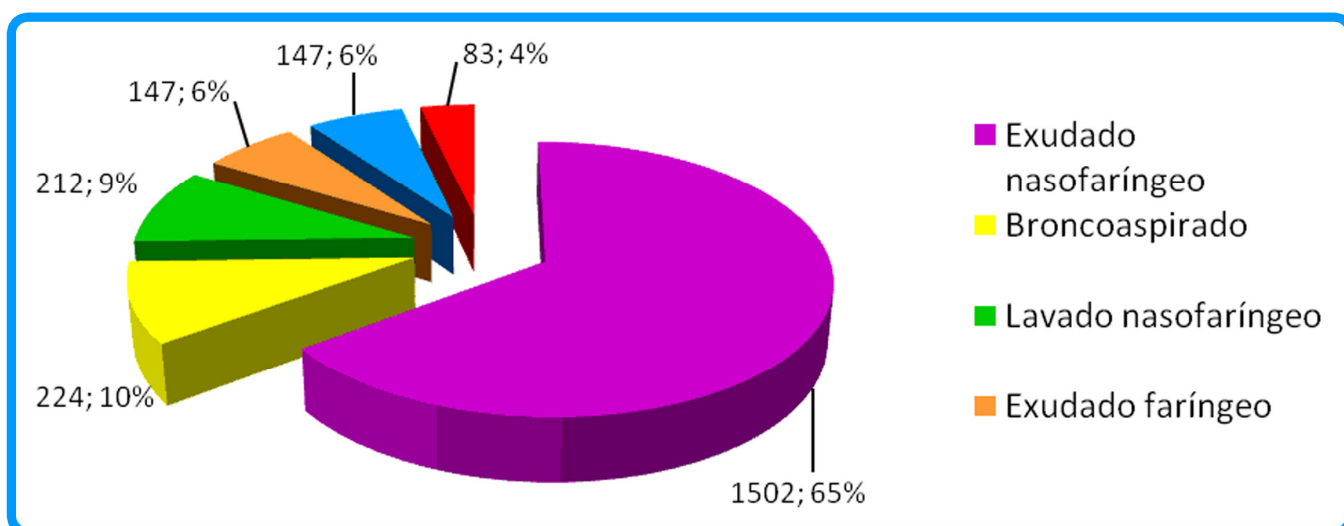
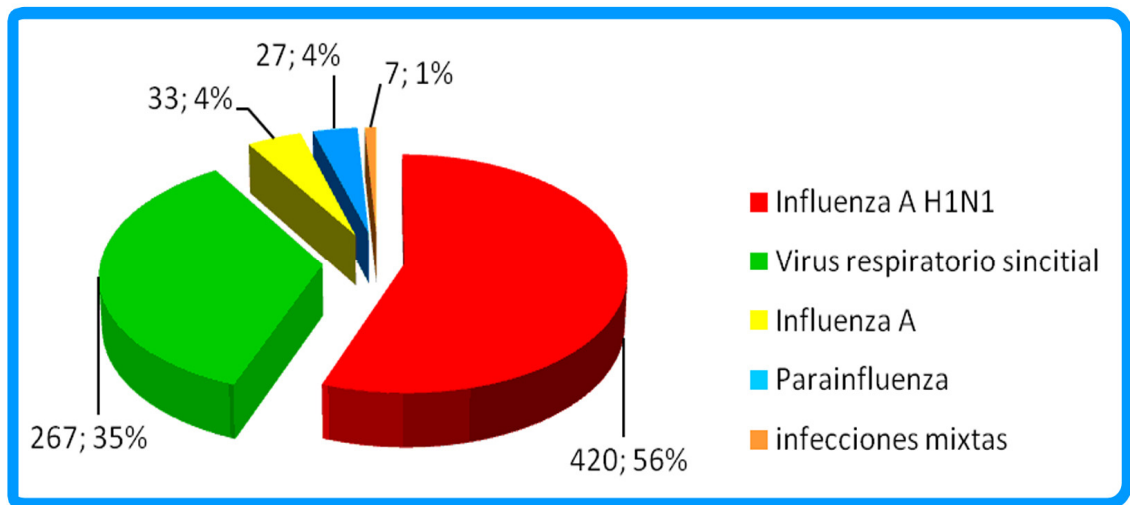
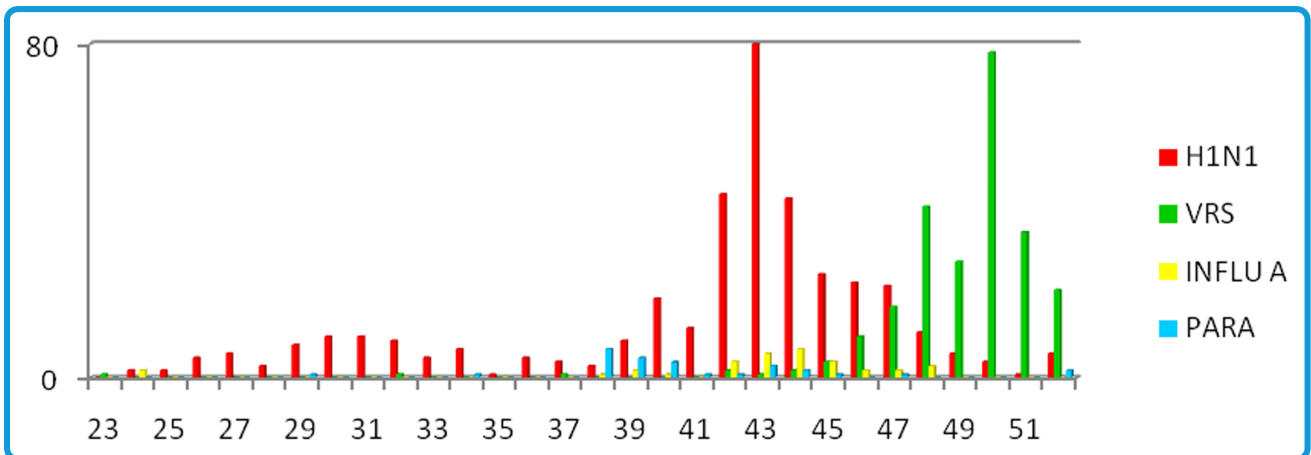


Figura 2: Distribución de los virus respiratorios detectados en muestras respiratorias.

La distribución de los diferentes virus respiratorios a lo largo del tiempo, expresado como semanas epidemiológicas, está representada en la gráfica 1. En esta gráfica puede observarse que el pico de máxima detección del virus pandémico A (H1N1)v tuvo lugar durante la semana 43, empezando a disminuir su detección en la semana 45. Además, se observó un desplazamiento en el tiempo de la detección del VRS respecto a temporadas anteriores.

Grafica 1: La distribución de los diferentes virus respiratorios detectados lo largo del tiempo.



NOTA: VRS (virus respiratorio sincitial), INFLU A (virus influenza A no tipado), PARA (virus parainfluenza)

Además del trabajo realizado en el servicio de microbiología como respuesta a las necesidades diagnósticas que se plantearon durante la pandemia, en la institución se creó un Grupo multidisciplinar de Apoyo al Manejo de la Gripe (GRAMGRI). Este grupo estaba constituido por representantes de todos servicios médicos y quirúrgicos del hospital así como de los servicios de medicina preventiva, farmacia, y salud laboral.

Los objetivos de este grupo de apoyo eran:

- Unificar criterios relativos al diagnóstico para la confirmación de casos
- Apoyar el manejo de pacientes hospitalizados
- Mejorar y agilizar el diagnóstico microbiológico

- Establecer las medidas de prevención a tomar con pacientes con gripe
- Difundir información relativa a la pandemia y dar recomendaciones a los trabajadores
- Mantener registros de la pandemia

En el marco de trabajo que se ha descrito, y respondiendo tanto a las necesidades clínicas que planteaba la pandemia como a las preguntas científicas que fueron surgiendo, se realizaron los cuatro estudios que constituyen esta tesis.

Los dos primeros estudios (estudios 1 y 2) se realizaron con el objetivo general de optimizar el diagnóstico microbiológico de la gripe en pacientes hospitalizados durante la pandemia. Los otros dos estudios (estudios 3 y 4), aunque se plantearon en base a observaciones realizadas durante la pandemia de 2009, se realizaron durante la temporada de gripe post-pandemia (2010-2011) para responder a algunas cuestiones científicas que quedaban sin resolver.

4. ESTUDIO 1:

COMPARACIÓN DE LA RT-PCR CON EL SV Y EL CULTIVO CONVENCIONAL EN LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE A (H1N1)v

4.1 Material y métodos:

Entre los meses de Octubre y Diciembre de 2009 realizamos un estudio prospectivo comparativo de 5 técnicas diagnósticas (RT-PCR, SV-A549, SV-MDCK, tubo-A549, tubo-MDCK) para la detección del virus de la gripe A (H1N1)v a partir de exudados nasofaríngeos de pacientes adultos con sospecha clínica de gripe, utilizando como estándar de oro la detección del virus por una o más de las 5 técnicas.

Preparación de las muestras: los exudados nasofaríngeos para la detección de gripe se recogieron como se muestra en la Figura 1. Después de su recogida, los exudados nasofaríngeos se inocularon en un vial con medio de transporte para virus (Copán Innovación, Brescia, Italia.) y fueron transportados inmediatamente al laboratorio. Las muestras que se podían analizar dentro de las primeras 48 horas se conservaron a 4°C, las muestras cuyo análisis se iba a posponer más de ese tiempo se conservaron a -70°C. A todas las muestras se les realizó RT-PCR, SV y cultivo convencional.

Figura 1: toma de muestra del exudado nasofaríngeo para la detección de gripe



Cultivo shell-vial: con el objetivo de comparar las dos líneas celulares cada muestra se inoculó en dos SV, uno que contenía la línea MDCK y otro con A549. El procedimiento del cultivo en SV está representado en la Figura 2. El medio de mantenimiento de los SV se decantó y se inocularon 0,2 ml de la muestra en cada vial. Los viales se centrifugaron a 3500 rpm durante 45 minutos y se incubaron durante 2

horas a 35°C. Después de la incubación se decantó el contenido de los viales y se añadió medio de mantenimiento con 1µg/ml de tripsina. Pasadas 48 horas, los viales se lavaron con PBS y se fijaron con acetona durante 10 minutos. Finalmente se realizó una IFD tiñendo las muestras con anticuerpos monoclonales específicos conjugados con fluoresceína (SimulFluor® FluA/FluB, LIGHT DIAGNOSTIC).

Figura 2: esquema del procedimiento del cultivo viral en SV



Cultivo viral convencional: inoculamos una alícuota de 0,5 ml en cada tubo de cultivo celular, uno con la línea MDCK y otro con la línea A549. Los tubos se incubaron durante 21 días a 35°C y se examinaron cada dos días para observar el posible ECP. Se realizó una IFD con anticuerpos específicos frente a la nucleoproteína del virus

influenza A a los tubos en los que se había observado ECP o al finalizar el periodo de incubación.

RT-PCR:

El ARN viral fue extraído a partir de 200 µl de la muestra, eluido en 60 µl de tampón, en un dispositivo NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Boxtel, Países Bajos) siguiendo las instrucciones del fabricante. El eluido se conservó 4 ° C si se iba a analizar inmediatamente o a -70 ° C si se iba a analizar pasadas 48 horas. En cada proceso de extracción se incorporó una muestra de agua como control negativo. La detección del virus A (H1N1)v se realizó mediante RT-PCR a tiempo real con el protocolo de la OMS/CDC en un termociclador Stratagene MX3000 (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.). En total, se llevaron a cabo, cuatro reacciones de amplificación, tres para detectar el virus influenza tipo A, virus influenza porcino e influenza A (H1N1)v (dirigido a los genes de las proteínas de la matriz, la nucleoproteína, y la hemaglutinina, respectivamente), y una cuarta reacción de amplificación del gen humano "P ribonucleasa" (control interno que se utilizó como un detector de inhibiciones de la amplificación de la muestra). En todas las amplificaciones se añadió el control negativo extraído.

Análisis estadístico: Los valores de validez fueron calculados con un intervalo de confianza del 95% siguiendo una distribución binomial. Los valores de sensibilidad y especificidad fueron comparados usando el test 2-tailed McNemar. El nivel de significación fue corregido con el test de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $P < 0.01$. Los datos fueron analizados con la versión 15.0 del programa SPSS (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

4.2 Resultados:

Durante el periodo de estudio evaluamos un total de 174 muestras pertenecientes a 125 pacientes. Cuatro muestras (2,3%) fueron excluidas debido a toxicidad. Por lo tanto, incluimos en el análisis final 170 muestras.

Detectamos el virus A (H1N1)v por cultivo convencional en 68/170 muestras (40%): 55 en ambas líneas celulares, 9 solo en la línea A549 y 4 solo en MDCK. En 63/170 muestras (37%) detectamos el virus mediante SV (56 en ambas líneas celulares y 7 solo en A549). No se recuperó ningún virus de la gripe tipo B por cultivo viral.

La RT-PCR para la detección de gripe A (H1N1)v fue positiva en 83/179 muestras (48,8%). En la tabla 1 se muestran los resultados discrepantes entre cultivo convencional, SV, y RT-PCR.

Tres muestras resultaron ser RT-PCR negativas pero cultivo convencional positivo. Se realizó RT-PCR a estos tres tubos de cultivo para comprobar que el virus crecido era influenza A (H1N1)v. En los tres casos, la RT-PCR a partir del tubo de cultivo fue positiva.

En la tabla 2 se muestran los valores de validez de cada una de las cinco técnicas evaluadas utilizando como “estándar de oro” el cultivo convencional. Además recalculamos los valores de validez que se obtendrían utilizando un “estándar de oro extendido” en el que un resultado se considera positivo cuando es positiva cualquiera de las 5 técnicas evaluadas. Estos resultados se muestran en la tabla 3.

El tiempo promedio para detectar el virus pandémico A (H1N1)v por RT-PCR, SV y cultivo convencional fue: 4 horas, 48 horas y 7 días respectivamente.

Tabla 1: Resultados discrepantes entre cultivo convencional, SV y RT-PCR.

Resultados	No. de muestras con resultado positivo para gripe A (H1N1)v
Tubo +, SV +, RT-PCR-	0
Tubo+, SV-, RT-PCR-	3
Tubo+, SV-, RT-PCR+	3
Tubo-, SV+, RT-PCR+	1
Tubo-, SV-, RT-PCR+	17
Tubo-, SV+, RT-PCR-	0
Total	24

Tabla 2. Sensibilidad, especificidad, y valores predictivos positivo y negativo de RT-PCR, SV-A549, SV-MDCK, tubo-A549, y tubo-MDCK para la detección de gripe A (H1N1)v usando el cultivo convencional como estándar de oro.

	Sensibilidad, % (95%IC) ^a	Especificidad, % (95%IC) ^b	Valor predictivo positivo, % (95%IC) ^c	Valor predictivo negativo, % (95%IC) ^d
RT-PCR	95,6 (87,6-99,1)	82,3 (73,5-89,2)	78,3 (67,9-86,6)	96,5 (90,2-99,3)
SV-A549	91,2 (81,7-96,7)	99,01 (94,6-99,9)	98,4 (91,5-99,9)	94,4 (88,2-97,9)
SV-MDCK	82,3 (71,2-90,5)	100 (96,4-100)	100 (93,6-100)	89,4 (82,3-94,4)
Tubo-A549	94,1 (85,6-98,4)	100 (96,4-100)	100 (94,4-100)	96,2 (90,6-98,9)
Tubo-MDCK	86,7 (76,3-93,7)	100 (96,4-100)	100 (93,9-100)	91,9 (85,1-96,2)

^a Los valores de P para la comparación de sensibilidades entre técnicas fueron los siguientes: 0,250 (RT-PCR vs SV-A549), 0,004 (RT-PCR vs SV-MDCK), 1 (RT-PCR vs tubo-A549), 0,146 (RT-PCR vs tubo-MDCK), 0,031 (SV-A549 vs SV-MDCK), 0,754 (SV-A549 vs tubo-A549), 0,607 (SV-A549 vs tubo-MDCK), 0,077 (SV-MDCK vs tubo-A549), 0,664 (SV-MDCK vs tubo-MDCK), y 0,267 (tubo-A549 vs tubo MDCK).

^b Los valores de P para la comparación de especificidades entre técnicas fueron los siguientes: 1 (RT-PCR vs SV-A549), 1 (RT-PCR vs SV-MDCK), 1 (RT-PCR vs tubo-A549), 1 (RT-PCR vs tubo-MDCK), 1 (SV-A549 vs SV-MDCK), 1 (SV-A549 vs tubo-A549), 1 (SV-A549 vs tubo-MDCK), 1 (SV-MDCK vs tubo-A549), 1 (SV-MDCK vs tubo-MDCK), y 1 (tubo-A549 vs tubo MDCK).

^c Los valores de P para la comparación de los VPP entre técnicas fueron los siguientes: 0,001 (RT-PCR versus SV-A549), 0,001 (RT-PCR versus SV-MDCK), 0,001 (RT-PCR versus tubo-A549), 0,001 (RT-PCR versus tubo-MDCK), 1 (SV-A549 versus SV-MDCK), 0,496 (SV-A549 versus tubo-A549), 1 (SV-A549 versus tubo-MDCK), 1 (SV-MDCK versus tubo-A549), 1 (SV-MDCK versus tubo-MDCK), y 1 (tubo-A549 versus tubo MDCK).

^d Los valores de P para la comparación de los VPN entre técnicas fueron los siguientes: 0,734 (RT-PCR versus SV-A549), 0,064 (RT-PCR versus SV-MDCK), 1 (RT-PCR versus tubo-A549), 0,234 (RT-PCR versus tubo-MDCK), 0,223 (SV-A549 versus SV-MDCK), 0,748 (SV-A549 versus tubo- A549), 0,595 (SV-A549 versus tubo-MDCK), 0,069 (SV-MDCK versus tubo-A549), 0,648 (SV-MDCK versus tubo-MDCK), y 0,254 (tube-A549 versus tubo MDCK).

Tabla 3. Sensibilidades, especificidades, y valores predictivos positivo y negativo para RT-PCR, SV-A549, SV-MDCK, tubo-A549, y tubo-MDCK para la detección de gripe A (H1N1)v usando un estándar de oro extendido.

	Sensibilidad, % (95%IC) ^a	Valor predictivo negativo, % (95%IC) ^b
RT-PCR	96,5 (90,1-99,3)	96,6 (90,3-99,3)
SV-A549	73,3 (62,6-82,2)	78,5 (69,5-85,9)
SV-MDCK	65,1 (54,1-75,1)	73,7 (64,6-81,5)
Tubo-A549	74,4 (63,9-83,2)	79,2 (70,3-86,5)
Tubo-MDCK	68,6 (57,7-78,2)	75,7 (66,6-83,3)

NOTA: Especificidad y valores predictivos positivos fueron del 100%. Por lo tanto, las diferencias entre estos valores no fueron estadísticamente significativas.

a Los valores de P para la comparación de sensibilidades entre técnicas fueron los siguientes: <0,001 (RT-PCR vs SV-A549), <0,001 (RT-PCR vs SV-MDCK), <0,001 (RT-PCR vs tubo-A549), <0,001 (RT-PCR vs tubo-MDCK), 0,016 (SV-A549 vs SV-MDCK), 1 (SV-A549 vs tubo-A549), 0,454 (SV-A549 vs tubo-MDCK), 0,077 (SV-MDCK vs tubo-A549), 0,664 (SV-MDCK vs tubo-MDCK), y 0,267 (tubo-A549 vs tubo MDCK).

b Los valores de P para la comparación de los VPN entre técnicas fueron los siguientes: <0,001 (RT-PCR vs SV-A549), <0,001 (RT-PCR vs SV-MDCK), <0,001 (RT-PCR vs tubo-A549), <0,001 (RT-PCR vs tubo-MDCK), 0,434 (SV-A549 vs SV-MDCK), 1 (SV-A549 vs tubo-A549), 0,633 (SV-A549 vs tubo-MDCK), 0,346 (SV-MDCK vs tubo-A549), 0,761 (SV-MDCK vs tubo-MDCK), y 0,626 (tubo-A549 vs tubo MDCK).

4.3 Discusión:

El presente estudio demuestra que la RT-PCR es superior a las técnicas de cultivo viral para la detección del virus de la gripe A (H1N1)v. Además, observamos que el cultivo en SV es tan sensible como el cultivo viral convencional, y la línea celular A549, ampliamente utilizada para la detección de otros virus respiratorios, no es inferior a la línea MDCK, clásicamente utilizada como línea específica para la detección de virus de la gripe.

Ya es sabido, que las técnicas de RT-PCR son superiores y más rápidas que el cultivo viral en la detección de virus de la gripe estacional (129, 213-215). Estudios previos, que utilizan RT-PCR como método de referencia, demuestran que con el cultivo viral pueden perderse entre un 3% y un 46% de las muestras positivas para gripe estacional (129, 213, 214, 216-219). En nuestro estudio, utilizando como método de referencia el cultivo convencional, la RT-PCR desarrollada por el CDC detectó el virus pandémico en el 95,6% de las muestras positivas.

La utilización del cultivo viral como estándar de oro es cuestionable. Sin embargo, al tratarse de una nueva variante del virus de la gripe A y al ser la RT-PCR una técnica de nueva incorporación en nuestro laboratorio para adaptarnos a las necesidades de la pandemia, decidimos utilizar el método de referencia clásico como estándar de oro.

Entre los resultados discrepantes, en 17 muestras el virus fue detectado únicamente por RT-PCR, sin la confirmación por cultivo viral. Observamos que de estas muestras discrepantes, 8 eran de pacientes que ya estaban en tratamiento con antiviral, 5 habían sido cultivados tres días después de la recepción de la muestra en el laboratorio. Creemos que el cultivo viral podría haber sido positivo si las muestras se hubieran cultivado de inmediato en vez de ir a través de un ciclo de congelación-

descongelación. Otra muestra se envió al laboratorio cinco días después de la aparición de los síntomas. El deterioro de la calidad de la muestra, como resultado de estos retrasos podría ser responsable de la incapacidad del virus para crecer en cultivo celular (220). La contaminación cruzada parece una explicación poco probable de los casos que fueron positivos únicamente por RT-PCR, ya que los controles de agua de estas muestras fueron negativos.

En tres muestras se detectó el virus por cultivo convencional, pero la RT-PCR resultó negativa. Estas discrepancias pudieron ser debidas a inhibiciones de la PCR o la baja carga viral de las muestras. Se sabe que alrededor del 2% de las muestras del tracto respiratorio pueden presentar inhibiciones de la PCR (221), Sin embargo, el protocolo desarrollado por el CDC incluye un control interno para identificar mejor la posible inhibición o pérdida de la muestra. En estos tres casos discrepantes no se observó inhibición de la RT-PCR. Además, la RT-PCR realizada directamente en los tubos de cultivo fue positiva en las tres muestras, por lo tanto, llegamos a la conclusión de que las discrepancias tampoco fueron debidas a que la gripe detectada en el tubo fuera gripe estacional.

Una limitación del presente estudio es que no resolvimos los resultados discrepantes por ninguna técnica alternativa. Además, la técnica de RT-PCR evaluada parecía ser, a priori, superior al actual estándar de oro (cultivo convencional). Según la literatura, ante esta situación, cualquier técnica utilizada para resolver los resultados discrepantes sólo podría mejorar o dejar sin cambios la sensibilidad y especificidad aparente de la RT-PCR (222). Por lo tanto, coincidiendo con el enfoque de otros autores (214), decidimos utilizar un estándar de oro "extendido" para recalculamos los valores de validez de las técnicas evaluadas. La introducción del nuevo estándar de oro aumentó la especificidad de la RT-PCR, y mejoró ligeramente su sensibilidad.

En cuanto a la elección de la línea celular para el cultivo del virus de la gripe, esta ésta determinada por la capacidad del virus para infectar una línea y la facilidad con la que esa línea celular puede ser mantenida. En un estudio comparativo de las líneas Vero, MDCK, y MRC-5 utilizadas en SV, Reina et al. (223) demostraron que los virus influenza A infectaban más eficientemente los SV de la línea MDCK. Estudios más recientes demuestran que las células de pulmón de visón (Mv1Lu) son más sensibles que MDCK para la detección en SV del virus influenza A (112) y que la línea continua de carcinoma de pulmón humano (A549) es moderadamente sensible para la detección del virus de influenza A, aunque la combinación de A549 y Mv1Lu (R-Mix) en un solo vial fue sinérgica para la detección del virus pandémico A (H1N1)v (112). Nuestros datos aclaran que las técnicas de cultivo se pueden realizar con la línea celular A549, que es el más comúnmente utilizada en los laboratorios de microbiología.

5. ESTUDIO 2:

**EXCRECIÓN VIRAL PROLONGADA EN
PACIENTES CON GRIPE A (H1N1)V: SIGNIFICADO
CLÍNICO Y ANÁLISIS DE LA CARGA VIRAL EN
PACIENTES HOSPITALIZADOS.**

5.1. Material y Métodos

Diseño:

Realizamos un estudio prospectivo desde el 20 de septiembre hasta el 31 diciembre de 2009, en el cual incluimos todos los pacientes adultos con un diagnóstico confirmado de gripe A (H1N1) v que permanecieron ingresados en nuestra institución durante al menos 48 horas.

Aspectos éticos y legales:

El estudio fue aprobado y aceptado por el comité ético del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

El trabajo de investigación se realizó siguiendo las recomendaciones éticas internacionales aceptadas en materia de investigación clínica y respetando todos los aspectos establecidos en la legislación vigente que se citan a continuación:

- Convenio para la protección de los Derechos Humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina. Convenio relativo a los Derechos Humanos y la Biomedicina. (Aprobado por el Consejo de Ministros el 19 de noviembre de 1996, firmado el día 4 de abril de 1997, publicado en el BOE de 20-X-99 y corregido según BOE de 11-XI-99).
- Ley orgánica 15/99 de 13 de diciembre de protección de Datos de Carácter Personal.
- Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.

Población de estudio:

Durante el periodo de estudio, los pacientes con sospecha de gripe fueron diagnosticados y tratados según un protocolo estándar de actuación. De este modo, a todos los pacientes con sospecha de gripe se les tomó un exudado nasofaríngeo para confirmar el diagnóstico de gripe mediante RT-PCR. Se ingresaron aquellos pacientes que desarrollaron complicaciones o aquellos con enfermedades graves subyacentes. Los pacientes con gripe A (H1N1)v confirmada, ingresados al menos durante 48 horas, fueron incluidos en el estudio. En todos los casos se aplicaron las medidas de aislamiento necesarias. Los pacientes fueron tratados a criterio del médico responsable.

A los pacientes incluidos en el estudio se les recogió un exudado nasofaríngeo cada dos días durante la primera semana después del diagnóstico de gripe, y a continuación una vez a la semana o hasta que la detección viral fue negativa.

Los datos demográficos y clínicos de los pacientes incluidos en el estudio fueron recogidos en un protocolo pre-establecido que incluía las siguientes variables: edad, sexo, enfermedad de base, estado de vacunación frente a la gripe, datos clínicos, analíticos y radiológicos en el momento del diagnóstico, tratamiento, complicaciones relacionadas con la gripe y evolución.

Definiciones:

Excreción viral prolongada (EVP): detección de gripe A (H1N1)v mediante RT-PCR en tiempo real en el día +7 después del diagnóstico.

En base a la enfermedad subyacente y la gravedad del cuadro, se clasificaron los pacientes en cuatro grupos de riesgo: 1) pacientes con insuficiencia respiratoria aguda

o shock séptico que requirieron ingreso en UCI, 2) pacientes inmunodeprimidos (neoplasias hematológicas [con o sin trasplante de médula ósea], infección por VIH, enfermedades inflamatorias con tratamiento inmunosupresor o biológico, y receptores de trasplante de órganos sólidos), 3) pacientes con enfermedades crónicas concomitantes, tales como edad avanzada (> 65 años), un índice de masa corporal \geq 30, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), incluyendo asma, enfermedades cardiovasculares excluida la hipertensión aislada, cáncer activo, insuficiencia renal crónica, enfermedad hepática crónica, diabetes mellitus, y hemoglobinopatías, 4) mujeres embarazadas.

Síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y shock séptico se definieron mediante los criterios estándar (224, 225).

Procesamiento de las muestras:

Los hisopos nasofaríngeos fueron preservados en 1 ml de medio de transporte viral y se almacenaron a 4°C durante no más de 48 horas hasta su procesamiento. El ARN viral se extrajo a partir de 200µl de la muestra eluida en 60µl de tampón de elución en un dispositivo Nuclisens easyMAG (bioMérieux, Boxtel, Países Bajos) siguiendo las instrucciones del fabricante. El extracto se conservó a 4 ° C durante las primeras 48 horas o a -70 ° si el análisis no podía realizarse dentro de ese periodo de tiempo. El virus de la gripe A (H1N1)v fue detectado mediante RT-PCR a tiempo real siguiendo el protocolo de la OMS/CDC. Utilizamos un termociclador de Stratagene MX3000 (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU).

Cuantificación de la carga viral:

La cuantificación se hizo retrospectivamente tanto en las muestras de diagnóstico como en las de seguimiento. Para ello realizamos una RT-PCR a tiempo real en un dispositivo LightCycler 2.0 utilizando el kit Influenza A/H1N1 virus RNA Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Realizamos dos reacciones independientes con el objetivo de cuantificar la HA y el gen humano RNaseP por medio de las curvas de calibración específicas incluidas en cada uno de los ensayos. La cuantificación relativa se hizo normalizando la cuantificación de HA respecto a la RNaseP. La carga viral se expresó como unidades de cuantificación relativa (uqr).

Para evaluar la reproducibilidad del ensayo, analizamos tres alícuotas de una selección de muestras en tres días consecutivos. Calculamos una desviación estándar (SD) de $0,018 \pm 0,018$. La sensibilidad analítica del ensayo fue de 2,83 log₁₀ copias /ml.

Para el análisis de la dinámica de la carga viral en el tiempo, se clasificaron los pacientes en seis grupos (0, 2-4, 5-7, 8-10, 11-13, y 14-16) de acuerdo con el número de días de persistencia después del diagnóstico. Los valores disponibles para cada punto de tiempo específico se promediaron.

Análisis estadístico:

En el análisis univariado, las variables categóricas se compararon mediante la prueba de chi-cuadrado. Las variables no continuas con distribución normal se compararon mediante la prueba de Mann-Whitney U y se expresó como mediana y rango intercuartilico (IQR). Las variables continuas distribuidas normalmente se compararon mediante la prueba t de student y se expresaron como la media (SD).

Para evaluar la correlación entre la concentración viral inicial y la edad, duración de los síntomas, tiempo hasta el inicio de oseltamivir después de la aparición de la enfermedad, días de excreción viral, y duración de la estancia hospitalaria se utilizó el coeficiente de correlación de rangos de Spearman.

Al realizar el análisis multivariado se aplicó un método de inclusión de variables paso a paso “forward stepwise”, en el que se incluyeron todas las variables que en el análisis univariado hubiesen tenido una significancia de $P < 0,1$. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a los valores de $p < 0,05$. El análisis se realizó con el programa SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, Illinois, EE.UU.).

5.2. Resultados

Durante el período de estudio, 91 pacientes con gripe A (H1N1)v confirmada fueron hospitalizados durante al menos 48 horas. De ellos, 64 pacientes aceptaron participar en el estudio.

Dieciséis pacientes (16/64; 25%) presentaron EVP en el día +7. De estos, 6/16 (9,3%) presentaron EVP en el día +14 después de la muestra positiva inicial. Los pacientes con EVP se compararon con aquellos que no presentaron excreción viral prolongada (Tabla 1).

El análisis univariable mostró que los factores asociados con EVP fueron; requerir ingreso en UCI (69% vs 33%, $P = 0,02$), presentar una expectoración purulenta (75% vs 44%, $P = 0,04$), recibir mayor dosis de oseltamivir (150 mg/12 h) (62,5% vs 27%, $P = 0,016$), estar en tratamiento con corticosteroides (50% vs 21%, $P = 0,05$), requerir ventilación mecánica (VM) (50% vs 12,5%, $P = 0,004$), y una hospitalización más prolongada (mediana; 34 vs 7 días, $p = 0,003$). No se pudo

demostrar una asociación significativa entre EVP y mortalidad (12,5% vs 8,3%, P = 0,63).

Los factores que se asociaron de forma independiente con EVP en el análisis multivariable fueron: inmunosupresión (OR; 5,15, IC 95%, 1.2-22.2, p = 0,03) y necesidad de ventilación mecánica (OR; 11,7, IC 95%, 2.5-54.4, p = 0,002).

Tabla 1: Comparación de los pacientes hospitalizados con gripe A (H1N1)v que presentaron EVP con los que no lo hicieron.

	Pacientes con EVP N = 16 (25%)	Pacientes sin EVP N = 48 (75%)	P	OR (95%CI)	P
Datos demográficos					
Sexo			0,56		
Hombre	8 (50)	19 (39,6)			
Mujer	8 (50)	29 (60,4)			
Edad (media±SD)	47,6±17,5	43,9±13	0,37		
Grupos de riesgo					
UCI	11 (68,8)	16 (33,3)	0,02	5,15 (1,2-22,2)	0,03
Inmunodeprimidos	8 (50)	13 (27,1)	0,12		
Enfermedades crónicas	9 (56,2)	35 (72,9)	0,23		
Embarazadas	2 (12,5)	4 (8,3)	0,63		
Índice de comorbilidad de Charlson (mediana, IQR)	6, 3 – 7,75	2, 1 – 6	0,06		
Síntomas de presentación					
Fiebre	15 (93,8)	45 (93,8)	1		
Tos	14 (87,5)	40 (83,3)	1		
Expectoración purulenta	12 (75)	21 (43,8)	0,04		
Cefalea	0	8 (16,7)	0,18		
Mialgias	6 (37,5)	21 (43,8)	0,77		
Diarrea	4 (25)	8 (16,7)	0,47		
Días de síntomas antes del diagnóstico (mediana, IQR)	2, 1 – 4,7	2, 0 – 4	0,59		
Hallazgos radiológicos iniciales					
Cualquier infiltrado	5 (31,2)	14 (29,8)	1		
Un infiltrado segmentado	1 (6,2)	7 (14,9)	0,66		
Infiltrados bilaterales	6 (37,5)	13 (27,7)	0,53		
Infiltrado intersticial	2 (12,5)	1 (2,1)	0,15		
Tratamiento					
Días de enfermedad al inicio del tratamiento (median, IQR)	2,5, 0 - 5	2, 0 - 4	0,48		
Oseltamivir 75 mg/12 h	7 (43,8)	35 (72,9)	0,06		
Oseltamivir 150 mg/12 h	10 (62,5)	13 (27,1)	0,016		

5. ESTUDIO 2: EXCRECIÓN VIRAL PROLONGADA EN PACIENTES CON GRIPE A (H1N1)

Tratamiento antibiótico	16 (100)	40 (83,3)	0,18		
Corticosteroides	8 (50)	10 (20,8)	0,05		
Soporte inotrópico	3 (18,8)	2 (4,2)	0,09		
Aporte de oxígeno	8 (50)	14 (29,2)	0,14		
Ventilación mecánica	8 (50)	6 (12,5)	0,004	11,7 (2,5-54,4)	0,002
Complicaciones					
Exacerbación de EPOC	4 (25)	3 (6,2)	0,06		
Exacerbación de asma	1 (6,2)	7 (14,6)	0,66		
Confección bacteriana	6 (37,5)	16 (33,3)	0,77		
SDRA	6 (37,5)	6 (12,5)	0,06		
Shock séptico	3 (18,8)	2 (4,2)	0,09		
Evolución					
Muerte	2 (12,5)	4 (8,3)	0,63		
Días de estancia hospitalaria (mediana, IQR)	34,9 – 50	7,5 – 20	0,003		
Días de estancia en UCI (mediana, IQR)	21, 2 – 49	4,5, 2 – 14,5	0,20		

Se realizó cuantificación viral relativa en 58 de los 64 pacientes (16 con EVP y 42 sin EVP). La carga viral en la muestra diagnóstica varió de $1,17 \times 10^{-3}$ a 317 uqr con una mediana de 0,1 y un IQR=0,02-2,02.

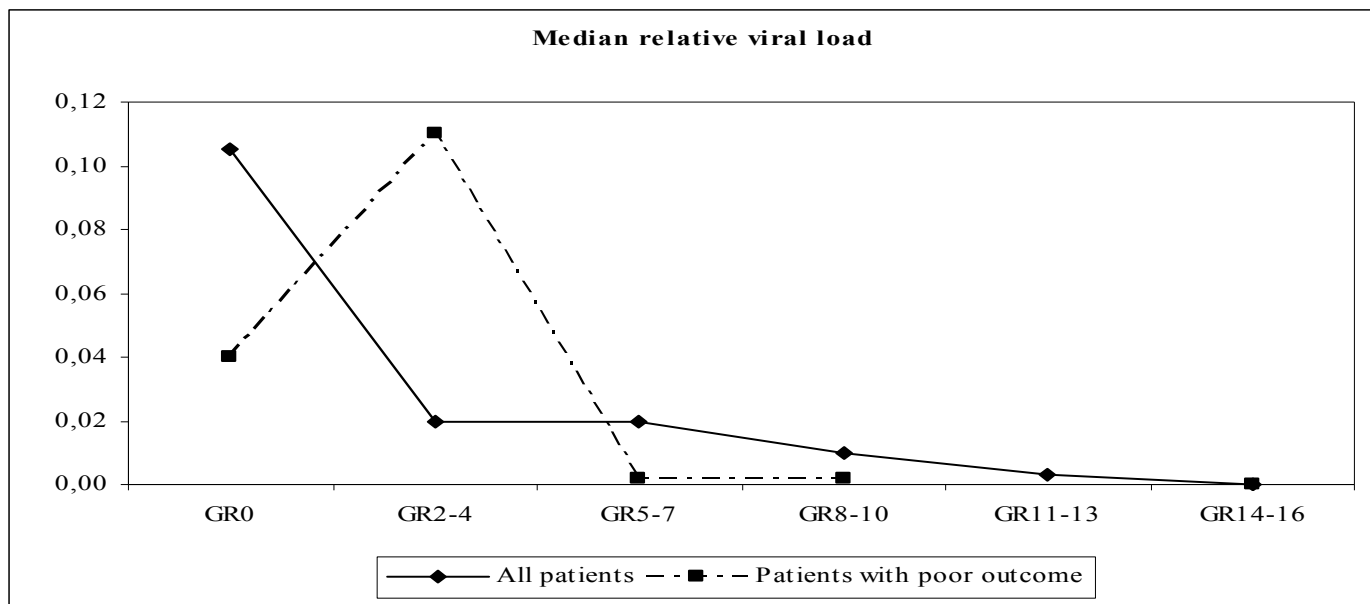
Encontramos una correlación negativa entre la carga viral al diagnóstico y la edad ($r = -0,287$, $p = 0,03$). Sin embargo, no hubo correlación entre la carga viral al diagnóstico y la duración de los síntomas ($r = -1,94$, $P = 0,14$), tiempo hasta el inicio de oseltamivir después de la aparición de la enfermedad ($r = -0,11$, $P = 0,4$), duración de la excreción viral ($r = -0,4$, $p = 0,09$) y duración de la estancia hospitalaria ($r = -0,23$, $P = 0,09$). Observamos una tendencia a presentar mayor carga viral en mujeres embarazadas (4,1 frente a 0,1, $P = 0,07$) y pacientes con EVP (0,56 vs 0,08, $p = 0,08$), mientras que la carga viral fue menor en los pacientes con shock séptico (0,006 vs 0,14; $P = 0,03$) y con mortalidad hospitalaria (0,02 vs. 0,12, $p=0,06$) (tabla 2).

En la figura 1 aparece representada la dinámica de la carga viral durante la hospitalización en todos los pacientes, incluidos aquellos con mala evolución (SDRA y/o muerte). El aclaramiento viral fue diferente en ambos grupos. En todos los pacientes se observó una disminución progresiva de la carga viral, pero en los pacientes con mala evolución se observó una carga viral inicial más baja seguida de un pico en el día 2-4 después del diagnóstico produciéndose la eliminación del virus en los días 5-7.

Tabla 2: Relación entre la carga viral relativa al diagnóstico y las características clínicas de los pacientes hospitalizados con gripe A (H1N1)v.

	Carga viral (median, IQR)	Carga viral (median, IQR)	p
	Pacientes que cumplen la variable	Pacientes que no cumplen la variable	
Grupos de riesgo			
Ingreso en UCI	0,15 (0,02 – 4,1)	0,10 (0,007 – 1,7)	0,55
Inmunodeprimidos	0,15 (0,02 – 1,8)	0,10 (0,016 – 2,5)	0,73
Comorbilidad crónica	0,14 (0,02 – 2,4)	0,10 (0,007 – 1,64)	0,96
Embarazadas	4,1 (0,08 – 58,1)	0,1 (0,02 – 1,08)	0,07
Estado de vacunación			
Vacunación gripe estacional	0,2 (0,02 – 1,6)	0,1 (0,01 – 2,7)	0,99
Vacunación gripe pandémica	12,1 (4,3 – 19,8)	0,1 (0,02 – 1,5)	0,06
Excreción viral prolongada (EVP)	0,56 (0,03 – 5,9)	0,08 (0,007 – 0,85)	0,08
Complicaciones			
Exacerbación de EPOC	0,45 (0,16 – 0,45)	0,10 (0,01 – 2,3)	0,21
Coinfección bacteriana	0,05 (0,005 – 1,44)	0,14 (0,02 – 2,7)	0,38
SDRA	0,07 (0,01 – 1,98)	0,12 (0,02 – 2,3)	0,71
Shock séptico	0,006 (0,0005 – 0,07)	0,14 (0,02 – 2,7)	0,03
Evolución			
Muerte	0,02 (0,0008 – 0,17)	0,12 (0,02 – 2,9)	0,06

Figura 1: dinámica de la carga viral durante la hospitalización



Día de la medida	Día 0	Día 2-4	Día 5-7	Día 8-10	Día 11-13	Día 14-16
Todos los pacientes						
Mediana de carga viral; IQR (No. de pacientes)	0,1; 0,02-2,0 (58)	0,02; 0,002-0,1 (15)	0,02; 0,004-0,02 (15)	0,01; 0,002-0,17 (10)	0,003 (1)	0,0003 (1)
Pacientes con mala evolución						
Mediana de carga viral; IQR (No. de pacientes)	0,04; 0,004-0,25 (11)	0,11; 0,06-0,11 (3)	0,001; 0,0008-0,002 (3)	0,002; 0,002-0,002 (2)	0	0,0003 (1)

5.3. Discusión:

En este estudio encontramos que un 25% de los pacientes hospitalizados con gripe A (H1N1)v confirmada presentaron EVP después del diagnóstico. Este fenómeno de EVP se asoció con inmunodepresión y necesidad de ventilación mecánica como factores predisponentes, así como a la presencia de complicaciones relacionadas con la gripe. La dinámica de la carga viral en pacientes con mala evolución fue diferente a la de los otros pacientes.

Las recomendaciones actuales para el aislamiento respiratorio de los pacientes hospitalizados con gripe establecen 7 días como duración de dicho aislamiento (226). Los estudios que se han realizado hasta el momento de EVP, tanto en la gripe estacional como en la pandémica, han demostrado que del 22% al 57% de los pacientes hospitalizados continúan excretando virus más allá del día 7 después del inicio de la enfermedad (70, 227). Sin embargo no hay datos sobre la viabilidad del virus durante una EVP. La positividad del cultivo viral en muestras respiratorias recogidas en el día 8 después del diagnóstico sólo se ha evaluado en un estudio (228), en el que se observó una tasa de positividad del cultivo de 19%. Son necesarios más estudios que evalúen la potencial de transmisión del virus en pacientes con EVP.

En un estudio previo, Lee et al (70) sugieren que la EVP puede comportarse como un marcador de gravedad en pacientes con gripe estacional. Además, en este estudio, los autores encontraron una asociación entre la EVP y; edad avanzada, comorbilidad crónica y terapia con corticosteroides sistémicos. En la actualidad hay pocos datos acerca de la importancia de la EVP en pacientes con gripe pandémica. En una serie de 22 pacientes con gripe pandémica, la edad fue el único factor asociado con un mayor período de excreción del virus, siendo la correlación negativa (229). En nuestra serie no hemos encontrado una correlación entre EVP y edad o comorbilidad

crónica, aunque si observamos que la inmunodepresión aumenta 5 veces el riesgo de EVP ($p = 0,03$). El otro factor de riesgo independientemente asociado con EVP fue la necesidad de ventilación mecánica ($p = 0,002$).

La mayoría de nuestros pacientes presentaron EVP durante más de 7 días y menos de 14. Sólo un paciente con leucemia presentó excreción viral durante más de 4 semanas. Es sabido que pacientes con condiciones hematológicas, particularmente aquellos con linfopenia, pueden presentar excreción viral más allá de las 4 semanas (230).

Dada la calidad heterogénea de las muestras obtenidas por frotis nasofaríngeos, se ha descrito recientemente la necesidad de realizar una cuantificación relativa para la detección de gripe A (H1N1)v (231). Para realizar este estudio, desarrollamos una técnica reproducible que nos permitiera realizar cuantificación relativa en muestras consecutivas.

En el presente estudio, encontramos que la carga viral relativa en el momento del diagnóstico se correlacionaba negativamente con la edad, el shock séptico, y mortalidad. De acuerdo con lo descrito por Lee et al. (70), en pacientes con gripe estacional, nosotros tampoco encontramos correlación entre la carga viral y la presencia de comorbilidad importante, duración de los síntomas, o inicio precoz del tratamiento antiviral.

Otro hallazgo importante de este estudio es la observación de que los pacientes con mala evolución presentaban dinámicas de carga viral diferentes a las del resto de la población estudiada. Estos datos son consistentes con los previamente descritos por Para et al (232). Los pacientes con SDRA y /o los que murieron tenían una menor carga viral inicial con un pico a los 2-4 días y un aclaramiento viral en el día 5-7 después del diagnóstico. La menor carga viral inicial en este grupo de pacientes

sugiere que la replicación del virus podría ser más eficiente en el tracto respiratorio inferior y que por lo tanto la replicación es menor en el tracto respiratorio superior.

Nuestro estudio tiene varias limitaciones. En primer lugar, las muestras nasofaríngeas no se recogieron diariamente por lo que no se pudo estimar la duración media total de la replicación viral. En segundo lugar, debido al número limitado de pacientes, no podemos sacar conclusiones acerca de los factores de mal pronóstico. En tercer lugar, se analizó la carga viral sólo en las muestras obtenidas por exudado nasofaríngeo, por lo que no se pudo comparar la carga viral en el tracto respiratorio superior e inferior.

6. ESTUDIO 3:

IMPACTO CLÍNICO DE LA BUSQUEDA SISTEMÁTICA DE GRIPE EN PACIENTES INGRESADOS EN UNIDADES DE CUIDADOS INTENSIVOS

6.1. Material y métodos:

Diseño

Desde el 15 de diciembre de 2010 hasta 28 de febrero 2011 todos los aspirados traqueales (AT) obtenidos de pacientes adultos (≥ 18 años) ingresados en nuestras UCIs con sospecha de infección respiratoria del tracto respiratorio inferior (TRI) se enviaron al laboratorio de Microbiología para la búsqueda sistemática de virus de la gripe.

Los criterios de ingreso en UCI y de manejo de los pacientes, incluyendo la necesidad de intubación y la obtención del AT se hicieron a discreción del médico tratante.

Los pacientes con gripe confirmada por laboratorio fueron seguidos prospectivamente por un especialista en enfermedades infecciosas. Todos ellos fueron tratados con oseltamivir 150 mg/día durante 5-10 días. Los datos clínicos y microbiológicos se recogieron en un protocolo preestablecido y se registraron en una base de datos.

Las variables recogidas incluyeron; edad, sexo, índice de comorbilidad de Charlson (233), tipo de unidad de cuidados intensivos, fecha y motivo de ingreso en UCI, APACHE II (234) al ingreso en la UCI, fecha de inicio de los síntomas de gripe, manifestaciones clínicas y hallazgos radiológicos, fecha de la toma de muestras, otras muestras obtenidas para el diagnóstico y su resultado, fecha de inicio del tratamiento antiviral, complicaciones (shock séptico, insuficiencia respiratoria aguda, SDRA), y datos sobre la evolución del paciente incluyendo la mortalidad a los 30 días después del diagnóstico de la gripe, duración de la estancia en UCI y estancia hospitalaria.

Definiciones:

Gripe no sospechada: cuando las pruebas para el diagnóstico de gripe no se habían solicitado de manera explícita o no se había solicitado previamente en otras muestras, tales como muestras de exudado nasofaríngeo, y el paciente no estaba recibiendo tratamiento antiviral empírico inmediatamente después de la toma de muestras.

Los episodios de gripe los clasificamos como:

- Gripe adquirida en la comunidad: si el síndrome gripal (fiebre, escalofríos, malestar general, dolor de garganta, rinorrea, tos, disnea, mialgias, náuseas y diarrea) se inició antes o durante las primeras 72 horas del ingreso en el hospital.
- Gripe nosocomial: los síntomas comenzaron después de las primeras 72 horas de ingreso (235).

En cuanto a los motivos de ingreso en UCI, definimos insuficiencia respiratoria grave como hipoxemia grave ($\text{PaO}_2 < 60 \text{ mmHg}$), refractaria a la terapia de O_2 de alto flujo (FiO_2 50%) con máscara de Venturi.

En cuanto a las condiciones subyacentes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se definió de acuerdo a los criterios de la Iniciativa 2007 Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (236). Se consideraron pacientes inmunodeprimidos aquellos con; enfermedad hematológica maligna (con o sin trasplante de médula ósea), infección por VIH, enfermedades inflamatorias en el tratamiento biológico o inmunosupresor, y los receptores de trasplante de órgano sólido. En cuanto a la vacunación frente a la gripe, consideramos que los pacientes estaban vacunados si habían recibido la vacunación dentro de los 6 meses previos al ingreso.

La neumonía se definió de acuerdo a las actuales guías IDSA/ATS (237). SDRA y shock séptico fueron definidas según los criterios estándar (224 , 225).

Procedimientos microbiológicos:

Las muestras para el diagnóstico microbiológico fueron tomadas por aspiración endotraqueal usando una sonda estéril 14F a una profundidad de 2 cm del extremo distal del tubo endotraqueal. Las secreciones obtenidas fueron transportadas en un recipiente estéril (contenedor de muestras Lukens, Sherwood Medical, Tullamore, Irlanda) hasta el laboratorio de microbiología. Una vez en laboratorio, la muestra se dividió en dos alícuotas de 200 µl; una para la detección de virus y otra para la realización de los procedimientos de bacterias habituales. La alícuota reservada para la detección de gripe se conservó en medio de transporte viral (305C Copán, Copán Innovación, Brescia, Italia) a 4 ° C durante no más de 48 horas o a -70 ° C si el análisis se realizaba pasadas las 48 horas.

Los procedimientos normales para la detección de bacterias incluyeron el cultivo cuantitativo en agar sangre, agar chocolate, agar McConkey, y cuando fue necesario, agar Legionella (BCYD) (238). Se consideraron muestras positivas aquellas con recuentos bacterianos $\geq 10^5$ ufc/ml de uno o varios microorganismos significativos. La identificación de los microorganismos y las pruebas de sensibilidad se realizaron en un sistema automático (MicroScan, Dade Behring, Sacramento, California, EE.UU.) Los puntos de corte se aplicaron de acuerdo a las pautas marcadas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (239). Consideramos como no significativos los siguientes microorganismos: *Streptococcus* del grupo Viridans, *Enterococcus spp*, *Staphylococcus*, *Neisseria spp*, *Corynebacterium spp* y *Candida spp*.

La extracción de RNA se realizó en un sistema Nuclisens easyMAG (bioMérieux, Boxtel, Países Bajos) siguiendo las instrucciones del fabricante. El virus de la gripe A (H1N1)v fue detectado mediante RT-PCR, siguiendo el protocolo de la OMS/CDC en un termociclador Stratagene MX3000 (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.). Las muestras con resultados indeterminados se repitieron con el kit de detección RealTime ready A/H1N1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Para la detección del virus de la gripe B utilizamos el kit de detección RealTime ready Influenza B (Roche Diagnostics). Los virus estacionales H3N2 y H1N1 fueron detectados como se describe previamente en la literatura (240 1694).

Para la realizar la cuantificación relativa utilizamos la técnica descrita en el estudio presentado anteriormente (estudio 2, sección material y métodos).

Análisis estadístico:

Los datos recogidos se volcaron en una base de datos de Microsoft ACCESS® y de ahí a una base de SPSS para Windows versión 16.0 (Chicago) para realizar el análisis estadístico.

Las variables cualitativas se presentaron con su distribución de frecuencias y las variables cuantitativas en media y desviación estándar (DS) o mediana y rango intercuartil (IQR) en caso de asimetría. Para contrastar las diferencias entre ambos grupos se aplicó el análisis de las variables cualitativas por el test de X^2 o *test de Fisher*. Las variables cuantitativas por grupo de estudio se contrastaron con el test de la *t de Student* para grupos independientes o el test de la mediana en caso de asimetrías. La asociación entre las variables continuas se evaluó utilizando la prueba de Mann-Whitney.

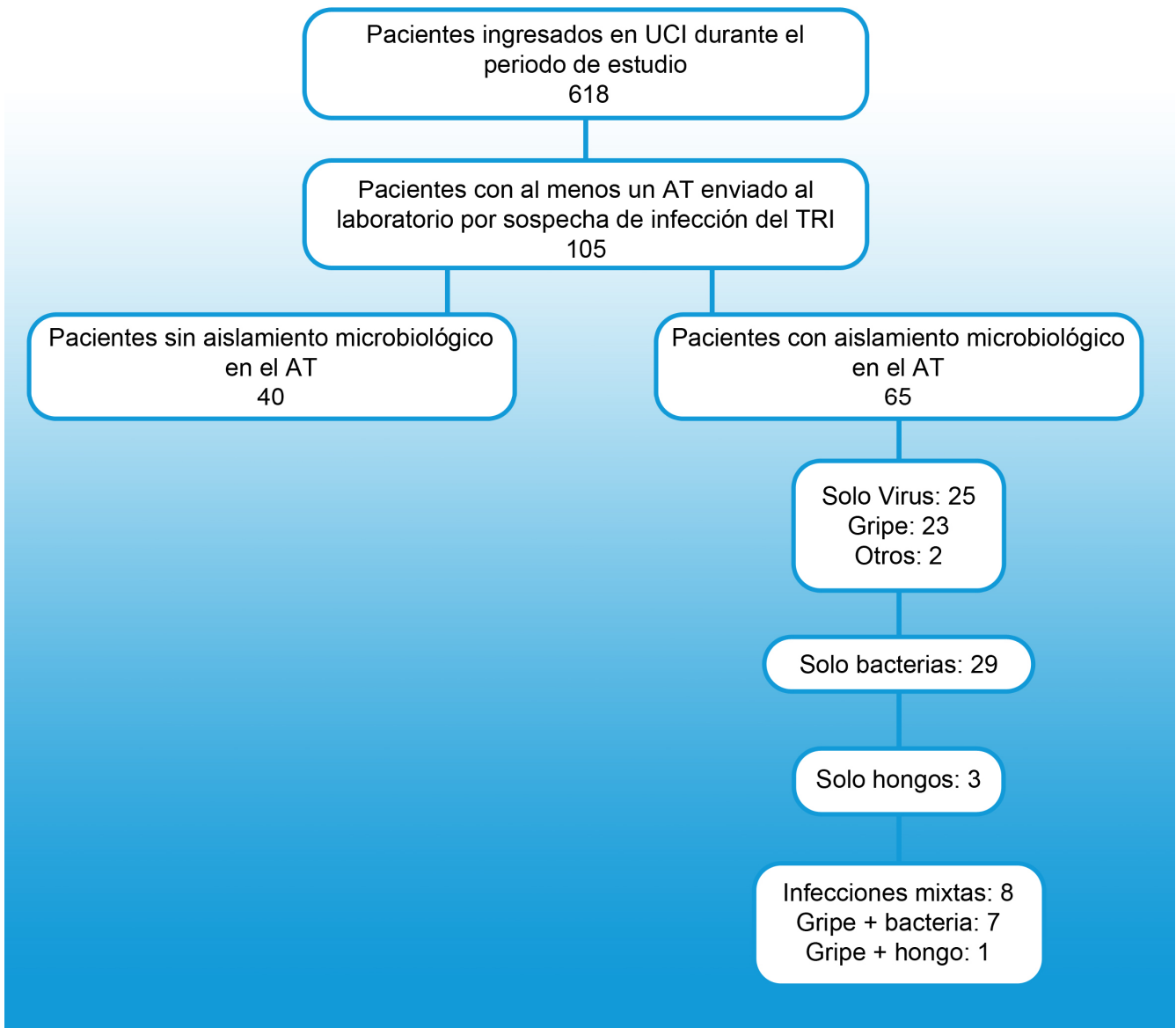
Para analizar los factores de riesgo independientes para gripe no sospechada y mortalidad a 30 días utilizamos un análisis multivariable en el que se incluyeron todas las variables que en el análisis univariable hubiesen tenido una $p < 0,1$. Se ajustaron por las variables de confusión y se estudiaron las interacciones mediante modelos de regresión logística. Se calculó el “odds ratio” (OR) con un intervalo de confianza del 95%. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a los valores de $p < 0,05$. El análisis se realizó con el programa SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, Illinois, EE.UU.).

6.2. Resultados:

Durante el período de estudio ingresaron 618 pacientes en UCIs de adultos de nuestra institución. Uno o más AT de 105 pacientes fueron enviados al laboratorio por sospecha de infección del TRI.

Se pudo establecer un diagnóstico etiológico en 65 pacientes (figura 1). Veinte y nueve pacientes fueron diagnosticados de infección bacteriana. Las frecuencias de las bacterias aisladas en AT fueron las siguientes: *S. aureus* (37,9%); *Enterobacteriaceae* (24,1%) *P. aeruginosa* (17,2%); *S. pneumoniae* (13,7%), y *A. baumannii* (3,8%).

Figura 1: diagrama de flujo de la población de estudio



Como se muestra en la figura 1, en 25 pacientes se identificó un virus como único agente etiológico; en 23 pacientes se detectó virus de la gripe, en los otros 2 pacientes se detectó adenovirus y virus herpes simplex respectivamente.

En 3 pacientes se aisló *Aspergillus fumigatus* como único agente etiológico.

Los ocho pacientes restantes presentaron una coinfección del virus de la gripe y los siguientes microorganismos; *S. aureus* (3), *S. pyogenes* (1), *S.pneumoniae* (1), *A. baumannii* (1), *P. aeruginosa* (1), y *A. fumigatus* (1).

Incidencia y características clínicas de los pacientes con gripe

Durante el periodo de estudio, la incidencia de la gripe en las UCIs de adultos fue de 5,3 casos por cada 100 ingresos. La incidencia de gripe entre los pacientes con al menos un AT enviado al laboratorio fue de 29,5 casos por 100 ingresos.

En la Tabla 1 se muestran las características clínicas de los 31 pacientes con gripe. La gripe no fue sospechada en 15 pacientes (48.4%) y fue de adquisición nosocomial en 13 pacientes (42%). En el momento del diagnóstico de la gripe todos los pacientes, excepto uno, estaban intubados.

Entre los pacientes con coinfección (8), las razones de ingreso en UCI fueron las siguientes; cirugía (5), insuficiencia respiratoria (1), fallo cardiaco (1), cirrosis descompensada (1). La gripe fue de adquisición nosocomial en 5 pacientes (62,5%) y 7 pacientes (87,5%) fueron diagnosticados de neumonía.

Tabla 1: Características de los pacientes ingresados en UCI con diagnóstico confirmado de gripe.

	n = 31 (%)
Características demográficas	
Edad (años) (mediana, 95%IC)	64, 48-70
Hombres	20 (64,5)
Tipo de UCI	
Medica	21 (67,7)
Quirúrgica	10 (32,3)
Motivo de ingreso en UCI	
Insuficiencia respiratoria aguda	14 (45,1)
Cirugía	10 (32,2)
Fallo cardiaco	4 (12,9)
Otros ^a	3 (9,6)
APACHE II score (mediana, 95%IC)	15, 12-17
Manifestaciones clínicas	
Días de síntomas antes del diagnóstico (median; IQR)	3, 0-7
Fiebre	22 (71)
Tos	23 (72,4)
Disnea	24 (77,4)
Diarrea	3 (9,7)
Neumonía	23 (74,2)
Coinfección	8 (25,8)
Infección no sospechada	15 (48,4)
Infección nosocomial	13 (42)
Virus de la gripe	
(H1N1)v	27 (87)
H3N2	1 (3,2)
B	3 (9,7)
Complicaciones	
Shock séptico	13 (41,9)
SDRA	16 (51,6)
Mortalidad a los 30 días	9 (29)

^a Fallo hepático agudo (un paciente), pancreatitis necrotizante (un paciente), y cirrosis descompensada (un paciente). SDRA: síndrome de distress respiratorio agudo, UCI: unidad de cuidados intensivos, IQR: rango intercuartilico.

Características microbiológicas

El principal virus de la gripe detectado durante el periodo de estudio fue el virus A (H1N1)v de 2009, que se detectó en 27 pacientes (87%). Detectamos virus influenza B en 3 pacientes (9,7%) y virus estacional A (H3N2) en 1 paciente (3,2%).

La mediana de la carga viral en el momento del diagnóstico de gripe fue 1,55 (IQR 0,68 a 3,16). La carga viral tendió a ser mayor en pacientes en los que la gripe fue sospechada (Tabla 2).

Comparación de casos sospechados y no sospechados

La comparación de casos sospechados vs. casos no sospechados se muestra en la tabla 2. El análisis univariable mostró diferencias estadísticamente significativas en cuanto a edad (53 versus 69 años; $p=0,008$), ICU médica (93,8% versus 40%; $p=0,002$), ingreso en UCI por insuficiencia respiratoria (68,8% versus 20%; $p=0,002$), estancia en UCI antes del diagnóstico de gripe [1 (IQR, 0-1) versus 4 (IQR 1-17) días $p=0,01$], gripe nosocomial (18,8% versus 66,7%; $p=0,01$), tos (93,8% versus 53,3%; $p=0,01$), infiltrados pulmonares localizados en la placa de tórax (6,3% versus 40%; $p=0,04$), mediana de días desde el inicio de los síntomas hasta el inicio de tratamiento antiviral (2 (IQR, 2-6) versus 9 (IQR, 4,5-18) días; $p=0,02$), neumonía (93,8% versus 53,3%; $p=0,01$), y desarrollo de SDRA (75% versus 26,7%; $p=0,01$). La

mortalidad a los 30 días después del diagnóstico de gripe fue 37,5% y 20% ($p=0,43$) en los pacientes con gripe sospechada y no sospechada, respectivamente.

El análisis multivariable reveló que los factores de riesgo independientemente asociados con gripe no sospechada fueron; ingreso en una UCI quirúrgica (OR, 37,1; 95% IC, 2,6-666,6; $p=0.01$) y presencia de infiltrado pulmonar localizado en la placa de tórax (OR, 27,8; 95%IC, 1,32-584,06; $p=0.03$). Una mayor estancia en UCI antes del diagnóstico de gripe también se asoció con gripe no sospechada pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (tabla 3).

Evolución

La mortalidad global a los 30 días después del diagnóstico de gripe fue del 29%. El análisis univariable de los factores de riesgo asociados a mortalidad está representado en la tabla 4. El único factor de riesgo independientemente asociado a mortalidad a los 30 días del ingreso fue la insuficiencia respiratoria aguda como causa de ingreso en UCI (OR, 7,5; 95% IC, 1,23-45,8; $p=0.03$)

Tabla 2: Comparación de pacientes con gripe confirmada en AT con sospecha clínica y sin ella.

	Sospechada N = 16 (%)	No sospechada N = 15 (%)	p
Características demográficas			
Edad (años) (mediana; IQR)	53; 42-66	69; 60-79	0,0008
Hombres	11 (68,8)	9 (60)	0,71
Enfermedades subyacentes			
EPOC	7 (43,8)	7 (46,7)	1
Inmunosupresión	3 (18,8)	2 (13,3)	1
Estado vacunación gripe	4 (25)	3 (20)	1
Charlson (mediana; IQR)	4,5; 2,2-7	6; 3-9	0,26
Tipo de UCI			
Medica	15 (93,8)	6 (40)	0,002
Quirúrgica	1 (6,3)	9 (60)	
Características de la gripe			
Días de síntomas antes del diagnóstico (mediana; IQR)	3; 1-6,7	5; 5-9	0,92
Días de estancia en UCI antes del diagnóstico			
Días de estancia hospitalaria antes del diagnóstico	1; 0-1	4; 1-17	0,01
Adquisición nosocomial	2,5; 1-5,75	15; 5-22	0,008
Fiebre	3 (18,8)	10 (66,7)	0,01
Tos	11 (68,8)	11 (73,3)	1
Disnea	15 (93,8)	8 (53,3)	0,01
Neumonía	13 (81,3)	11 (73,3)	0,68
Infiltrado localizado en la placa de tórax	15 (93,8)	8 (53,3)	0,01
Carga viral al diagnóstico (mediana; IQR)	1 (6,3)	6 (40)	0,04
Días de tratamiento antiviral	2,37; 1,1-5,42	1,4; 0,23-1,97	0,09
Co-infección	2; 2-6	9; 4,5-18	0,02
	3 (18,8)	5 (33,3)	0,43
Evolución			
Shock séptico	8 (50)	5 (33,3)	0,47
SDRA	12 (75)	4 (26,7)	0,01
Mortalidad a los 30 días	6 (37,5)	3 (20)	0,43
Días de estancia en UCI (mediana; IQR)	11; 4-33	27; 8-50	0,21
Días estancia hospitalaria (mediana; IQR)	39; 4-46	66; 30-90	0,06

Nota: **EPOC** enfermedad pulmonar obstructiva crónica; **SDRA** síndrome de distress respiratorio agudo; **IC** intervalo de confianza; **UCI** unidad de cuidados intensivos; **IQR** rango intercuartilico.

Tabla 3: Análisis multivariable de los factores de riesgo asociados a gripe no sospechada

	OR (95% IC)	p
UCI quirúrgica	37,13 (2,06-666,6)	0,01
Infiltrado localizado en la placa de tórax	27,78 (1,32-584,06)	0,03
Días de estancia en UCI antes del diagnóstico de gripe	1,31 (0,97-1,78)	0,07

Tabla 4: Análisis univariable de factores de riesgo para mortalidad a los 30 días.

	Muertos N =22 (%)	Vivos N =9 (%)	p
Características demográficas			
Edad (años) (media; 95%IC)	66.5; 57.7-75,5	54, 43-62	0,09
Hombres	15 (68,2)	5 (55,6)	0,68
Enfermedades subyacentes			
EPOC	9 (40,9)	5 (55,6)	0,69
Inmunosupresión	4 (18,2)	1 (11,1)	1
Estado vacunación gripe	5 (22,7)	2 (22,2)	1
Charlson (media; 95%IC)	6; 2-8	5; 3,5-6,5	0,65
Tipo de UCI			
Medica	13 (59,1)	8 (88,9)	0,2
Quirúrgica	9 (40,9)	1 (11,1)	
Motivo de ingreso en UCI			
Insuficiencia respiratoria aguda	7 (31,8)	7 (77,8)	0,08
Cirugía	9 (40,9)	1 (11,1)	

Fallo cardiaco	4 (18,2)	0	
Otros	2 (9,1)	1 (11,1)	
APACHE II score	14,5; 11-16,2	16; 13-19,5	0,22
Características de la gripe			
Días de síntomas antes del diagnóstico (mediana; IQR).	3,5; 0-9	3; 1,5-5	0,87
Días de estancia en UCI antes del diagnóstico	1; 0-14,5	1; 0-3	0,26
Gripe no sospechada	12 (54,5)	3 (33,3)	0,43
Adquisición nosocomial	12 (54,5)	1 (11,1)	0,04
Fiebre	15 (68,2)	7 (77,8)	0,68
Tos	14 (63,3)	9 (100)	0,07
Disnea	15 (68,2)	9 (100)	0,07
Infiltrado localizado en placa de tórax	4 (18,2)	3 (33,3)	0,64
Carga viral al diagnóstico	1,5; 0,3-2,4	1,8; 0,8-5,5	0,40
Neumonía	15 (68,2)	8 (88,9)	0,38
Coinfección	6 (27,3)	2 (22,2)	1

*Días de síntomas antes de confirmar el diagnóstico de gripe.

Nota: **EPOC** enfermedad pulmonar obstructiva crónica; **SDRA** síndrome de distress respiratorio agudo; **IC** intervalo de confianza; **UCI** unidad de cuidados intensivos; **IQR** rango intercuartilico; **EVP** excreción viral prolongada

6.3. Discusión:

El presente estudio demuestra que durante la temporada de gripe post-pandémica en casi un tercio de los pacientes ingresados en UCIs de adultos con sospecha de infección del tracto respiratorio el virus de la gripe fue el agente etiológico implicado. La gripe no fue sospechada en un 48,4% de los pacientes y en el 39,3% fue adquirida en el hospital. Los pacientes con gripe no sospechada fueron frecuentemente pacientes quirúrgicos, que presentaban un infiltrado localizado en la placa de tórax, y con un ingreso largo previo al diagnóstico de la gripe. En los pacientes con gripe no sospechada el tratamiento antiviral se administró tarde, sin embargo, la mortalidad fue similar en ambos grupos. La mortalidad global a los 30 días fue elevada (29%), siendo menor en los pacientes con gripe nosocomial. El único factor independientemente asociado a mala evolución fue la insuficiencia respiratoria aguda como causa del ingreso en UCI.

La enfermedad respiratoria febril aguda es una causa frecuente de insuficiencia respiratoria e ingreso en UCI (241, 242). En la mayoría de estos casos la etiología es bacteriana y los virus se encuentran implicados en un bajo número de casos, aproximadamente en un 9% (243). Durante la pandemia de 2009, la tasa de ingreso en UCI por insuficiencia respiratoria en pacientes hospitalizados con diagnóstico confirmado de gripe A (H1N1)v osciló entre el 15% y el 34% (96, 244-247). Desafortunadamente, no existen estudios que hayan investigado las tasas de etiologías bacterianas y virales de los pacientes ingresados en la UCI por insuficiencia respiratoria durante la pandemia de 2009. En el presente estudio demostramos que durante la temporada de gripe 2010-2011, el 31,4% de los pacientes ingresados en la UCI con sospecha de infección del TRI tenían una etiología viral y en la mayoría de ellos (93,3%) se identificó el virus de la gripe como agente etiológico.

La etiología de la enfermedad respiratoria febril aguda que causa insuficiencia respiratoria aguda a menudo se desconoce en el momento del ingreso en UCI (243). Aproximadamente la mitad de los casos son diagnosticados de neumonía bacteriana poco tiempo después del ingreso, con una baja proporción de casos diagnosticados de neumonía viral después de que los estudios iniciales para bacterias sean negativos (237). La sospecha de la gripe se basa fundamentalmente en los factores de riesgo epidemiológicos y la sospecha clínica. La combinación de fiebre, malestar general, y tos tienen valor predictivo positivo del 79% durante una pandémica o bien durante la época gripal, (154, 248). Sin embargo, estos criterios probablemente no son tan específicos en los pacientes ingresados en la UCI debido a que otras etiologías o condiciones, como la sedación post-quirúrgica, pueden confundir el diagnóstico. En nuestro estudio, el 48,4% de los casos de gripe no fueron sospechados sino que se detectaron como parte de una búsqueda sistemática. La sospecha de gripe fue menor en pacientes de edad avanzada, ingresados en UCI por motivos quirúrgicos, con una estancia hospitalaria larga, y que no presentaban tos ni infiltrados pulmonares difusos. Como consecuencia directa de ésta infraestimación, se produjo un retraso significativo en el inicio del tratamiento antiviral.

La carga viral tendió a ser mayor en los pacientes con sospecha de gripe, posiblemente como resultado de un diagnóstico precoz después de la aparición de los síntomas en este grupo comparado con gripe no sospechada.

La gripe de adquisición nosocomial es un problema bien reconocido (249, 250). Se han documentado brotes nosocomiales en varios escenarios, incluyendo UCIs, salas de pediatría, unidades de trasplante, plantas médicas y quirúrgicas (249-253). Sin embargo, pocos casos esporádicos de gripe nosocomial se han descrito durante programas de vigilancia. En un estudio, que incluye 1.520 pacientes hospitalizados en

75 hospitales en los EE.UU durante la pandemia de 2009, los autores identificaron 30 (2%) casos esporádicos de gripe nosocomial (254). La mayoría de los pacientes tenían enfermedades subyacentes graves y fueron ingresados en áreas no médicas, como ocurre en nuestro estudio. Inesperadamente, en el presente estudio, encontramos que la mortalidad a los 30 días fue menor en los pacientes con gripe nosocomial. Esto podría justificarse por una menor virulencia de las cepas de gripe circulantes en el hospital, o por factores del huésped, como la edad o las condiciones quirúrgicas. En general, la mortalidad a 30 días fue elevada (29%) siendo el ingreso en UCI por insuficiencia respiratoria grave un factor de riesgo independiente de mortalidad. Estos datos son consistentes con los de Martin-Loeches et al. (255), que mostraron que los pacientes con gripe durante la temporada post-pandémica tenían una tasa de mortalidad inesperadamente alta.

La administración precoz de la terapia antiviral se ha asociado con una mejor evolución en pacientes críticos (256). En nuestro estudio, aunque el tiempo desde el inicio de los síntomas hasta el inicio del tratamiento antiviral fue mayor entre los pacientes con gripe no sospechada, la mortalidad tendió a ser menor en este grupo en comparación con los pacientes en los que la gripe fue sospechada. Una posible explicación a esta hecho podría ser que los grupos comparados fueron epidemiológicamente muy diferentes. Por otro lado, la mediana de la carga viral relativa fue menor en el grupo de gripe no sospechada. Estos factores epidemiológicos y virales podrían influir en la evolución de los dos grupos, independientemente del tiempo para el inicio del tratamiento antiviral.

Nuestro estudio está limitado por el pequeño número y heterogeneidad de los pacientes incluidos en el estudio, lo cual disminuye el poder estadístico de nuestro análisis. Debido a que el estudio se realizó durante la temporada post-pandémica

período (2010-2011), periodo durante el cual la prevalencia de la cepa (H1N1)v seguía siendo elevada, nuestros datos no pueden extrapolarse a pacientes infectados por otras cepas del virus de la gripe. No pudimos realizar un análisis de las posibles vías de transmisión de los casos nosocomiales. Sin embargo, podemos excluir con certeza suficiente la existencia de un foco por las siguientes razones: (a) los casos de gripe adquirida en el hospital se distribuyeron entre las tres unidades de cuidados intensivos (UCI médica, UCI post-quirúrgica, y UCI cardiovascular), (b) no se identificó ningún caso de gripe entre el personal sanitario de estas unidades, (c) se aplicaron medidas de prevención que incluían la vacunación del personal y el aislamiento respiratorio y de contacto según lo recomendado por los CDC (196).

7. ESTUDIO 4:

ESTUDIO COMPARATIVO DE EXUDADO NASOFARINGEO VS. ASPIRADO TRAQUEAL EN EL DIAGNOSTICO DE LA GRIPE EN PACIENTES INGRESADOS EN UCIS

7.1. Material y Métodos:

Diseño:

Desde el 15 de diciembre de 2010 hasta el 28 de febrero 2011, realizamos un estudio prospectivo comparativo de muestras pareadas (exudado nasofaríngeo vs. Aspirado traqueal) en pacientes adultos ingresados en UCIs de nuestra institución con sospecha de infección del TRI.

Procesamiento de las muestras:

Las muestras de exudado nasofaríngeo (ENF) se conservaron como se describe en la sección de material y métodos del estudio 1.

Las muestras de AT para el diagnóstico microbiológico fueron tomadas por aspiración endotraqueal usando una sonda estéril 14F a una profundidad de 2 cm del extremo distal del tubo endotraqueal. Las secreciones obtenidas fueron transportadas en un recipiente estéril (contenedor de muestras Lukens, Sherwood Medical, Tullamore, Irlanda) hasta el laboratorio de microbiología. Una vez en laboratorio, la muestra se dividió en dos alícuotas de 200 µl; una para la detección de virus y otra para la realización de los procedimientos de bacterias habituales. La alícuota reservada para la detección de gripe se conservó en medio de transporte viral (305C Copán, Copán Innovación, Brescia, Italia) a 4 ° C durante no más de 48 horas o a -80 ° C si el análisis se realizaba pasadas las 48 horas.

Detección del virus de la gripe:

El ARN viral se extrajo de una alícuota de 200 µl, eluidos en 60 µl de solución de tampón, en un robot Nuclisens easyMAG (bioMérieux, Boxtel, Países Bajos) siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada extracción se añadió una muestra de agua como control negativo para detectar posible contaminaciones cruzadas.

El virus de la gripe A (H1N1) de fue detectado mediante RT-PCR utilizando el kit RealTime ready A/H1N1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El virus de la gripe B fue detectado mediante el kit RealTime Influenza B (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los virus de la gripe estacionales H3N2 y H1N1 fueron detectados como se describe en la siguiente referencia (240)

Cuantificación relativa:

La cuantificación relativa se realizó mediante qRT-PCR como se ha descrito en secciones anteriores.

Análisis estadístico:

Se calcularon los resultados globales y los valores de validez de NTS y EA para la detección de la gripe mediante RT-PCR. Estos valores se calcularon con un intervalo de confianza del 95% siguiendo una distribución binomial exacta. La sensibilidad NTS y EA se compararon mediante una prueba McNemar para datos apareados. Los valores predictivos negativos se compararon mediante una prueba de Fisher. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa a n valor de $P < 0,05$. Los valores cuantitativos de ambos tipos de muestra se compararon mediante regresión pasa-Bablok (257). La pendiente pasa-Bablok (B) se calculó con su intervalo de confianza del 95%, un valor de 1 indicaba que no había diferencia entre los valores

de NTS y EA. Los datos fueron analizados con el programa SPSS, versión 15.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, EE.UU.).

7.2. Resultados:

Durante el período de estudio, ingresaron 618 pacientes en UCIs de adultos de nuestra institución. Uno o más AT de 105 pacientes fueron enviados al laboratorio por sospecha de infección del TRI. Pudimos obtener muestras pareadas en 52 de los 105 pacientes.

En 22 de los 52 pacientes detectamos ARN viral en alguna de los dos tipos de muestras. Catorce ENF (63,6%) y 22 AT (90,9%) fueron positivos, distribuyéndose de la siguiente manera (ver tabla 1):

- En ambos especímenes: 12/22 pacientes
- Sólo en el exudado nasofaríngeo: 2/22 pacientes
- Solo en AT: 8/22 pacientes

Todos los virus detectados fueron A (H1N1) de 2009 la pandemia de gripe A H1N1, excepto uno que fue influenza del tipo B.

Tabla 1: Resultados globales y valores de validez (sensibilidad y valor predictivo negativo) de los dos tipos de muestra para la detección de gripe mediante RT-PCR.

		Pacientes con gripe (n=22)	Pacientes sin gripe (n=31)	Sensibilidad(%)	VPN
ENF	RT-PCR positiva	14	0	63,6 (40,7-82,8)	79,5 (63,5-90,7)
	RT-PCR negativa	8	31		
AT	RT-PCR positiva	20	0	90,9 (70,8-98,9)	93,9 (79,8-99,2)
	RT-PCR negativa	2	31		
P				0,109	0,097

VPN: valor predictivo negativo

Las características principales de los 22 pacientes con gripe se muestran en la Tabla 2. La mediana de edad fue de 36 años (IQR = 31 a 52). La comorbilidad más frecuentemente observada fue la agudización de EPOC (4/32 pacientes). El 18% de los pacientes estaban inmunodeprimidos al ingreso en la UCI. Diecisiete pacientes (77,3%) presentaron neumonitis viral y 5 (22,7%) tuvieron coinfección. Nueve pacientes (45%) recibieron tratamiento empírico inicial. La duración media de la enfermedad antes de la confirmación de la gripe fue 7,2 días (IQR = 0 a 29).

Tabla 2: Características de los pacientes con gripe.

	N=22 (%)
Datos demográficos	
Edad (años) (mediana; IQR)	58,5; 22-83
Hombre, n (%)	14 (73,6)
Enfermedades de base	
EPOC	10 (45,5)
Inmunodepresión	4 (18,2)
Índice de comorbilidad de charlson (mediana)	4.95
Característica del cuadro gripal	
Solo infección del TRS	0
Solo neumonía viral	17 (77,3)
Gripe e infección bacteriana (co-infección)	5 (22,7)
Días de síntomas antes del diagnóstico*	7,2; 0-29
Tratamiento antiviral	20 (90,9)
Tratamiento antiviral empírico	9 (45)
Días de tratamiento antes del diagnóstico*	2,1; 1-5

*Variables expresadas como mediana e IQR

TRS: tracto respiratorio superior

La mediana de la carga relativa en AT y ENF fue, respectivamente; 3,55 y 0,55 uqr. La carga viral en AT fue 3,75 veces mayor que la carga viral en muestras de ENF (prueba de pasa-Bablok; 3,75). Los valores obtenidos en la comparación de la carga viral relativa para las muestras pareadas se representan en la tabla 3.

Tabla 3: Comparación de la carga viral relativa para las muestras pareadas

Número de paciente	CVr AT (A)	CVr ENF (B)	ratio A/B
1	18,32	53,23	0,344
2	47,12	12,57	3,749
3	5,57	2,75	2,025
4	8,59	0,05	171,800
5	0,11	1,66	0,066
6	0,09	0,01	9,000
7	24,6	0,4	61,500
8	0,12	0,04	3,000
9	0,02	0,01	2,000
10	0,6	0,02	30,000
11	1,54	0,58	2,655
12	7,3	0,5	14,6
Median (IQR)	3,55 (0,11-15,89)	0,45 (0,03-2,48)	3,37 (2,01-26,15)
Valor estimado central	-	-	3,75
(Passing-Bablok test)			(1,82-63,16)
(95%CI)			

CVr: carga viral relativa

7.3. Discusión:

El presente estudio demuestra que la detección de ARN viral del virus de la gripe mediante RT-PCR es más eficiente en AT que en ENF, probablemente debido a la mayor carga viral presente en las muestras de AT.

La gripe es una causa frecuente de ingreso en UCIs durante las epidemias estacionales. También puede ser de adquisición nosocomial complicando otros procesos propios del paciente crítico (241, 258) (242). La detección rápida y eficaz de la gripe en estos pacientes es crucial para la rápida iniciación de la terapia antiviral y el aislamiento de los pacientes infectados (154, 259). El ENF se considera la muestra de elección para la detección de gripe en pacientes no intubados, aunque la mayoría de los datos son de pacientes pediátricos y se basan en el cultivo viral como método de referencia (260). La mayoría de los pacientes ingresados en UCIs están intubados, por lo tanto, los AT son muestras de fácil obtención que además se extraen de forma rutinaria. Los datos que comparan el rendimiento del ENF y el AT para la detección de gripe en adultos usando RT-PCR son escasos. Rello et al. (261) describen un 10% de resultados falsos negativos de la RT-PCR para la detección de gripe A (H1N1)v en ENF en pacientes ingresados en la UCI. Sin embargo, en este estudio las muestras no son analizadas en paralelo, y la carga viral no fue cuantificada. Por lo tanto, no es posible saber si los falsos negativos eran debidos a una baja carga viral, a una incorrecta toma de la muestra, manejo inapropiado, retraso en el transporte al laboratorio, o razones técnicas relacionadas con la RT-PCR (262). Otros autores han descrito casos puntuales o pequeñas series que muestran falsos negativos de la RT-PCR en ENF de pacientes con infección del tracto respiratorio inferior, aunque, una vez más, las muestras no fueron tomadas simultáneamente (122)

En el presente estudio, comparamos dos tipos de muestra (ENF y AT) recogidos de forma simultánea del mismo paciente. Nuestros datos demuestran que el AT es más sensible que el ENF (90,9% frente a 63,6%) para la detección mediante RT-PCR de gripe pandémica A (H1N1)v. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el 10% de los casos puede pasar desapercibidos si sólo se analizan muestras de AT. Según esto, nuestra recomendación para el diagnóstico de gripe, en pacientes intubados, es tomar AT, pero incluir además, siempre que sea posible, un ENF, a fin de no perder ningún caso. La explicación de esta diferencia en el rendimiento de ambos especímenes podría ser la presencia de mayor carga viral en las secreciones del tracto respiratorio inferior. En un modelo experimental de infectividad por el virus de la gripe A (H1N1) de 2009 en hurones, Munster et al. (263) demostraron que la replicación viral es más eficiente en la tráquea, bronquios, bronquiolos que en el tracto respiratorio superior. En nuestros pacientes, la carga viral fue de 3,75 veces mayor en las muestras de AT.

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones como el pequeño número de pacientes analizados, lo cual disminuye el poder de nuestro análisis de datos. Además, sólo incluimos pacientes ingresados en UCI, intubados, con sospecha de infección del tracto respiratorio inferior durante la temporada post-pandemia (2010-2011), cuando la prevalencia de la influenza pandémica A H1N1 cepa seguía siendo elevada. Por lo tanto, no podemos estar seguros de que nuestros datos pueden extrapolarse a pacientes no ingresados en la UCI o infectados por virus de la gripe distintos al virus A (H1N1) de 2009.

8. CONCLUSIONES

1. La RT-PCR a tiempo real es un método rápido que presenta una elevada sensibilidad y especificidad para la detección del virus de la gripe A (H1N1)v en comparación con los métodos convencionales.
2. Tanto el cultivo convencional como en shell-vial siguen siendo métodos útiles, aunque más lentos, para la detección del virus de la gripe. Pueden ser una alternativa en algunos laboratorios pero teniendo en cuenta que en el contexto de una pandemia se requerirían pruebas adicionales para realizar el subtipado.
3. La línea celular A549, utilizada comúnmente en los laboratorios para el aislamiento de otros virus respiratorios, no es inferior a la línea MDCK en el cultivo de la gripe A (H1N1)v.
4. La excreción viral prolongada (EVP) es una complicación frecuente en los pacientes hospitalizados con gripe pandémica. Se observa más frecuentemente en pacientes inmunodeprimidos y que requieren ventilación mecánica.
5. Las recomendaciones futuras relativas a los períodos de aislamiento respiratorio en pacientes hospitalizados con gripe deberían considerar la frecuencia y las consecuencias de este fenómeno de EVP.
6. Los pacientes con EVP presentan una estancia hospitalaria más larga y peor evolución.
7. El estudio del aclaramiento viral puede ser una herramienta diagnóstica de utilidad en la identificación de pacientes con mal pronóstico.

8. La gripe es una causa común de enfermedad respiratoria aguda en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos durante la epidemia estacional que a menudo no es sospechada. Esto se asocia a un retraso en el inicio del tratamiento antiviral que puede favorecer la transmisión nosocomial de la gripe.
9. Para evitar este infradiagnóstico y sus consecuencias sería recomendable hacer una búsqueda sistemática de gripe en muestras respiratorias obtenidas de pacientes ingresados en UCI con sospecha de infección del tracto respiratorio inferior durante la epidemia estacional.
10. Los aspirados traqueales, que son muestras rutinarias y de fácil obtención en pacientes intubados, son más eficientes en la detección del virus de la gripe que los exudados nasofaríngeos. Sin embargo, para un diagnóstico óptimo se deberían analizar ambas muestras.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. LaForce FM, Nichol KL, Cox NJ. Influenza: virology, epidemiology, disease, and prevention. *Am J Prev Med.* 1994;10 Suppl:31-44.
2. Stephenson I, Zambon M. The epidemiology of influenza. *Occup Med (Lond).* 2002 Aug;52(5):241-7.
3. Langmuir AD, Worthen TD, Solomon J, Ray CG, Petersen E. The Thucydides syndrome. A new hypothesis for the cause of the plague of Athens. *N Engl J Med.* 1985 Oct 17;313(16):1027-30.
4. Cunha BA. Influenza: historical aspects of epidemics and pandemics. *Infect Dis Clin North Am.* 2004 Mar;18(1):141-55.
5. Francis T, Jr. A New Type of Virus from Epidemic Influenza. *Science.* 1940 Nov 1;92(2392):405-8.
6. Taylor RM. A further note on 1233 influenza C virus. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1951;4(4):485-500.
7. Oxford JS. Influenza A pandemics of the 20th century with special reference to 1918: virology, pathology and epidemiology. *Rev Med Virol.* 2000 Mar-Apr;10(2):119-33.
8. Taubenberger JK, Kash JC. Insights on influenza pathogenesis from the grave. *Virus Res.* 2011 Sep 10.

9. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Solorzano A, Swayne DE, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science*. 2005 Oct 7;310(5745):77-80.
10. Zimmer SM, Burke DS. Historical perspective--Emergence of influenza A (H1N1) viruses. *N Engl J Med*. 2009 Jul 16;361(3):279-85.
11. Wilson IH. Influenza, 1918. *BMJ*. 2005 Dec 24;331(7531):1536.
12. Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu Rev Med*. 2000;51:407-21.
13. Taubenberger JK. The origin and virulence of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Proc Am Philos Soc*. 2006 Mar;150(1):86-112.
14. Luk J, Gross P, Thompson WW. Observations on mortality during the 1918 influenza pandemic. *Clin Infect Dis*. 2001 Oct 15;33(8):1375-8.
15. Martin CM, Kunin CM, Gottlieb LS, Finland M. Asian influenza A in Boston, 1957-1958. II. Severe staphylococcal pneumonia complicating influenza. *AMA Arch Intern Med*. 1959 Apr;103(4):532-42.
16. Baine WB, Luby JP, Martin SM. Severe illness with influenza B. *Am J Med*. 1980 Feb;68(2):181-9.

17. Nakajima K, Nobusawa E, Nakajima S. Genetic relatedness between A/Swine/Iowa/15/30(H1N1) and human influenza viruses. *Virology*. 1984 Nov;139(1):194-8.
18. Scholtissek C, Rohde W, Von Hoyningen V, Rott R. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology*. 1978 Jun 1;87(1):13-20.
19. Webster RG, Sharp GB, Claas EC. Interspecies transmission of influenza viruses. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Oct;152(4 Pt 2):S25-30.
20. Luria DB, Blumenfeld HL, Ellis JT, Kilbourne ED, Rogers DE. Studies on influenza in the pandemic of 1957-1958. II. Pulmonary complications of influenza. *J Clin Invest*. 1959 Jan;38(1 Part 2):213-65.
21. Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis*. 2006 Jan;12(1):9-14.
22. Finkelman BS, Viboud C, Koelle K, Ferrari MJ, Bharti N, Grenfell BT. Global patterns in seasonal activity of influenza A/H3N2, A/H1N1, and B from 1997 to 2005: viral coexistence and latitudinal gradients. *PLoS One*. 2007;2(12):e1296.
23. Yuen KY, Chan PK, Peiris M, Tsang DN, Que TL, Shortridge KF, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet*. 1998 Feb 14;351(9101):467-71.

24. Katz JM, Lim W, Bridges CB, Rowe T, Hu-Primmer J, Lu X, et al. Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts. *J Infect Dis.* 1999 Dec;180(6):1763-70.
25. Bender C, Hall H, Huang J, Klimov A, Cox N, Hay A, et al. Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997-1998. *Virology.* 1999 Feb 1;254(1):115-23.
26. Bridges CB, Lim W, Hu-Primmer J, Sims L, Fukuda K, Mak KH, et al. Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997-1998. *J Infect Dis.* 2002 Apr 15;185(8):1005-10.
27. Peiris JS, Yu WC, Leung CW, Cheung CY, Ng WF, Nicholls JM, et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet.* 2004 Feb 21;363(9409):617-9.
28. Calza L, Manfredi R, Chiodo F. [H5N1 avian influenza]. *Recenti Prog Med.* 2005 Nov;96(11):523-34.
29. Chan PK. Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis.* 2002 May 1;34 Suppl 2:S58-64.
30. Kluska V, Macku M, Mensik J. [Demonstration of antibodies against swine influenza viruses in man.]. *Cesk Pediatr.* 1961 May;16:408-14.

31. Smith TF, Burgert EO, Jr., Dowdle WR, Noble GR, Campbell RJ, Van Scoy RE. Isolation of swine influenza virus from autopsy lung tissue of man. *N Engl J Med.* 1976 Mar 25;294(13):708-10.
32. Nardelli L, Pascucci S, Gualandi GL, Loda P. Outbreaks of classical swine influenza in Italy in 1976. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1978 Dec;25(10):853-7.
33. Pensaert M, Ottis K, Vandeputte J, Kaplan MM, Bachmann PA. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducts to swine and its potential importance for man. *Bull World Health Organ.* 1981;59(1):75-8.
34. Vincent AL, Lager KM, Ma W, Lekcharoensuk P, Gramer MR, Loiacono C, et al. Evaluation of hemagglutinin subtype 1 swine influenza viruses from the United States. *Vet Microbiol.* 2006 Dec 20;118(3-4):212-22.
35. Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, Shu B, Balish A, Xu X, et al. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med.* 2009 Jun 18;360(25):2616-25.
36. Newman AP, Reisdorf E, Beinemann J, Uyeki TM, Balish A, Shu B, et al. Human case of swine influenza A (H1N1) triple reassortant virus infection, Wisconsin. *Emerg Infect Dis.* 2008 Sep;14(9):1470-2.
37. (OMS) OMdIS. Informes de situación.
<http://www.who.int/csr/disease/swineflu/updates/en/index.html>. 2009.

38. (CDC) CfDCaP. Notes from the field: Outbreak of influenza A (H3N2) virus among persons and swine at a county fair--Indiana, July 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012 Jul 27;61(29):561.
39. (CDC) CfDCaP. Update: Influenza A (H3N2)v transmission and guidelines - five states, 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012 Jan 6;60(51-52):1741-4.
40. (CDC) CfDCaP. CDC reports cases 18-29 of H3N2v virus infection; continues to recommend interim precautions when interacting with pigs.
41. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol.* 2005 Mar;79(5):2814-22.
42. Gonzalez-Nicolas MTC. Gripe pandémica AH1N1. Experiencia de la red de laboratorio de gripe del sistema de vigilancia de la gripe en España. *Revista Española de Salud Pública*2010. p. 481-95.
43. Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature.* 1981 Jan 29;289(5796):366-73.
44. Wiley DC, Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:365-94.

45. Gong J, Xu W, Zhang J. Structure and functions of influenza virus neuraminidase. *Curr Med Chem*. 2007;14(1):113-22.
46. Cady SD, Luo W, Hu F, Hong M. Structure and function of the influenza A M2 proton channel. *Biochemistry*. 2009 Aug 11;48(31):7356-64.
47. Couch RB, Kasel JA. Immunity to influenza in man. *Annu Rev Microbiol*. 1983;37:529-49.
48. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009 Jul 10;325(5937):197-201.
49. Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. 2009 Jun 25;459(7250):1122-5.
50. Pan C, Cheung B, Tan S, Li C, Li L, Liu S, et al. Genomic signature and mutation trend analysis of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus. *PLoS One*. 2010;5(3):e9549.
51. Glinsky GV. Genomic analysis of pandemic (H1N1) 2009 reveals association of increasing disease severity with emergence of novel hemagglutinin mutations. *Cell Cycle*. 2010 Mar 1;9(5):958-70.

52. Cannell JJ, Zaslloff M, Garland CF, Scragg R, Giovannucci E. On the epidemiology of influenza. *Virology*. 2008;5:29.
53. Monto AS. Epidemiology of influenza. *Vaccine*. 2008 Sep 12;26 Suppl 4:D45-8.
54. Neuzil KM, Reed GW, Mitchel EF, Jr., Griffin MR. Influenza-associated morbidity and mortality in young and middle-aged women. *JAMA*. 1999 Mar 10;281(10):901-7.
55. Glezen WP. Emerging infections: pandemic influenza. *Epidemiol Rev*. 1996;18(1):64-76.
56. CDC. Human infection with new influenza A (H1N1) virus: Mexico, update, March-May 2009. *Wkly Epidemiol Rec*. 2009 Jun 5;84(23):213-9.
57. CDC. Update: influenza activity--United States, April-August 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009 Sep 18;58(36):1009-12.
58. OMS. New influenza A(H1N1) virus infections: global surveillance summary, May 2009. *Wkly Epidemiol Rec*. 2009 May 15;84(20):173-9.
59. Cámara AL. Vigilancia de la pandemia de gripe H1N1 2009 en España. *Revista Española de Salud Pública*. 2010;84(5):569-88.
60. Larrauri Camara A, Jimenez-Jorge S, Simon Mendez L, de Mateo Ontanon S. [Surveillance of influenza pandemic (H1N1)2009 in Spain]. *Rev Esp Salud Publica*. 2010 Sep-Oct;84(5):569-88.

61. Miller E, Hoschler K, Hardelid P, Stanford E, Andrews N, Zambon M. Incidence of 2009 pandemic influenza A H1N1 infection in England: a cross-sectional serological study. *Lancet*. 2010 Mar 27;375(9720):1100-8.
62. Zhang SX. [Epidemiological review on novel influenza A (H1N1)virus infection.]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2009 Nov;30(11):1125-30.
63. Blachere FM, Lindsley WG, Pearce TA, Anderson SE, Fisher M, Khakoo R, et al. Measurement of airborne influenza virus in a hospital emergency department. *Clin Infect Dis*. 2009 Feb 15;48(4):438-40.
64. Mubareka S, Lowen AC, Steel J, Coates AL, Garcia-Sastre A, Palese P. Transmission of influenza virus via aerosols and fomites in the guinea pig model. *J Infect Dis*. 2009 Mar 15;199(6):858-65.
65. Wong BC, Lee N, Li Y, Chan PK, Qiu H, Luo Z, et al. Possible role of aerosol transmission in a hospital outbreak of influenza. *Clin Infect Dis*. 2010 Nov 15;51(10):1176-83.
66. Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *Lancet*. 1999 Oct 9;354(9186):1277-82.
67. Bell DM. Non-pharmaceutical interventions for pandemic influenza, international measures. *Emerg Infect Dis*. 2006 Jan;12(1):81-7.

68. Carrat F, Vergu E, Ferguson NM, Lemaitre M, Cauchemez S, Leach S, et al. Time lines of infection and disease in human influenza: a review of volunteer challenge studies. *Am J Epidemiol.* 2008 Apr 1;167(7):775-85.
69. Leekha S, Zitterkopf NL, Espy MJ, Smith TF, Thompson RL, Sampathkumar P. Duration of influenza A virus shedding in hospitalized patients and implications for infection control. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007 Sep;28(9):1071-6.
70. Lee N, Chan PK, Hui DS, Rainer TH, Wong E, Choi KW, et al. Viral loads and duration of viral shedding in adult patients hospitalized with influenza. *J Infect Dis.* 2009 Aug 15;200(4):492-500.
71. Klimov AI, Rocha E, Hayden FG, Shult PA, Roumillat LF, Cox NJ. Prolonged shedding of amantadine-resistant influenzae A viruses by immunodeficient patients: detection by polymerase chain reaction-restriction analysis. *J Infect Dis.* 1995 Nov;172(5):1352-5.
72. Nichols WG, Guthrie KA, Corey L, Boeckh M. Influenza infections after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, mortality, and the effect of antiviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2004 Nov 1;39(9):1300-6.
73. Hu JJ, Kao CL, Lee PI, Chen CM, Lee CY, Lu CY, et al. Clinical features of influenza A and B in children and association with myositis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2004 Apr;37(2):95-8.

74. Hall WJ, Douglas RG, Jr., Hyde RW, Roth FK, Cross AS, Speers DM. Pulmonary mechanics after uncomplicated influenza A infection. *Am Rev Respir Dis.* 1976 Feb;113(2):141-8.
75. Ho YC, Wang JL, Wang JT, Wu UI, Chang CW, Wu HS, et al. Prognostic factors for fatal adult influenza pneumonia. *J Infect.* 2009 Jun;58(6):439-45.
76. Nicholson KG. Clinical features of influenza. *Semin Respir Infect.* 1992 Mar;7(1):26-37.
77. Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper SA, Shaw M, Uyeki TM, et al. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med.* 2010 May 6;362(18):1708-19.
78. Rello J, Pop-Vicas A. Clinical review: primary influenza viral pneumonia. *Crit Care.* 2009;13(6):235.
79. Song JY, Cheong HJ, Heo JY, Noh JY, Yong HS, Kim YK, et al. Clinical, laboratory and radiologic characteristics of 2009 pandemic influenza A/H1N1 pneumonia: primary influenza pneumonia versus concomitant/secondary bacterial pneumonia. *Influenza Other Respi Viruses.* 2011 Nov;5(6):e535-43.
80. Muller NL FT, Lee KS, Silva CIS, editor. *Imaging of Pulmonary Infections.* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007.

81. Simonsen L. The global impact of influenza on morbidity and mortality. *Vaccine*. 1999 Jul 30;17 Suppl 1:S3-10.
82. Schwarzmann SW, Adler JL, Sullivan RJ, Jr., Marine WM. Bacterial pneumonia during the Hong Kong influenza epidemic of 1968-1969. *Arch Intern Med*. 1971 Jun;127(6):1037-41.
83. Dietzman DE, Schaller JG, Ray CG, Reed ME. Acute myositis associated with influenza B infection. *Pediatrics*. 1976 Feb;57(2):255-8.
84. Dell KM, Schulman SL. Rhabdomyolysis and acute renal failure in a child with influenza A infection. *Pediatr Nephrol*. 1997 Jun;11(3):363-5.
85. Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, Wadford DA, Pappas C, Zeng H, et al. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science*. 2009 Jul 24;325(5939):484-7.
86. Temte JL. Basic rules of influenza: how to combat the H1N1 influenza (swine flu) virus. *Am Fam Physician*. 2009 Jun 1;79(11):938-9.
87. Weinstock DM, Gubareva LV, Zuccotti G. Prolonged shedding of multidrug-resistant influenza A virus in an immunocompromised patient. *N Engl J Med*. 2003 Feb 27;348(9):867-8.

88. Cheng VC, To KK, Tse H, Hung IF, Yuen KY. Two years after pandemic influenza A/2009/H1N1: what have we learned? *Clin Microbiol Rev.* 2012 Apr;25(2):223-63.
89. Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med.* 2009 Jun 18;360(25):2605-15.
90. Belongia EA, Irving SA, Waring SC, Coleman LA, Meece JK, Vandermause M, et al. Clinical characteristics and 30-day outcomes for influenza A 2009 (H1N1), 2008-2009 (H1N1), and 2007-2008 (H3N2) infections. *JAMA.* 2010 Sep 8;304(10):1091-8.
91. Prevention USfDcCa. 2009 H1N1 influenza vaccine and pregnant women: information for healthcare providers 2011.
92. Lee N, Chan PK, Lui GC, Wong BC, Sin WW, Choi KW, et al. Complications and outcomes of pandemic 2009 Influenza A (H1N1) virus infection in hospitalized adults: how do they differ from those in seasonal influenza? *J Infect Dis.* 2011 Jun 15;203(12):1739-47.
93. Cao B, Li XW, Mao Y, Wang J, Lu HZ, Chen YS, et al. Clinical features of the initial cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in China. *N Engl J Med.* 2009 Dec 24;361(26):2507-17.
94. Crum-Cianflone NF, Blair PJ, Faix D, Arnold J, Echols S, Sherman SS, et al. Clinical and epidemiologic characteristics of an outbreak of novel H1N1 (swine origin)

influenza A virus among United States military beneficiaries. *Clin Infect Dis*. 2009 Dec 15;49(12):1801-10.

95. Castilla J, Moran J, Fernandez-Alonso M, Martinez Artola V, Zamora MJ, Mazon A, et al. [The 2009 H1N1 flu pandemic in Navarre, Spain]. *An Sist Sanit Navar*. 2010 Sep-Dec;33(3):287-95.

96. Jain S, Kamimoto L, Bramley AM, Schmitz AM, Benoit SR, Louie J, et al. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. *N Engl J Med*. 2009 Nov 12;361(20):1935-44.

97. Louie JK, Jamieson DJ, Rasmussen SA. 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in postpartum women in California. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Feb;204(2):144 e1-6.

98. Siston AM, Rasmussen SA, Honein MA, Fry AM, Seib K, Callaghan WM, et al. Pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus illness among pregnant women in the United States. *JAMA*. 2010 Apr 21;303(15):1517-25.

99. Jamieson DJ, Honein MA, Rasmussen SA, Williams JL, Swerdlow DL, Biggerstaff MS, et al. H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. *Lancet*. 2009 Aug 8;374(9688):451-8.

100. Libster R, Bugna J, Coviello S, Hijano DR, Dunaiewsky M, Reynoso N, et al. Pediatric hospitalizations associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Argentina. *N Engl J Med*. 2010 Jan 7;362(1):45-55.

101. Prevention USCFDCa. Recommendations for use of antiviral medications for the management of influenza in children and adolescents for the 2009-2010 season - pediatric supplement for healthcare providers 2009: Available from: http://www.cdc.gov/h1n1flu/recommendations_pediatric_supplement.htm.
102. Perez-Padilla R, de la Rosa-Zamboni D, Ponce de Leon S, Hernandez M, Quinones-Falconi F, Bautista E, et al. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med*. 2009 Aug 13;361(7):680-9.
103. Viasus D, Pano-Pardo JR, Pachon J, Riera M, Lopez-Medrano F, Payeras A, et al. Pneumonia complicating pandemic (H1N1) 2009: risk factors, clinical features, and outcomes. *Medicine (Baltimore)*. 2011 Sep;90(5):328-36.
104. Webb SA, Pettila V, Seppelt I, Bellomo R, Bailey M, Cooper DJ, et al. Critical care services and 2009 H1N1 influenza in Australia and New Zealand. *N Engl J Med*. 2009 Nov 12;361(20):1925-34.
105. Palacios G, Hornig M, Cisterna D, Savji N, Bussetti AV, Kapoor V, et al. *Streptococcus pneumoniae* coinfection is correlated with the severity of H1N1 pandemic influenza. *PLoS One*. 2009;4(12):e8540.
106. Martin-Loeches I, Sanchez-Corral A, Diaz E, Granada RM, Zaragoza R, Villavicencio C, et al. Community-acquired respiratory coinfection in critically ill patients with pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus. *Chest*. 2011 Mar;139(3):555-62.

107. Noriega LM, Verdugo RJ, Araos R, Munita JM, Diaz V, Marcotti A, et al. Pandemic influenza A (H1N1) 2009 with neurological manifestations, a case series. *Influenza Other Respi Viruses*. 2010 May 1;4(3):117-20.
108. Webster RI, Hazelton B, Suleiman J, Macartney K, Kesson A, Dale RC. Severe encephalopathy with swine origin influenza A H1N1 infection in childhood: case reports. *Neurology*. 2010 Mar 30;74(13):1077-8.
109. Martin-Loeches I, Papiol E, Rodriguez A, Diaz E, Zaragoza R, Granada RM, et al. Acute kidney injury in critical ill patients affected by influenza A (H1N1) virus infection. *Crit Care*. 2011 Feb 22;15(1):R66.
110. Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J Infect Dis*. 2006 Nov 1;194 Suppl 2:S98-110.
111. Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):49-78.
112. Huang YT, Turchek BM. Mink lung cells and mixed mink lung and A549 cells for rapid detection of influenza virus and other respiratory viruses. *J Clin Microbiol*. 2000 Jan;38(1):422-3.
113. Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, Carroll KC. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J Clin Microbiol*. 2004 Jan;42(1):79-82.

114. Hayden RT, Wick MT, Rodriguez AB, Caliendo AM, Mitchell MJ, Ginocchio CC. A survey-based assessment of United States clinical laboratory response to the 2009 H1N1 influenza outbreak. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Nov;134(11):1671-8.
115. Ginocchio CC, Lotlikar M, Falk L, Arora S, Kowerska M, Bornfreund M, et al. Clinical performance of the 3M Rapid Detection Flu A+B Test compared to R-Mix culture, DFA and BinaxNOW Influenza A&B Test. *J Clin Virol*. 2009 Jun;45(2):146-9.
116. Ginocchio CC, 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 Jul;45(3):191-5.
117. Newton DW, Treanor JJ, Menegus MA. Clinical and laboratory diagnosis of influenza virus infections. *Am J Manag Care*. 2000 Mar;6(5 Suppl):S265-75.
118. Apisarnthanarak A, Mundy LM. Rapid testing for pandemic influenza A (H1N1): diagnostic test utility and specimen source. *Infect Control Hosp Epidemiol*. Jun;31(6):663-4.
119. Noyola DE, Paredes AJ, Clark B, Demmler GJ. Evaluation of a neuraminidase detection assay for the rapid detection of influenza A and B virus in children. *Pediatr Dev Pathol*. 2000 Mar-Apr;3(2):162-7.
120. Petrozzino JJ, Smith C, Atkinson MJ. Rapid diagnostic testing for seasonal influenza: an evidence-based review and comparison with unaided clinical diagnosis. *J Emerg Med*. Oct;39(4):476-90 e1.

121. Drexler JF, Helmer A, Kirberg H, Reber U, Panning M, Muller M, et al. Poor clinical sensitivity of rapid antigen test for influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis.* 2009 Oct;15(10):1662-4.
122. Faix DJ, Sherman SS, Waterman SH. Rapid-test sensitivity for novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med.* 2009 Aug 13;361(7):728-9.
123. Suntarattiwong P, Jarman RG, Levy J, Baggett HC, Gibbons RV, Chotpitayasunondh T, et al. Clinical performance of a rapid influenza test and comparison of nasal versus throat swabs to detect 2009 pandemic influenza A (H1N1) infection in Thai children. *Pediatr Infect Dis J.* 2010 Apr;29(4):366-7.
124. Vasoo S, Stevens J, Singh K. Rapid antigen tests for diagnosis of pandemic (Swine) influenza A/H1N1. *Clin Infect Dis.* 2009 Oct 1;49(7):1090-3.
125. Hurt AC, Baas C, Deng YM, Roberts S, Kelso A, Barr IG. Performance of influenza rapid point-of-care tests in the detection of swine lineage A(H1N1) influenza viruses. *Influenza Other Respi Viruses.* 2009 Jul;3(4):171-6.
126. Welch DF, Ginocchio CC. Role of rapid immunochromatographic antigen testing in diagnosis of influenza A virus 2009 H1N1 infection. *J Clin Microbiol.* 2010 Jan;48(1):22-5.
127. Andresen DN, Kesson AM. High sensitivity of a rapid immunochromatographic test for detection of influenza A virus 2009 H1N1 in nasopharyngeal aspirates from young children. *J Clin Microbiol.* 2010 Jul;48(7):2658-9.

128. Fouchier RA, Bestebroer TM, Herfst S, Van Der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol.* 2000 Nov;38(11):4096-101.
129. Ruest A, Michaud S, Deslandes S, Frost EH. Comparison of the Directigen flu A+B test, the QuickVue influenza test, and clinical case definition to viral culture and reverse transcription-PCR for rapid diagnosis of influenza virus infection. *J Clin Microbiol.* 2003 Aug;41(8):3487-93.
130. Hulson TD, Mold JW, Scheid D, Aaron M, Aspy CB, Ballard NL, et al. Diagnosing influenza: the value of clinical clues and laboratory tests. *J Fam Pract.* 2001 Dec;50(12):1051-6.
131. Prince HE, Leber AL. Comparison of complement fixation and hemagglutination inhibition assays for detecting antibody responses following influenza virus vaccination. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 May;10(3):481-2.
132. Jung M, Brunner S, Dobec M. [The complement fixation reaction: a traditional, updated method for the detection of antibodies in the diagnosis of infections]. *Lijec Vjesn.* 1995 Jan-Feb;117(1-2):39-46.
133. Okomo-Adhiambo M, Nguyen HT, Sleeman K, Sheu TG, Deyde VM, Garten RJ, et al. Host cell selection of influenza neuraminidase variants: implications for drug resistance monitoring in A(H1N1) viruses. *Antiviral Res.* 2010 Feb;85(2):381-8.

134. Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten RJ, Xu X, Bright RA, et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Sep;52(9):3284-92.
135. Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA.* 2006 Feb 22;295(8):891-4.
136. Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Sheu TG, Wallis TR, Fry A, Dharan N, et al. Pyrosequencing as a tool to detect molecular markers of resistance to neuraminidase inhibitors in seasonal influenza A viruses. *Antiviral Res.* 2009 Jan;81(1):16-24.
137. Deyde VM, Nguyen T, Bright RA, Balish A, Shu B, Lindstrom S, et al. Detection of molecular markers of antiviral resistance in influenza A (H5N1) viruses using a pyrosequencing method. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Mar;53(3):1039-47.
138. Deyde VM, Sheu TG, Trujillo AA, Okomo-Adhiambo M, Garten R, Klimov AI, et al. Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses by pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar;54(3):1102-10.
139. Sheu TG, Deyde VM, Garten RJ, Klimov AI, Gubareva LV. Detection of antiviral resistance and genetic lineage markers in influenza B virus neuraminidase using pyrosequencing. *Antiviral Res.* 2010 Feb;85(2):354-60.

140. Lackenby A, Democratis J, Siqueira MM, Zambon MC. Rapid quantitation of neuraminidase inhibitor drug resistance in influenza virus quasispecies. *Antivir Ther.* 2008;13(6):809-20.
141. Tong SY, Dakh F, Hurt AC, Deng YM, Freeman K, Fagan PK, et al. Rapid detection of the H275Y oseltamivir resistance mutation in influenza A/H1N1 2009 by single base pair RT-PCR and high-resolution melting. *PLoS One.* 2011;6(6):e21446.
142. Suppiah J, Yusof MA, Othman KA, Saraswathy TS, Thayan R, Kasim FM, et al. Monitoring of the h275y mutation in pandemic influenza A(H1N1) 2009 strains isolated in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2011 Jan;42(1):100-4.
143. Renaud C, Pergam SA, Polyak C, Jain R, Kuypers J, Englund JA, et al. Early emergence of an H275Y mutation in a hematopoietic cell transplant recipient treated with intravenous peramivir. *Transpl Infect Dis.* 2010 Dec;12(6):513-7.
144. Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Shiraishi K, Kawakami C, Kimura K, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet.* 2004 Aug 28-Sep 3;364(9436):759-65.
145. Sugaya N, Mitamura K, Yamazaki M, Tamura D, Ichikawa M, Kimura K, et al. Lower clinical effectiveness of oseltamivir against influenza B contrasted with influenza A infection in children. *Clin Infect Dis.* 2007 Jan 15;44(2):197-202.

146. Tamura D, Sugaya N, Ozawa M, Takano R, Ichikawa M, Yamazaki M, et al. Frequency of drug-resistant viruses and virus shedding in pediatric influenza patients treated with neuraminidase inhibitors. *Clin Infect Dis*. 2011 Feb 15;52(4):432-7.
147. Ward P, Small I, Smith J, Suter P, Dutkowski R. Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Feb;55 Suppl 1:i5-i21.
148. Whitley RJ, Hayden FG, Reisinger KS, Young N, Dutkowski R, Ipe D, et al. Oral oseltamivir treatment of influenza in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2001 Feb;20(2):127-33.
149. Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med*. 2005 Sep 29;353(13):1363-73.
150. Peng AW, Milleri S, Stein DS. Direct measurement of the anti-influenza agent zanamivir in the respiratory tract following inhalation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jul;44(7):1974-6.
151. Bardsley-Elliot A, Noble S. Oseltamivir. *Drugs*. 1999 Nov;58(5):851-60; discussion 61-2.
152. Treanor JJ, Hayden FG, Vrooman PS, Barbarash R, Bettis R, Riff D, et al. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial. US Oral Neuraminidase Study Group. *JAMA*. 2000 Feb 23;283(8):1016-24.

153. Hayden FG, Treanor JJ, Fritz RS, Lobo M, Betts RF, Miller M, et al. Use of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in experimental human influenza: randomized controlled trials for prevention and treatment. *JAMA*. 1999 Oct 6;282(13):1240-6.
154. Nicholson KG, Aoki FY, Osterhaus AD, Trottier S, Carewicz O, Mercier CH, et al. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group. *Lancet*. 2000 May 27;355(9218):1845-50.
155. Hayden FG, Atmar RL, Schilling M, Johnson C, Poretz D, Paar D, et al. Use of the selective oral neuraminidase inhibitor oseltamivir to prevent influenza. *N Engl J Med*. 1999 Oct 28;341(18):1336-43.
156. Administration USFaD. Safety alerts for drugs, biologics, medical devices, and dietary supplements. Relenza (zanamivir). . 2011.
157. Kiatboonsri S, Kiatboonsri C, Theerawit P. Fatal respiratory events caused by zanamivir nebulization. *Clin Infect Dis*. 2010 Feb 15;50(4):620.
158. Fiore AE, Shay DK, Broder K, Iskander JK, Uyeki TM, Mootrey G, et al. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2008. *MMWR Recomm Rep*. 2008 Aug 8;57(RR-7):1-60.

159. Jefferson T, Demicheli V, Rivetti D, Jones M, Di Pietrantonj C, Rivetti A. Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review. *Lancet*. 2006 Jan 28;367(9507):303-13.
160. Jefferson T, Jones M, Doshi P, Del Mar C. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2009;339:b5106.
161. Cowling BJ, Chan KH, Fang VJ, Lau LL, So HC, Fung RO, et al. Comparative epidemiology of pandemic and seasonal influenza A in households. *N Engl J Med*. 2010 Jun 10;362(23):2175-84.
162. Hayden FG, Fritz R, Lobo MC, Alvord W, Strober W, Straus SE. Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection. Relation to symptom formation and host defense. *J Clin Invest*. 1998 Feb 1;101(3):643-9.
163. Sato M, Hosoya M, Kato K, Suzuki H. Viral shedding in children with influenza virus infections treated with neuraminidase inhibitors. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 Oct;24(10):931-2.
164. Kaiser L, Wat C, Mills T, Mahoney P, Ward P, Hayden F. Impact of oseltamivir treatment on influenza-related lower respiratory tract complications and hospitalizations. *Arch Intern Med*. 2003 Jul 28;163(14):1667-72.

165. Johnston SL, Ferrero F, Garcia ML, Dutkowski R. Oral oseltamivir improves pulmonary function and reduces exacerbation frequency for influenza-infected children with asthma. *Pediatr Infect Dis J.* 2005 Mar;24(3):225-32.
166. Lee N, Cockram CS, Chan PK, Hui DS, Choi KW, Sung JJ. Antiviral treatment for patients hospitalized with severe influenza infection may affect clinical outcomes. *Clin Infect Dis.* 2008 Apr 15;46(8):1323-4.
167. Dutkowski R. Oseltamivir in seasonal influenza: cumulative experience in low- and high-risk patients. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Apr;65 Suppl 2:ii11-ii24.
168. Lee EH, Wu C, Lee EU, Stoute A, Hanson H, Cook HA, et al. Fatalities associated with the 2009 H1N1 influenza A virus in New York city. *Clin Infect Dis.* 2010 Jun 1;50(11):1498-504.
169. Farias JA, Fernandez A, Monteverde E, Vidal N, Arias P, Montes MJ, et al. Critically ill infants and children with influenza A (H1N1) in pediatric intensive care units in Argentina. *Intensive Care Med.* 2010 Jun;36(6):1015-22.
170. Hayden FG, Jennings L, Robson R, Schiff G, Jackson H, Rana B, et al. Oral oseltamivir in human experimental influenza B infection. *Antivir Ther.* 2000 Sep;5(3):205-13.
171. Hayden FG, Minocha A, Spyker DA, Hoffman HE. Comparative single-dose pharmacokinetics of amantadine hydrochloride and rimantadine hydrochloride in young and elderly adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985 Aug;28(2):216-21.

172. Hirsch MS, Swartz MN. Drug therapy: antiviral agents (first of two parts). *N Engl J Med.* 1980 Apr 17;302(16):903-7.
173. Monto AS, Ohmit SE, Hornbuckle K, Pearce CL. Safety and efficacy of long-term use of rimantadine for prophylaxis of type A influenza in nursing homes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Oct;39(10):2224-8.
174. Department of Health and Human Services C. FluView: week ending May 20, 2010. Atlanta, GA2010.
175. Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet.* 2000 Mar 4;355(9206):827-35.
176. Gubareva LV. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Res.* 2004 Jul;103(1-2):199-203.
177. Moscona A. Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *N Engl J Med.* 2009 Mar 5;360(10):953-6.
178. Mishin VP, Hayden FG, Gubareva LV. Susceptibilities of antiviral-resistant influenza viruses to novel neuraminidase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Nov;49(11):4515-20.
179. Baz M, Abed Y, Papenburg J, Bouhy X, Hamelin ME, Boivin G. Emergence of oseltamivir-resistant pandemic H1N1 virus during prophylaxis. *N Engl J Med.* 2009 Dec 3;361(23):2296-7.

180. Hurt AC, Lee RT, Leang SK, Cui L, Deng YM, Phuah SP, et al. Increased detection in Australia and Singapore of a novel influenza A(H1N1)2009 variant with reduced oseltamivir and zanamivir sensitivity due to a S247N neuraminidase mutation. *Euro Surveill.* 2011;16(23).
181. McKimm-Breschkin JL, McDonald M, Blick TJ, Colman PM. Mutation in the influenza virus neuraminidase gene resulting in decreased sensitivity to the neuraminidase inhibitor 4-guanidino-Neu5Ac2en leads to instability of the enzyme. *Virology.* 1996 Nov 1;225(1):240-2.
182. Gubareva LV, Bethell R, Hart GJ, Murti KG, Penn CR, Webster RG. Characterization of mutants of influenza A virus selected with the neuraminidase inhibitor 4-guanidino-Neu5Ac2en. *J Virol.* 1996 Mar;70(3):1818-27.
183. Colacino JM, Laver WG, Air GM. Selection of influenza A and B viruses for resistance to 4-guanidino-Neu5Ac2en in cell culture. *J Infect Dis.* 1997 Aug;176 Suppl 1:S66-8.
184. Hayden FG, Pavia AT. Antiviral management of seasonal and pandemic influenza. *J Infect Dis.* 2006 Nov 1;194 Suppl 2:S119-26.
185. Lackenby A, Hungnes O, Dudman SG, Meijer A, Paget WJ, Hay AJ, et al. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill.* 2008 Jan 31;13(5).

186. Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, van-der-Werf S, Schweiger B, et al. Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007-08 season. *Emerg Infect Dis.* 2009 Apr;15(4):552-60.
187. Hauge SH, Dudman S, Borgen K, Lackenby A, Hungnes O. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-08. *Emerg Infect Dis.* 2009 Feb;15(2):155-62.
188. Prevention. CfDca. A weekly influenza surveillance report prepared by the influenza division. 2009-2009 influenza season week ending January 31, 2009. 2009.
189. Organization WH. Influeza A (H1N1) virus resistance to oseltamivir. 2008 Southern hemisphere influenza season 2008.
190. Hayden FG, de Jong MD. Emerging influenza antiviral resistance threats. *J Infect Dis.* 2011 Jan 1;203(1):6-10.
191. Weinstock DM, Zuccotti G. Adamantane resistance in influenza A. *JAMA.* 2006 Feb 22;295(8):934-6.
192. CDC. Update: influenza activity - United States, 2009-10 season. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010 Jul 30;59(29):901-8.
193. Louie JK, Acosta M, Winter K, Jean C, Gavali S, Schechter R, et al. Factors associated with death or hospitalization due to pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection in California. *JAMA.* 2009 Nov 4;302(17):1896-902.

194. Fiore AE, Fry A, Shay D, Gubareva L, Bresee JS, Uyeki TM. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza --- recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2011 Jan 21;60(1):1-24.
195. Kumar D, Morris MI, Kotton CN, Fischer SA, Michaels MG, Allen U, et al. Guidance on novel influenza A/H1N1 in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2010 Jan;10(1):18-25.
196. CDC. Updated interim recommendations for the use of antiviral medications in the treatment and prevention of influenza for the 2009-2010 season2009: Available from: <http://www.cdc.gov/h1n1flu/recommendations.htm>
197. Tanaka T, Nakajima K, Murashima A, Garcia-Bournissen F, Koren G, Ito S. Safety of neuraminidase inhibitors against novel influenza A (H1N1) in pregnant and breastfeeding women. *CMAJ*. 2009 Jul 7;181(1-2):55-8.
198. CDC. Updated recommendations for obstetric health care providers related to use of antiviral medications in the treatment and prevention of influenza for the 2010-2011 season. 2011.
199. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Bresee JS. Pandemic influenza and pregnant women. *Emerg Infect Dis*. 2008 Jan;14(1):95-100.

200. Moretti ME, Bar-Oz B, Fried S, Koren G. Maternal hyperthermia and the risk for neural tube defects in offspring: systematic review and meta-analysis. *Epidemiology*. 2005 Mar;16(2):216-9.
201. Glezen WP. Clinical practice. Prevention and treatment of seasonal influenza. *N Engl J Med*. 2008 Dec 11;359(24):2579-85.
202. Fiore AE, Uyeki TM, Broder K, Finelli L, Euler GL, Singleton JA, et al. Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010 Aug 6;59(RR-8):1-62.
203. Monto AS, Robinson DP, Herlocher ML, Hinson JM, Jr., Elliott MJ, Crisp A. Zanamivir in the prevention of influenza among healthy adults: a randomized controlled trial. *JAMA*. 1999 Jul 7;282(1):31-5.
204. Bowles SK, Lee W, Simor AE, Vearncombe M, Loeb M, Tamblyn S, et al. Use of oseltamivir during influenza outbreaks in Ontario nursing homes, 1999-2000. *J Am Geriatr Soc*. 2002 Apr;50(4):608-16.
205. Peters PH, Jr., Gravenstein S, Norwood P, De Bock V, Van Couter A, Gibbens M, et al. Long-term use of oseltamivir for the prophylaxis of influenza in a vaccinated frail older population. *J Am Geriatr Soc*. 2001 Aug;49(8):1025-31.

206. Lee C, Loeb M, Phillips A, Nesbitt J, Smith K, Fearon M, et al. Zanamivir use during transmission of amantadine-resistant influenza A in a nursing home. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2000 Nov;21(11):700-4.
207. Harper SA, Bradley JS, Englund JA, File TM, Gravenstein S, Hayden FG, et al. Seasonal influenza in adults and children--diagnosis, treatment, chemoprophylaxis, and institutional outbreak management: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009 Apr 15;48(8):1003-32.
208. Dolin R, Reichman RC, Madore HP, Maynard R, Linton PN, Webber-Jones J. A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infection. *N Engl J Med*. 1982 Sep 2;307(10):580-4.
209. Kilbourne ED. Influenza immunity: new insights from old studies. *J Infect Dis*. 2006 Jan 1;193(1):7-8.
210. OMS. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2012 southern hemisphere influenza season. 2012.
211. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2012-2013 northern hemisphere influenza season. 2012.
212. FDA. FDA approves first quadrivalent vaccine to prevent seasonal influenza. 2012.

213. Boivin G, Hardy I, Kress A. Evaluation of a rapid optical immunoassay for influenza viruses (FLU OIA test) in comparison with cell culture and reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2001 Feb;39(2):730-2.
214. Herrmann B, Larsson C, Zwegberg BW. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). *J Clin Microbiol.* 2001 Jan;39(1):134-8.
215. Kawakami C, Shimizu H, Watanabe S, Saikusa M, Munemura T, Mitamura K, et al. [Evaluation of immunochromatography method for rapid detection of influenza A and B viruses]. *Kansenshogaku Zasshi.* 2001 Sep;75(9):792-9.
216. Carman WF, Wallace LA, Walker J, McIntyre S, Noone A, Christie P, et al. Rapid virological surveillance of community influenza infection in general practice. *BMJ.* 2000 Sep 23;321(7263):736-7.
217. Rebelo-de-Andrade H, Zambon MC. Different diagnostic methods for detection of influenza epidemics. *Epidemiol Infect.* 2000 Jun;124(3):515-22.
218. Schweiger B, Zadow I, Heckler R, Timm H, Pauli G. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. *J Clin Microbiol.* 2000 Apr;38(4):1552-8.

219. van Elden LJ, Nijhuis M, Schipper P, Schuurman R, van Loon AM. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol.* 2001 Jan;39(1):196-200.
220. Reina J, Plasencia V, Leyes M, Nicolau A, Galmes A, Arbona G. [Comparison study of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay with an enzyme immunoassay and shell vial culture for influenza A and B virus detection in adult patients]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010 Feb;28(2):95-8.
221. Stauffer F, Haber H, Rieger A, Mutschlechner R, Hasenberger P, Tevere VJ, et al. Genus level identification of mycobacteria from clinical specimens by using an easy-to-handle *Mycobacterium*-specific PCR assay. *J Clin Microbiol.* 1998 Mar;36(3):614-7.
222. McAdam AJ. Discrepant analysis: how can we test a test? *J Clin Microbiol.* 2000 Jun;38(6):2027-9.
223. Reina J, Fernandez-Baca V, Blanco I, Munar M. Comparison of Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) with a green monkey continuous cell line (Vero) and human lung embryonated cells (MRC-5) in the isolation of influenza A virus from nasopharyngeal aspirates by shell vial culture. *J Clin Microbiol.* 1997 Jul;35(7):1900-1.
224. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Mar;149(3 Pt 1):818-24.

225. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012. *Crit Care Med*. 2013 Feb;41(2):580-637.
226. Novel influenza A (H1N1) virus infections among health-care personnel - United States, April-May 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009 Jun 19;58(23):641-5.
227. Ling LM, Chow AL, Lye DC, Tan AS, Krishnan P, Cui L, et al. Effects of early oseltamivir therapy on viral shedding in 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection. *Clin Infect Dis*. 2010 Apr 1;50(7):963-9.
228. De Serres G, Rouleau I, Hamelin ME, Quach C, Skowronski D, Flamand L, et al. Contagious period for pandemic (H1N1) 2009. *Emerg Infect Dis*. 2010 May;16(5):783-8.
229. To KK, Chan KH, Li IW, Tsang TY, Tse H, Chan JF, et al. Viral load in patients infected with pandemic H1N1 2009 influenza A virus. *J Med Virol*. 2010 Jan;82(1):1-7.
230. Gooskens J, Jonges M, Claas EC, Meijer A, Kroes AC. Prolonged influenza virus infection during lymphocytopenia and frequent detection of drug-resistant viruses. *J Infect Dis*. 2009 May 15;199(10):1435-41.
231. Duchamp MB, Casalegno JS, Gillet Y, Frobert E, Bernard E, Escuret V, et al. Pandemic A(H1N1)2009 influenza virus detection by real time RT-PCR: is viral quantification useful? *Clin Microbiol Infect*. 2010 Apr;16(4):317-21.

232. To KK, Hung IF, Li IW, Lee KL, Koo CK, Yan WW, et al. Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection. *Clin Infect Dis*. 2010 Mar 15;50(6):850-9.
233. Charlson ME, Sax FL, MacKenzie CR, Braham RL, Fields SD, Douglas RG, Jr. Morbidity during hospitalization: can we predict it? *J Chronic Dis*. 1987;40(7):705-12.
234. Knaus WA, Wagner DP, Draper EA, Zimmerman JE, Bergner M, Bastos PG, et al. The APACHE III prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults. *Chest*. 1991;100(6):1619-36.
235. Lessler J, Reich NG, Cummings DA, Nair HP, Jordan HT, Thompson N. Outbreak of 2009 pandemic influenza A (H1N1) at a New York City school. *N Engl J Med*. 2009 Dec 31;361(27):2628-36.
236. Gold PM. The 2007 GOLD Guidelines: a comprehensive care framework. *Respir Care*. 2009;54(8):1040-9.
237. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis*. 2007;44(Suppl 2):S27-72.
238. York M, Gilligan P, editors. *Guidelines for Performance of Respiratory Tract Cultures*. Washington (DC): ASM Press.

; 2004.

239. CLSI, editor. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement. Wayne, PA2005.

240. Suwannakarn K, Payungporn S, Chieochansin T, Samransamruajkit R, Amonsin A, Songserm T, et al. Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A viruses by multiplex real-time RT-PCR assays. *J Virol Methods*. 2008 Sep;152(1-2):25-31.

241. Muller MP, McGeer A. Febrile respiratory illness in the intensive care unit setting: an infection control perspective. *Curr Opin Crit Care*. 2006 Feb;12(1):37-42.

242. Sandrock CE. Severe febrile respiratory illnesses as a cause of mass critical care. *Respir Care*. 2008 Jan;53(1):40-53; discussion -7.

243. Bauer TT, Ewig S, Rodloff AC, Muller EE. Acute respiratory distress syndrome and pneumonia: a comprehensive review of clinical data. *Clin Infect Dis*. 2006 Sep 15;43(6):748-56.

244. Kendirli T, Demirkol D, Yildizdacs D, Anil AB, Acsilioglu N, Karapinar B, et al. Critically ill children with pandemic influenza (H1N1) in pediatric intensive care units in Turkey. *Pediatr Crit Care Med*. 2011 Jan 21.

245. Kumar D, Michaels MG, Morris MI, Green M, Avery RK, Liu C, et al. Outcomes from pandemic influenza A H1N1 infection in recipients of solid-organ transplants: a multicentre cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2010 Aug;10(8):521-6.
246. Bagdure D, Curtis DJ, Dobyns E, Glode MP, Dominguez SR. Hospitalized children with 2009 pandemic influenza A (H1N1): comparison to seasonal influenza and risk factors for admission to the ICU. *PLoS One*. 2010;5(12):e15173.
247. Skarbinski J, Jain S, Bramley A, Lee EJ, Huang J, Kirschke D, et al. Hospitalized patients with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in the United States--September-October 2009. *Clin Infect Dis*. 2011 Jan 1;52 Suppl 1:S50-9.
248. Call SA, Vollenweider MA, Hornung CA, Simel DL, McKinney WP. Does this patient have influenza? *JAMA*. 2005 Feb 23;293(8):987-97.
249. Maltezou HC, Drancourt M. Nosocomial influenza in children. *J Hosp Infect*. 2003 Oct;55(2):83-91.
250. Salgado CD, Farr BM, Hall KK, Hayden FG. Influenza in the acute hospital setting. *Lancet Infect Dis*. 2002 Mar;2(3):145-55.
251. Malavaud S, Malavaud B, Sandres K, Durand D, Marty N, Icart J, et al. Nosocomial outbreak of influenza virus A (H3N2) infection in a solid organ transplant department. *Transplantation*. 2001 Aug 15;72(3):535-7.

252. Chironna M, Tafuri S, Santoro N, Prato R, Quarto M, Germinario CA. A nosocomial outbreak of 2009 pandemic influenza A(H1N1) in a paediatric oncology ward in Italy, October-November 2009. *Euro Surveill.* 2010 Jan 7;15(1).
253. Lalayanni C, Sirigou A, Iskas M, Smias C, Sakellari I, Anagnostopoulos A. Outbreak of novel influenza A (H1N1) in an adult haematology department and haematopoietic cell transplantation unit: clinical presentation and outcome. *J Infect.* 2010 Sep;61(3):270-2.
254. Enstone JE, Myles PR, Openshaw PJ, Gadd EM, Lim WS, Semple MG, et al. Nosocomial pandemic (H1N1) 2009, United Kingdom, 2009-2010. *Emerg Infect Dis.* 2011 Apr;17(4):592-8.
255. Martin-Loeches I, Diaz E, Vidaur L, Torres A, Laborda C, Granada R, et al. Pandemic and post-pandemic influenza A (H1N1) infection in critically ill patients. *Crit Care.* 2011;15(6):R286. doi: 10.1186/cc10573. Epub 2011 Nov 28.
256. Rodriguez A, Diaz E, Martin-Loeches I, Sandiumenge A, Canadell L, Diaz JJ, et al. Impact of early oseltamivir treatment on outcome in critically ill patients with 2009 pandemic influenza A. *J Antimicrob Chemother.* 2011 May;66(5):1140-9.
257. Passing H, Bablok. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1983 Nov;21(11):709-20.

258. Sandrock C, Stollenwerk N. Acute febrile respiratory illness in the ICU: reducing disease transmission. *Chest*. 2008 May;133(5):1221-31.
259. Jefferson TO, Demicheli V, Di Pietrantonj C, Jones M, Rivetti D. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;3:CD001265.
260. Lieberman D, Shimoni A, Keren-Naus A, Steinberg R, Shemer-Avni Y. Identification of respiratory viruses in adults: nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling. *J Clin Microbiol*. 2009 Nov;47(11):3439-43.
261. Rello J, Rodriguez A, Ibanez P, Socias L, Cebrian J, Marques A, et al. Intensive care adult patients with severe respiratory failure caused by Influenza A (H1N1)v in Spain. *Crit Care*. 2009;13(5):R148.
262. Singh K, Vasoo S, Stevens J, Schreckenberger P, Trenholme G. Pitfalls in diagnosis of pandemic (novel) A/H1N1 2009 influenza. *J Clin Microbiol*. 2010 Apr;48(4):1501-3.
263. Munster VJ, de Wit E, van den Brand JM, Herfst S, Schrauwen EJ, Bestebroer TM, et al. Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets. *Science*. 2009 Jul 24;325(5939):481-3.

10. ARTICULOS PUBLICADOS
