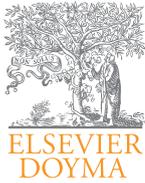




Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Diagnóstico microbiológico de las infecciones virales respiratorias en el paciente adulto

Andrés Antón Pagarolas* y Tomàs Pumarola Suñé

Laboratorio de Microbiología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, España

RESUMEN

Palabras clave:

Virus respiratorios
Diagnóstico virológico
Enfermedad respiratoria

Las técnicas tradicionales para el diagnóstico de los virus respiratorios siguen estando todavía vigentes, aunque los métodos moleculares aplicados al diagnóstico de la infección viral respiratoria han supuesto una auténtica revolución. Las técnicas moleculares tienen como principales ventajas una excelente sensibilidad, especificidad, capacidad de adaptación a virus emergentes, capacidad para detectar múltiples dianas en un mismo ensayo y posibilidad de automatización. Adicionalmente, estas técnicas han permitido profundizar en el papel de los virus en la infección respiratoria aguda a la vez que han descrito la existencia de nuevos virus no conocidos previamente. Los métodos moleculares y no moleculares de diagnóstico rápido para 1 o más virus respiratorios han permitido la toma de decisiones de forma inmediata en el manejo del paciente mejorando su pronóstico y evitando la transmisión nosocomial. Sin embargo, también hay inconvenientes, la mayor sensibilidad de las técnicas moleculares ha supuesto un incremento significativo de la tasa de codetecciones múltiples de virus respiratorios, cuya implicación clínica resulta difícil de interpretar. Finalmente queda por demostrar todavía si la utilización de las nuevas técnicas, de elevado coste, en el diagnóstico microbiológico de rutina de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral, en el paciente hospitalizado, es coste-efectiva.

© 2014 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Keywords:

Respiratory viruses
Virological diagnosis
Respiratory disease

Microbiological diagnosis of viral respiratory infections in the adult patient

ABSTRACT

Conventional techniques for the diagnosis of respiratory viruses are still being used, although molecular methods are now considered as a gold standard in this field. Molecular techniques have a great number of advantages such as an excellent sensitivity, specificity, adaptability to emerging viruses, capability for multiplex and for automation. With all the available repertoire of techniques for microbiological diagnosis, the knowledge relative to respiratory viruses is growing up not only for new aetiological agents but also for its epidemiology. The advances in molecular and non-molecular fast diagnostic methods for one or more respiratory viruses allow quick decisions in the management of the patient. However, there are also disadvantages. The great sensitivity of molecular techniques has meant a significant increase in the rate of multiple detections of respiratory viruses, whose clinical involvement is difficult to interpret. Finally, it remains to show whether the use of new techniques, of high cost, in the microbiological routine diagnosis of acute respiratory viral infections in the hospitalized patient, is cost effective.

© 2014 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La infección respiratoria aguda (IRA) es la patología más frecuente a lo largo de la vida del ser humano. La mayoría de las infecciones

respiratorias solo afectan al tracto respiratorio superior (TRS) y se pueden considerar leves, de curso benigno y autolimitado (catarro común, rinitis y faringoamigdalitis). Sin embargo se estima que alrededor del 5% puede implicar al tracto respiratorio inferior (TRI), como bronquitis, bronquiolitis y neumonía, requiriendo en muchos casos el ingreso hospitalario. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, 450 millones de casos de neumonía se regis-

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: aanton@vhebron.net (A. Antón Pagarolas).

tran cada año; unos 4 millones de personas mueren por esta enfermedad. Las incidencias más altas se presentan en niños menores de 5 años y en adultos mayores de 75 años. En países en desarrollo esta incidencia podría ser incluso 5 veces mayor que en países desarrollados¹.

En la edad adulta, las infecciones respiratorias de origen viral son una causa importante de morbilidad y mortalidad; sin embargo, los cuadros clínicos que precisan atención médica prácticamente se limitan a ancianos, a pacientes severamente inmunodeprimidos o con una patología pulmonar subyacente u otros factores de riesgo. En receptores de progenitores hematopoyéticos, la mortalidad asociada con la infección del TRI debido a virus respiratorios es de entre el 25 y el 45%. La transmisión de los virus respiratorios es principalmente por gotas y contacto y, con menor frecuencia, aérea, por lo que potencialmente pueden causar brotes de tipo nosocomial, siendo la hospitalización prolongada un posible factor de riesgo de la infección y de complicaciones asociadas. El diagnóstico microbiológico rápido y preciso de la IRA es la herramienta más apropiada en el manejo temprano de este tipo de infecciones².

Un mismo síndrome respiratorio puede estar causado por virus diferentes y un mismo virus puede originar diversos síndromes. Sin embargo, no es infrecuente la asociación entre un determinado virus y un síndrome respiratorio en particular, y dependiendo de la estacionalidad y de la edad del paciente es posible aventurar un diagnóstico presuntivo basado en las características clínicas y epidemiológicas de la infección. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la inespecificidad del cuadro clínico hace necesaria la realización de un diagnóstico microbiológico para determinar el agente etiológico.

Las infecciones respiratorias, destacando la neumonía adquirida en la comunidad, están causadas por diferentes microorganismos patógenos, como bacterias, virus, hongos y parásitos. Con las técnicas convencionales de diagnóstico virológico, la detección de antígeno, el aislamiento en cultivo celular o incluso la serología, muy probablemente se haya subestimado el papel de los virus en esta patología. Sin embargo, en los últimos años, la disponibilidad de ensayos de diagnóstico molecular, como los basados en la amplificación de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha aumentado considerablemente la capacidad para detectar e identificar los virus causantes de infección respiratoria. Además, la secuenciación de los productos de amplificación permite una caracterización más completa de los virus detectados. Este hecho está contribuyendo a mejorar el conocimiento de las infecciones respiratorias en las que están implicados cada uno de estos virus.

El principal objetivo de los métodos de diagnóstico microbiológico de los virus respiratorios es poder actuar precozmente en el tratamiento de la enfermedad respiratoria. A pesar del limitado repertorio de antivirales para el tratamiento de las infecciones virales respiratorias, tener la capacidad de diagnosticar un virus como agente causal de infección respiratoria debe ser parte integral del tratamiento de los pacientes, permitiendo recomendar el uso de antivirales en el caso de estar disponibles, reducir o racionalizar también el uso innecesario de antibióticos, y adoptar las medidas de higiene y de control para impedir la transmisión horizontal.

Los virus respiratorios más comunes asociados a infección respiratoria son los virus de la gripe (VGA, VGB y VGC), el virus respiratorio sincitial (VRS-A y B), el virus parainfluenza (HVPI-1, 2, 3, 4a, 4b), el coronavirus (HCoV-229E, NL63, OC43, HKU1, SARS-CoV y MERS-CoV), el enterovirus (HEVA, B, C y D), el rinovirus (HRV-A, B y C), el parechovirus (HPeV1-6), el adenovirus (HADVA-F), el metapneumovirus (HMPVA y B), el bocavirus (HBoV1-4) y el poliovirus (PyV KI y WU). Otros virus que se encuentran con menor frecuencia asociados a enfermedad respiratoria son el virus de la varicela-zóster, el hantavirus, el virus de Epstein Barr, los herpesvirus 6 y 7, el virus del herpes simple, el mimivirus, el citomegalovirus y el virus del sarampión^{1,4-6}.

Métodos de diagnóstico

Los métodos de diagnóstico microbiológico de la IRA de etiología viral son el aislamiento en cultivo celular, la detección de antígenos y de ácidos nucleicos, y la serología.

Recogida de las muestras

La sensibilidad de una prueba de laboratorio para el diagnóstico se encuentra principalmente condicionada por el tipo de muestra, momento de la historia natural de la infección en el que se recoge, y de su transporte y conservación. La correcta recogida de las muestras más óptimas para el diagnóstico, realizado de forma temprana después de la aparición de los síntomas, es un requisito previo para un diagnóstico de laboratorio fiable de la infección respiratoria. La excreción de partículas virales a partir de la aparición de los síntomas disminuye progresivamente con el paso de los días en el paciente inmunocompetente, aunque en algunos casos el completo aclaramiento no sucede hasta pasadas unas semanas e incluso meses.

El principal requisito necesario a la hora de valorar las muestras obtenidas a partir del tracto respiratorio es que estas deben contener el mayor número posible de células epiteliales ciliadas, donde los virus respiratorios replican. En este sentido, las muestras más apropiadas son el frotis de faringe o nasofaringe y los lavados o aspirados nasales o bronquiales. Las muestras deben tomarse preferentemente del área afectada, frotis o aspirado nasal y faríngeo en el caso de sospecha de infección del TRS, y lavado broncoalveolar (o aspirados traqueales), en el caso de sospecha de infección del TRI⁷. En los niños, un aspirado nasofaríngeo es la muestra de elección, pero debido a las molestias en su obtención, en los adultos se acostumbra a obtener un frotis nasal y faríngeo, el cual posee una menor sensibilidad que el aspirado nasofaríngeo, pero mayor a la de un frotis faríngeo o faringoamigdalal¹. En caso de infección del TRI, la obtención de una muestra del foco de infección es lo más representativo. Sin embargo, debido a la dificultad de su obtención, suelen utilizarse muestras de TRS para establecer el diagnóstico. Debe tenerse en cuenta la elevada posibilidad, en estos casos, de obtener un resultado falsamente negativo.

La recogida de la muestra debe ser realizada antes de 48 a 72 h del comienzo de los primeros síntomas debido a que el período de excreción viral de los virus respiratorios es en general muy corto, y es durante los primeros días después del inicio de los síntomas cuando la carga viral excretada es máxima. Este factor es más crítico en las muestras obtenidas de paciente adulto, sobre todo en el paciente de edad avanzada, con respecto a las muestras obtenidas en niños, debido a que generalmente presentan una menor carga viral. El transporte de las muestras al laboratorio debe realizarse en un plazo de entre 24 y 48 h a una temperatura de entre 2 y 8 °C, con objeto de asegurar la viabilidad de las partículas virales o la integridad del material genético. Para la óptima conservación es recomendable utilizar un medio de transporte adecuado, que consiste en una solución salina a pH neutro con estabilizadores de proteínas, como el suero bovino fetal, y soluciones antibióticas (penicilina, estreptomycin y anfotericina B) que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos. Si la muestra no puede ser procesada dentro de las primeras 48 h, la muestra debe ser congelada a -70 °C.

El aislamiento o detección de los virus respiratorios está altamente condicionado al tipo de muestra utilizado y a su conservación y transporte. Estos factores explicarían la gran variabilidad observada en los estudios de incidencia para los diferentes virus respiratorios publicados hasta el momento.

Aislamiento mediante cultivo celular

De los primeros métodos de diagnóstico virológico disponibles hay que destacar el aislamiento de virus en cultivo celular. Hasta la

amplia aceptación de los métodos moleculares para el diagnóstico de los virus respiratorios por su mayor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, el aislamiento viral en cultivo celular se había considerado el método de referencia. Actualmente, como herramienta de diagnóstico, ha sido relegado a muy pocos laboratorios de virología en nuestro país, principalmente por el gran consumo de recursos necesarios, la implantación coste-efectiva de las técnicas moleculares, el tiempo para obtener un resultado, y la incapacidad o dificultad de aislar algunos de los nuevos virus conocidos.

El tipo, la recogida, el transporte y la preparación de las muestras clínicas son factores muy importantes a considerar en el aislamiento de los virus en cultivo celular, especialmente en el caso de algunos virus respiratorios que son particularmente lábiles. El principal objetivo de estos procedimientos es conservar el título viral y la infectividad en unos valores óptimos hasta el momento de la inoculación. Las muestras respiratorias son previamente descontaminadas de la flora acompañante mediante el uso de soluciones de antibióticos y antifúngicos, antes de ser inoculadas en las diferentes líneas celulares (HeLa, HEP-2, Vero, LLC-MK2, MDCK, MDCK-Siat1, MRC-5, etc.) según el virus que se pretenda aislar. La detección de la replicación viral se realiza mediante la observación del efecto citopático sobre las células del cultivo. En algunos casos, el efecto citopático es específico de un determinado virus respiratorio, pero en otros casos se trata de un efecto citopático inespecífico, que podría incluso ser confundido con un efecto tóxico de la muestra sobre la línea celular. La identificación del virus aislado en cultivo celular puede realizarse por diferentes métodos, como la inhibición de la hemaglutinación, la inmunofluorescencia (IF) y la detección de actividad neuraminidasa, siendo la IF la más ampliamente utilizada. La confirmación mediante PCR específica no se considera recomendable, ya que en los casos de muestras con elevada carga viral podría detectarse el material genético de la muestra inoculada y no el del virus aislado.

La principal aportación del cultivo celular es la confirmación de la viabilidad e infectividad del virus, información que no es posible obtener mediante los métodos de amplificación molecular y los métodos de detección de antígeno. Además, los virus aislados en cultivo celular se pueden utilizar en estudios posteriores de caracterización antigénica, de sensibilidad a los antivirales, etc. También permite el descubrimiento de nuevos virus o serotipos previamente no identificados.

Hay métodos basados en cultivo celular capaces de detectar la presencia de virus respiratorios de forma precoz, el más común es el *shell vial*. Después de la inoculación de la muestra, a las 24-48 h y antes de la aparición del efecto citopático se puede detectar la presencia de proteínas virales por IF.

En el caso de los virus de la gripe, el aislamiento también es posible utilizando huevos embrionados vivos de gallina, inoculando la muestra previamente descontaminada en el interior de la cavidad alantoidea o amniótica. Una vez finalizada la incubación se debe confirmar el aislamiento viral mediante hemaglutinación o detección de la actividad neuraminidasa, tal y como haríamos con un aislamiento en cultivo celular.

Detección de antígenos mediante inmunofluorescencia

Hay diferentes métodos basados en la detección de antígeno que, a pesar de presentar una menor sensibilidad y especificidad respecto de los métodos moleculares, permiten un diagnóstico más rápido y sencillo. Estos métodos rápidos, basados en la inmunocromatografía capilar, el inmunoenanálisis de membrana o la IF, permiten la detección de virus respiratorios en pocos minutos. Para estos métodos rápidos se ha observado un mayor rendimiento trabajando con muestras pediátricas, al presentar títulos más elevados de virus y por períodos más prolongados que en los adultos. Estos métodos rápidos presentan valores predictivos positivos más elevados cuando se realizan durante los períodos de mayor prevalencia, por ejemplo, durante los brotes epidémicos.

Los métodos de detección de antígeno mediante IF permiten detectar hasta 8 de los virus respiratorios más comunes (HAdV, VCA, VGB, HVPI-1, HVPI-2, HVPI-3, VRS y HMPV). Esta técnica consiste en la detección directa o indirecta de los antígenos virales mediante anticuerpos marcados con fluoresceína, examinando la preparación de la muestra bajo un microscopio de fluorescencia. Generalmente se acostumbra a utilizar primero una mezcla de anticuerpos dirigidos contra cada uno de los 8 virus respiratorios. En el caso de observar células con marcado fluorescente, se procede a trabajar por separado con cada uno de los anticuerpos monoclonales específicos para los diferentes virus respiratorios, de forma que se pueda confirmar el diagnóstico. Este método puede usarse tanto en muestra directa como en cultivo celular. La especificidad de la prueba de detección de antígeno mediante IF es alta, siempre dependiente de la experiencia del profesional que la realiza, pero las sensibilidades pueden variar de un mínimo del 50 al 80% en comparación con las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos. Además del poco tiempo requerido para la realización de la técnica y la rapidez en la generación de resultados, otra de las ventajas es el bajo coste de los reactivos. Como desventaja cabe destacar que no está disponible para otros virus que también son causa importante de enfermedad respiratoria, como BoV, CoV (229E, OC43, NL63 y HKU-1), HVPI-4 y HRV³.

Los métodos rápidos de detección de antígeno, basados en técnicas de inmunocromatografía capilar y de inmunoenanálisis de membrana, tienen la ventaja adicional de ser de lectura visual sin necesidad de instrumental. Ofrecen resultados rápidos y pueden ayudar al clínico precozmente en el tratamiento y manejo de los pacientes, y en la adopción de medidas de control para evitar su transmisión nosocomial. No obstante presentan una baja sensibilidad y especificidad. Por ejemplo, para el diagnóstico del virus de la gripe presentan una gran variabilidad en su sensibilidad (10-75%) y especificidad (50-100%), siendo muy superior en el caso del VRS.

Métodos moleculares para la detección de virus respiratorios

Los métodos de amplificación molecular mediante PCR en sus diferentes versiones (a tiempo final, anidada, en tiempo real)^{8,9}, NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*) o bien LAMP (*loop mediated isothermal amplification*)¹⁰, para la detección de virus respiratorios han permitido incrementar de manera considerable el número de muestras respiratorias en las que se detecta la presencia de alguno de los virus respiratorios, contribuyendo a mejorar el conocimiento de las patologías en las que están implicados estos virus y su epidemiología. Así, el diagnóstico virológico molecular ha adquirido una importancia creciente con el desarrollo de nuevos ensayos moleculares, en algunos casos capaces de detectar simultáneamente múltiples virus respiratorios. Este hecho es especialmente relevante en los virus que no pueden ser aislados en cultivo celular o bien su aislamiento es difícil. También, las técnicas de secuenciación permiten la realización de estudios adicionales de genotipado, de epidemiología molecular y de detección de mutaciones asociadas a resistencia a los antivirales, por citar algunos ejemplos.

Los métodos moleculares tienen un gran número de ventajas sobre otros métodos de diagnóstico. Demuestran una sensibilidad superior, hasta 5 veces superior, a los métodos convencionales en la detección de virus poco viables o difíciles de aislar en cultivo celular o que están presentes en pequeñas cantidades. Esta mayor sensibilidad incrementa la capacidad para detectar virus respiratorios en muestras de pacientes adultos que, a diferencia de los niños, presentan una menor carga viral. Sin embargo, el gran reto es poder determinar si un virus detectado en el TRS o TRI es el causante de la enfermedad respiratoria. Debido a la elevada sensibilidad de los métodos moleculares no se puede descartar una posible contaminación de la muestra, una colonización o una excreción prolongada de virus tras la infección sin implicación clínica, más particularmente cuando se trabaja a partir de una muestra del TRS^{3,11}.

Las infecciones respiratorias atribuidas a más de un virus se habían observado previamente mediante técnicas de detección de antígeno por IF. Actualmente, este porcentaje de codetecciones se ha incrementado con el uso generalizado de las técnicas moleculares. También empleando técnicas moleculares se ha descrito la detección de virus respiratorios en personas asintomáticas, con lo que no es posible, en estos casos, asociar presencia con enfermedad respiratoria. De este modo, la realización de estudios de prevalencia de los virus frecuentemente detectados en codetección con otros virus respiratorios, comparando lo observado en población sintomática y asintomática, debería ayudar a discernir el papel que estos podrían tener en la enfermedad.

Una de las ventajas de las técnicas moleculares es que pueden ser automatizadas en el laboratorio, reduciendo el coste del personal técnico, minimizando errores y ganando reproducibilidad^{3,11}. Sin embargo, su elevado coste, y en algunos casos su complejidad, en la actualidad todavía es inasumible para algunos laboratorios.

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR utilizada para amplificar de forma específica una determinada región genómica del virus de interés, monitorizando en tiempo real la amplificación en cada uno de los ciclos mediante sondas específicas marcadas con un fluoróforo (sondas TaqMan, FRET o molecular beacon) o bien mediante agentes intercalantes fluorescentes (SybrGreen). En muchos casos, el material genético inicial puede ser ARN, por lo que será necesario un proceso de retrotranscripción a ADN previo a la PCR. En los últimos años son muchos los métodos de PCR en tiempo real utilizados en el diagnóstico con independencia del sistema de emisión-detección de fluorescencia empleado, ya sean comerciales o de desarrollo propio, optimizados en el laboratorio. Este tipo de técnicas tiene como principales ventajas una gran sensibilidad y una doble especificidad propia de los iniciadores y sondas empleados. Además tienen la ventaja de poder detectar múltiples dianas mediante la utilización de diferentes sondas, cuyo número estará limitado al número de canales de detección de fluorescencia disponibles en el equipo. En el caso de utilizar agentes intercalantes durante la PCR en tiempo real, la técnica se puede optimizar de modo que se puedan identificar los amplicones por su temperatura de *melting*, que está condicionada por la longitud y composición nucleotídica del amplicón¹². La utilización de una recta patrón a partir de un estándar cuantificado durante la PCR en tiempo real permite también la cuantificación de la carga viral presente en la muestra. En el caso de los virus que presentan similares tasas de detección en pacientes asintomáticos en comparación con los sintomáticos, o bien una prolongada persistencia tras la infección, es difícil establecer una clara asociación entre detección y enfermedad respiratoria. En estos casos, una posible opción es tratar de determinar la verdadera implicación de un virus en la patología respiratoria mediante la cuantificación de la carga viral con las técnicas de PCR en tiempo real¹³, y así determinar un valor umbral de carga viral en muestra respiratoria que confirme una replicación viral con implicación clínica en la enfermedad^{14,15}. El principal inconveniente de estos estudios es el tipo de muestra, que resulta ser muy variable en lo que respecta a localización, cantidad y celularidad de la muestra obtenida y homogeneidad de esta, siendo entonces no comparables.

Los métodos de PCR multiplex constituyen una herramienta muy útil en el complicado diagnóstico de las infecciones virales respiratorias, ya que permiten detectar múltiples dianas en un mismo ensayo. Los sistemas de detección de amplificación más antiguos son la electroforesis en gel de agarosa y ELISA, pero en los últimos años se han realizado avances importantes en otros métodos de detección e identificación de los productos de amplificación, como la utilización de diferentes sondas marcadas con fluoróforos en la PCR multiplex en tiempo real⁹, la espectrometría de masas (EM) tipo electrospray ionizante (ESI-TOF)^{16,17} y las plataformas de *arrays* en soporte sólido^{18,19} o bien en fase líquida²⁰⁻²². El análisis del producto de PCR mediante EM tipo ESI-TOF determina la composición nucleotídica de los amplicones,

es decir, la proporción en que se encuentran cada una de las bases. Esta composición de secuencia es única para cada gen y específica de cada microorganismo, permitiendo así su identificación en una base de datos ya proporcionada²³. Mediante esta tecnología ha sido posible identificar algunas de las principales familias virales, incluidos algunos virus respiratorios^{24,25}. Los *microarrays* o biochips de ADN consisten en un gran número de sondas específicas inmovilizadas sobre una superficie sólida, sobre la que se hibrida el material genético previamente marcado. La lectura del resultado se realiza utilizando un escáner para los *arrays* de fase sólida, o mediante citometría de flujo para los *arrays* de fase líquida. La principal ventaja de los biochips de ADN es la gran capacidad para detectar múltiples dianas (100-1.000x) en un mismo ensayo, a diferencia de la PCR en tiempo real, que solo permite la detección de unas pocas al estar limitada por el número de canales de lectura de fluorescencia del termociclador. Sin embargo se ha demostrado en algunos casos que la opción de detectar más de una diana por ensayo podría estar comprometiendo la sensibilidad de la técnica¹¹. Revisiones recientes amplían la información relativa a estas metodologías^{3,9,11,23,26}.

En algunos casos interesa combinar la sensibilidad y especificidad de la PCR con la rapidez y la simplicidad de la prueba rápida del antígeno. En el mercado ya existen reactivos comerciales de diagnóstico para uno⁸ o más virus respiratorios^{3,9,11} que requieren aproximadamente 1 h para llevar a cabo un ensayo, con un resultado temprano que permite tomar decisiones para el tratamiento inicial del paciente.

Un factor muy a tener en cuenta para los métodos moleculares basados en secuencias específicas aplicados al diagnóstico de virus de constante y rápida evolución, como por ejemplo los virus de la gripe, es la revisión periódica de las secuencias con las que se han diseñado los iniciadores para la amplificación o las sondas para la detección, de modo que la adquisición de mutaciones no pueda afectar a la sensibilidad de la técnica.

La secuenciación de ácidos nucleicos resulta muy útil para la identificación de virus conocidos, e incluso el descubrimiento de otros nuevos. Con la utilización de iniciadores degenerados, diseñados en regiones del genoma muy conservadas, ya sean genes exclusivos o regiones de determinados genes específicas de grupo, es posible identificar o clasificar grupos de virus genéticamente relacionados. Esta estrategia, junto con el análisis filogenético de las secuencias con otras consideradas de referencia, se emplea en los estudios de epidemiología molecular^{27,28}, por ejemplo en la clasificación del nuevo coronavirus MERS-CoV²⁸. Estos estudios de epidemiología molecular resultan también útiles para discernir la cadena de transmisión y la existencia de múltiples reintroducciones de cepas virales circulantes durante un brote nosocomial o institucional, conjuntamente con datos epidemiológicos y clínicos²⁹. Las técnicas de secuenciación, además, se emplean en estudios genotípicos de sensibilidad a los antivirales, como por ejemplo en la detección de mutaciones en los genes de la neuraminidasa y de la proteína M2 de los virus de la gripe asociadas a una reducción de la sensibilidad a los inhibidores de la neuraminidasa y a los adamantanos, respectivamente, lo cual está recomendado en el caso de detectar una continuada excreción de virus de la gripe aun bajo tratamiento antiviral^{30,31}, y muy especialmente en el paciente inmunodeprimido. En la actualidad, la secuenciación de ácidos nucleicos mediante la metodología Sanger sigue siendo la metodología más utilizada; sin embargo, las nuevas técnicas de ultrasecuenciación, no basadas en electroforesis, ya se están usando en el laboratorio de microbiología. Estas nuevas técnicas de ultrasecuenciación tienen como principales aplicaciones la secuenciación de novo de genomas completos, resecuenciación y estudios de metagenómica³²⁻³⁴. Mediante los estudios de resecuenciación es posible estudiar en profundidad la diversidad poblacional para un determinado virus^{35,36}. Además, la incorporación de identificadores de secuencia mediante ligación o mediante amplificación permite procesar simultáneamente diferentes muestras en un mismo ensayo. De todos modos, a pesar de haberse reducido sig-

nificativamente el coste de los reactivos en los últimos años, la inversión requerida en estas plataformas y la necesidad de soluciones bioinformáticas para el análisis de los datos obtenidos, están limitando la implementación de esta tecnología con aplicación clínica en el laboratorio de microbiología.

Métodos serológicos

Las técnicas serológicas permiten confirmar una IRA mediante la detección de anticuerpos específicos en suero frente a un determinado virus. Los ensayos utilizados con mayor frecuencia son la reacción de fijación del complemento, la inhibición de la hemaglutinación y la seroneutralización. Sin embargo, la necesidad de obtener sueros pareados (fase aguda y convaleciente) hace que la realización de estas técnicas resulte de poca utilidad en el manejo clínico del paciente. Su realización acostumbra a limitarse a estudios seroepidemiológicos y de seroprotección poblacional retrospectivos.

Discusión y conclusiones

Las técnicas tradicionales para el diagnóstico de los virus respiratorios siguen siendo todavía vigentes. Sin embargo, los métodos moleculares han supuesto un gran avance en este campo, ya que han permitido conocer nuevos agentes causantes de infección respiratoria y profundizar en el papel de los virus en este tipo de infecciones. También, el avance en métodos moleculares y no moleculares de diagnóstico rápido y baja complejidad para la detección e identificación rápida de 1 o más virus respiratorios y que permiten tomar decisiones de forma inmediata en el manejo del paciente han sido en los últimos años una auténtica revolución.

Los signos y síntomas clínicos difícilmente permiten identificar el agente causal de la enfermedad respiratoria, incluso en los virus con un patrón de estacionalidad bien definido. Para los virus frente a los que existe tratamiento antiviral efectivo (como en el caso de los virus de la gripe) hay un amplio repertorio de técnicas de diagnóstico, tanto convencionales como moleculares. Sin embargo, para el resto de virus respiratorios, a pesar de la ausencia de tratamiento antiviral efectivo, continúa siendo necesario demostrar su presencia, para disminuir la utilización de antibióticos, como medida de control de un posible brote nosocomial, especialmente en pacientes de alto riesgo y por su interés epidemiológico. Sin embargo es importante hacer un buen uso de los recursos en el laboratorio y aplicar las diferentes técnicas, en especial las de diagnóstico rápido y elevado coste económico, cuando la estacionalidad descrita para los virus respiratorios más comunes así lo recomiende, período en el que estas han demostrado un mayor valor predictivo. En este sentido tenemos la responsabilidad de cuestionar y demostrar si la realización sistemática del diagnóstico microbiológico de las IRA de etiología viral en el paciente hospitalizado permite adoptar cambios en el manejo del paciente que redunden en su bienestar, en la reducción o racionalización en el uso de antibióticos, en la disminución de pruebas complementarias y en la reducción de la estancia hospitalaria, en definitiva, en un menor gasto hospitalario.

El avance en las técnicas moleculares para el diagnóstico virológico ha sido significativo, y entre las ventajas de esta tecnología hay que destacar una excelente sensibilidad, especificidad, capacidad de adaptación a virus emergentes, capacidad para detectar múltiples dianas en un mismo ensayo y la posibilidad de automatización. Pero la elevada sensibilidad de las técnicas moleculares, en ocasiones muy interesante cuando la carga viral presente en la muestra es baja, ha incrementado también el número de detecciones múltiples de virus respiratorios. Todavía es controvertida la implicación clínica de estas coinfecciones o codetecciones de virus respiratorios en la infección respiratoria.

Por último, comentar que se deben realizar estudios adicionales necesarios para conocer el verdadero papel que tienen algunos virus

en la infección del TRI, especialmente cuando su detección se está realizando sobre muestras del TRS. Muy probablemente, en esta línea de trabajo la estandarización y empleo de la cuantificación de la carga viral en muestra respiratoria será clarificadora, estableciendo el valor umbral de carga viral que estuviera asociado con enfermedad respiratoria.

Financiación

Financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III; cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional "Una manera de hacer Europa" FEDER, Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD12/0015); por el Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Economía y Competitividad (ayudas FIS PI08/0118 y FIS PI11/01864); por la Asociación Catalana de Universidades Públicas (ayuda 2010ACUP_00437).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Bibliografía

- Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet*. 2011; 377:1264-75.
- Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin Infect Dis*. 2011;52 Suppl 4:S284-9.
- Gaydos CA. What is the role of newer molecular tests in the management of CAP? *Infect Dis Clin North Am*. 2013;27:49-69.
- Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R, Tenorio A, Casas I, Pozo F, Ruiz G, et al. Microbiological diagnosis of viral respiratory infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27:168-77.
- Olofsson S, Brittain-Long R, Andersson LM, Westin J, Lindh M. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9:615-26.
- Mahony JB, Petrich A, Smieja M. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2011;48:217-49.
- Hirsch HH, Martino R, Ward KN, Boeckh M, Einsele H, Ljungman P. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis and treatment of human respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, metapneumovirus, rhinovirus, and coronavirus. *Clin Infect Dis*. 2013;56:258-66.
- Pozo F, Casas I, Ruiz G, Falcon A, Pérez Breña P. Application of molecular methods in the diagnosis and epidemiological study of viral respiratory infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26 Suppl 9:15-25.
- Caliendo AM. Multiplex PCR and emerging technologies for the detection of respiratory pathogens. *Clin Infect Dis*. 2011;52 Suppl 4:S326-30.
- Parida MM. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. *J Biosci*. 2008;33:617-28.
- Bhat N, O'Brien KL, Karron RA, Driscoll AJ, Murdoch DR; and Group PMW. Use and evaluation of molecular diagnostics for pneumonia etiology studies. *Clin Infect Dis*. 2012;54 Suppl 2:S153-8.
- Sibley CD, Peirano G, Church DL. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infect Genet Evol*. 2012;12:505-21.
- Jartti T, Jartti L, Ruuskanen O, Söderlund-Venermo M. New respiratory viral infections. *Curr Opin Pulm Med*. 2012;18:271-8.
- Debiaggi M, Canducci F, Ceresola ER, Clementi M. The role of infections and coinfections with newly identified and emerging respiratory viruses in children. *Virology*. 2012;9:247.
- Gerna G, Piralla A, Campanini G, Marchi A, Stronati M, Rovida F. The human bocavirus role in acute respiratory tract infections of pediatric patients as defined by viral load quantification. *New Microbiol*. 2007;30:383-92.
- Wolk DM, Kaleta EJ, Wysocki VH. PCR-electrospray ionization mass spectrometry: the potential to change infectious disease diagnostics in clinical and public health laboratories. *J Mol Diagn*. 2012;14:295-304.
- Ecker DJ, Sampath R, Massire C, Blyn LB, Hall TA, Eshoo MW, et al. Ibis T5000: a universal biosensor approach for microbiology. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:553-8.
- Chiu CY, Urisman A, Greenhow TL, Rouskin S, Yagi S, Schnurr D, et al. Utility of DNA microarrays for detection of viruses in acute respiratory tract infections in children. *J Pediatr*. 2008;153:76-83.
- Raymond F, Carbonneau J, Boucher N, Robitaille L, Boisvert S, Wu WK, et al. Comparison of automated microarray detection with real-time PCR assays for detection of respiratory viruses in specimens obtained from children. *J Clin Microbiol*. 2009;47:743-50.
- Mahony J, Chong S, Merante F, Yaghoobian S, Sinha T, Lisle C, et al. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2965-70.

21. Balada-Llasat JM, LaRue H, Kelly C, Rigali L, Pancholi P. Evaluation of commercial ResPlex II v2.0, MultiCode-PLx, and xTAG respiratory viral panels for the diagnosis of respiratory viral infections in adults. *J Clin Virol.* 2011;50:42-5.
22. Lee WM, Grindle K, Pappas T, Marshall DJ, Moser MJ, Beaty EL, et al. High-throughput, sensitive, and accurate multiplex PCR-microsphere flow cytometry system for large-scale comprehensive detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2626-34.
23. Jordana-Lluch E, Martró Català E, Ausina Ruiz V: Mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30:635-44.
24. Sampath R, Russell KL, Massire C, Eshoo MW, Harpin V, Blyn LB, et al. Global surveillance of emerging Influenza virus genotypes by mass spectrometry. *PLoS One.* 2007;2:e489.
25. Chen KF, Rothman RE, Ramachandran P, Blyn L, Sampath R, Ecker DJ, et al. Rapid identification viruses from nasal pharyngeal aspirates in acute viral respiratory infections by RT-PCR and electrospray ionization mass spectrometry. *J Virol Methods.* 2011;173:60-6.
26. Miller MB, Tang YWCP. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:611-33.
27. Palmenberg AC, Spiro D, Kuzmickas R, Wang S, Djikeng A, Rathe JA, et al. Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. *Science.* 2009;324:55-9.
28. Vijgen L, Moëns E, Keyaerts E, Li S, Van Ranst M. A pancoronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. *Methods Mol Biol.* 2008;454:3-12.
29. Berrueto R, Antón A, Rives S, Català A, Toll T, Ruiz A, et al. Multiplex real-time PCR for prompt diagnosis of an outbreak of human parainfluenza 3 virus in children with acute leukemia. *Infection.* 2013;41:1171-5.
30. Nguyen HT, Fry AM, Gubareva LV. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods. *Antivir Ther.* 2012;17 (1 Pt B):159-73.
31. Pozo F, Lina B, Andrade HR, Enouf V, Kossyvakis A, Broberg E, et al. Guidance for clinical and public health laboratories testing for influenza virus antiviral drug susceptibility in Europe. *J Clin Virol.* 2013;57:5-12.
32. Martínez DA, Nelson MA. The next generation becomes the now generation. *PLoS Genet.* 2010;6:e1000906.
33. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11:31-46.
34. Glenn TC. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour.* 2011;11:759-69.
35. Rykkvin R, Kilander A, Dudman SG, Hungnes O. Within-patient emergence of the influenza A(H1N1)pdm09 HA1 222G variant and clear association with severe disease, Norway. *Euro Surveill.* 2013;18(3). pii: 20369.
36. Okomo-Adhiambo M, Sheu TC, Gubareva LV. Assays for monitoring susceptibility of influenza viruses to neuraminidase inhibitors. *Influenza Other Respi Viruses.* 2013;7 Suppl 1:44-9.