



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.

Virus respiratorios: viejos y nuevos virus. Revisión de métodos diagnósticos

José María Navarro-Marí y Mercedes Pérez-Ruiz

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

Las infecciones respiratorias agudas de etiología viral se encuentran entre las principales causas de morbimortalidad infecciosa en el mundo. Junto a los virus tradicionalmente reconocidos, como los de la gripe, virus respiratorio sincitial, rinovirus, parainfluenza 1 a 4 y adenovirus, se han incorporado otros virus, como metaneumovirus, nuevos coronavirus (coronavirus humanos NL63 y HKU1 y coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo grave [SRAG]) y, recientemente, los bocavirus. Aunque la mayoría de estas viriasis son clínicamente benignas y autolimitadas cuando afectan a adultos sanos, sus repercusiones sanitarias se incrementan cuando afectan a niños, ancianos o personas inmunodeprimidas o con enfermedades crónicas de base. Son una importante causa de hospitalización y defunción, fundamentalmente en los meses fríos y, desde el punto de vista sociosanitario, suponen un gran consumo de recursos económicos y una frecuente causa de absentismo laboral. Ocasionalmente, algunos de estos virus dan lugar a problemas sanitarios emergentes en todo el mundo, como sucede con las cepas pandémicas de gripe o el coronavirus asociado al SRAG. Si bien para los virus respiratorios tradicionales los métodos de diagnóstico clásicos, basados en el cultivo y la detección de antígenos, siguen siendo útiles, para los virus recientemente descritos el diagnóstico se realiza fundamentalmente por técnicas de amplificación genómica.

Palabras clave: Infección respiratoria aguda. Virus respiratorios. Diagnóstico virológico.

Respiratory viruses: old and new. Review of diagnostic methods

Acute respiratory infections (ARI) of viral origin are one of the main causes of morbidity and mortality worldwide. In addition to traditional viruses, such as the influenza virus, respiratory syncytial virus, rhinovirus, parainfluenza viruses 1 to 4, and adenovirus, other viruses such as

metapneumovirus, new coronaviruses (human coronavirus NL63 and HKU1 and severe acute respiratory syndrome [SARS]-coronavirus), and recently bocaviruses, have been identified as causal agents of ARI. Although most of these viral infections follow a benign and self-limiting course in healthy adults, the consequences for the health care systems increase when they involve children, the elderly, immunosuppressed individuals, or those with chronic underlying diseases. These viral infections are an important cause of hospitalization and death, mainly during the cold months of the year, and, from a social-health perspective, ARI are a drain on economic resources and a frequent cause of work absenteeism. Occasionally, some of these viruses may cause emergent world health problems, as has occurred with the influenza virus pandemic strain and SARS-coronavirus. While classical diagnostic methods based on culture and antigen detection remain useful for traditional respiratory viruses, recently described viruses are diagnosed mainly by molecular amplification techniques.

Key words: Acute respiratory infection. Respiratory viruses. Virological diagnosis.

Introducción

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) de etiología viral son, en conjunto, los procesos infecciosos más frecuentes de los que afectan a humanos. Incluyen desde síndromes clínicos muy leves, como el resfriado común, a cuadros más graves, como bronquiolitis o neumonía. Aunque, en general, son de curso benigno y autolimitado, algunas de ellas, como las infecciones por virus de la gripe y por virus respiratorio sincitial (VRS), se encuentran entre las causas más importantes de hospitalización durante los meses fríos en los países de nuestro entorno^{1,2}, bien por ocasionar cuadros graves de forma directa, como bronquiolitis o neumonía³, o bien de forma indirecta, por las complicaciones que conllevan, y contribuyen, en gran medida, a la mortalidad general durante este período. Ocasionalmente, además, un importante incremento del gasto sanitario, derivado sobre todo del tratamiento de las complicaciones y el uso inapropiado de antibióticos^{4,5}, así como importantes repercusiones socioeconómicas, por las inca-

Correspondencia: Dr. J.M. Navarro-Marí.
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves.
Avda. Fuerzas Armadas, 2. 18014 Granada. España.
Correo electrónico: josem.navarro.sspa@juntadeandalucia.es

pacidades laborales transitorias⁶. Son las personas mayores de 60 años, menores de 2 años y pacientes con problemas de base (cardiopatías, broncopatías crónicas, inmunodeficiencias, etc.) los más susceptibles a presentar episodios graves tras una IRA de etiología viral⁷⁻¹¹. Por otro lado, algunos de estos virus pueden causar procesos que constituyan emergencias sanitarias a escala mundial, como ha sucedido con las diferentes pandemias de gripe¹² o la aparición del síndrome respiratorio agudo grave (SRAG) por coronavirus (CoV)^{13,14}.

Clásicamente, en el epígrafe de virus respiratorios se han incluido: el VRS, el virus de la gripe A y B, el virus parainfluenza 1 a 4, el adenovirus, el rinovirus, el CoV 229E y OC43 y algunos enterovirus. Con el desarrollo de las técnicas moleculares para diagnóstico de estos procesos, en los últimos años, a esta lista se han añadido otros virus: metapneumovirus (hMPV)¹⁵, CoV NL63^{16,17} y HKU1¹⁸ y bocavirus (BoV)¹⁹.

Los virus respiratorios tienen distribución mundial y siguen patrones estacionales de aparición, más o menos típicos, según el virus de que se trate²⁰⁻²². Los tratamientos antivirales están suficientemente desarrollados y evaluados sólo para gripe y VRS, y pueden resultar efectivos en algunas circunstancias^{23,24}. En España, aparte de por los virus respiratorios clásicos, ya se han comunicado casos de IRA por los virus de más reciente descripción^{11,25-30}.

Para el diagnóstico de las IRA virales se dispone de múltiples procedimientos y cada laboratorio debe determinar cuáles son los más adecuados para utilizar según el tipo de hospital, las características de la población que atiende, la necesidad de disponer de forma más o menos urgente de los resultados, la dotación en cuanto a personal e infraestructura, etc.

Básicamente, podemos diferenciar métodos directos de detección del virus en la muestra clínica que incluirían el cultivo, las técnicas de detección de antígeno y los métodos moleculares, y los métodos indirectos de medida de la respuesta serológica^{31,32}. En general, el diagnóstico serológico es poco útil en la práctica clínica diaria para el diagnóstico de infecciones virales muy prevalentes, que ocasionan frecuentes reinfecciones y que afectan, fundamentalmente, a las mucosas, como ocurre con las IRA, por lo que en esta revisión comentaremos, fundamentalmente, los aspectos relacionados con el diagnóstico directo de estas infecciones.

Muestras adecuadas para el diagnóstico

Para la obtención de resultados fiables es fundamental que la muestra sea de buena calidad. En general, se consideran idóneas el aspirado nasofaríngeo, el lavado nasal, el escobillón nasal más escobillón faríngeo y el escobillón faríngeo. En caso necesario, también son útiles muestras invasivas, como el lavado broncoalveolar o el material de biopsias respiratorias. Las muestras se enviarán lo más urgentemente posible a microbiología, preferiblemente refrigeradas, y los escobillones deben incluirse en medio de transporte adecuado para virus. Deben procesarse lo más pronto posible y, si no se procesan inmediatamente, se deben mantener a 4 °C hasta un máximo de 48 h. Si la demora en el procesamiento se prevé mayor, se deben congelar a temperaturas inferiores a -70 °C. La conservación inadecuada de la muestra o la demora en su procesamiento repercuten negativamente en el diagnóstico.

Aislamiento de los virus respiratorios en cultivo celular

El aislamiento del virus en cultivo a partir de muestra clínica, fundamentalmente utilizando líneas celulares (LC), ha sido clásicamente el procedimiento de referencia en el diagnóstico de las viriasis respiratorias, aunque en la práctica sólo puede llevarse a cabo en laboratorios con una alta dotación tecnológica. El cultivo presenta las ventajas de poder disponer de las cepas para estudios adicionales: serotipificación, pruebas de sensibilidad, estudios epidemiológicos, etc., y de ser un sistema abierto que permite detectar, en principio, cualquiera de los virus causantes del proceso frente al resto de técnicas que comentaremos que, en principio, deben ir dirigidas frente a un microorganismo concreto.

No existe ninguna LC en la que sean capaces de replicarse todos los virus respiratorios, de la misma forma que no existe ningún virus capaz de replicar en todas ellas, lo que obliga a realizar la siembra de la muestra en diferentes líneas que, en conjunto, cubran el abanico de virus que pretendemos detectar. Las más utilizadas en las IRA y los virus a los que son sensibles se muestran en la tabla 1.

El tiempo medio de crecimiento de los virus respiratorios en cultivo celular, hasta hacerse evidente por la presencia de efecto citopático más o menos característico, aunque varía según el virus, suele oscilar en torno a los 5-

TABLA 1. Comparación de crecimiento en cultivo celular de los diferentes virus respiratorios

Virus	Línea celular				
	Hep-2	MRC-5	LLC-MK2	MDCK	A-549
VRS	++	+	+	-	+/-
Gripe	-	+/-	+	++	-
Adenovirus	++	+	-	-	++
Parainfluenza	+	-	++	-	+/-
Rinovirus	+/-	++	-	-	-
Coronavirus	-	-	-	-	-
Metaneumovirus	+	-	+	-	-
Bocavirus	-	-	-	-	-

A549: carcinoma de pulmón humano; Hep-2: carcinoma de laringe; LLC-MK2: riñón de mono rhesus; MDCK: riñón canino Cocker Spaniel; MRC-5: fibroblastos de pulmón embrionario humano.

7 días, a los que hay que sumar 24-48 h hasta la confirmación definitiva. Esta importante demora en la obtención de resultados hace que, en gran medida, el diagnóstico clásico por cultivo pierda mucha utilidad en la práctica clínica diaria.

Para resolver en parte estos inconvenientes del cultivo tradicional, se ha desarrollado la técnica de *shell-vial* (SV) que, sin perder la especificidad y las ventajas del cultivo, permite un diagnóstico en un tiempo mucho menor. La muestra se inoculara por centrifugación en una monocapa crecida en un cubreobjetos circular, que se deposita en un tubo de fondo plano. Tras un periodo de incubación de 18-48 h, se extrae el cubreobjetos y se realiza una inmunofluorescencia (IF) sobre la monocapa con anticuerpos monoclonales frente a antígenos del virus que queremos detectar. Dada la necesidad de utilizar varias LC para poder aislar todos los virus respiratorios, recientemente se ha propuesto la utilización en la técnica de SV de cocultivos de distintas LC crecidas sobre un mismo portaobjetos, lo que permite detectar los distintos virus en un solo tubo^{33,37}.

En la actualidad, a los problemas reseñados del diagnóstico por cultivo, hay que sumar que la mayoría de los nuevos virus que se están describiendo implicados en IRA, como se muestra en la tabla 1, no se replica, o lo hace muy mal, en las LC más utilizadas hasta la fecha.

Técnicas de detección de antígeno

La utilización de anticuerpos monoclonales en el diagnóstico de las infecciones virales ha permitido facilitar la identificación de los aislamientos que se llevan a cabo en cultivo y el desarrollo de metodologías que permiten el diagnóstico directamente a partir de muestras clínicas³⁸. De ellas, las más utilizadas son la IF, técnicas inmunoenzimáticas (EIA) y la inmunocromatografía (IC). En general, estos procedimientos presentan la ventaja teórica sobre el cultivo de poder detectar en la muestra virus no viables, incapaces de replicarse; pero en ningún caso se ha conseguido una sensibilidad o especificidad equiparables al cultivo.

La IF es la técnica más versátil y la que permite detectar un mayor número de virus, ya que para la mayoría de ellos existen anticuerpos monoclonales de los que se puede disponer comercialmente³⁹. Se requiere un microscopio de

fluorescencia y entrenamiento en la observación de las preparaciones. Se han obtenido mejores resultados con VRS y gripe que con el resto de los virus respiratorios, probablemente por la mayor carga viral en las secreciones nasofaríngeas. La preparación de la extensión también repercute en los resultados; se ha mostrado la utilización de citocentrífuga como el procedimiento más idóneo para tal fin⁴⁰.

Las métodos de EIA, aunque se han simplificado mucho en su diseño, y permiten individualizar la técnica para cada muestra y una realización en un corto lapso, requieren varios pasos y precisan de atención constante durante su ejecución^{41,42}, por lo que se están sustituyendo progresivamente por las técnicas de IC, mucho más simples.

Tanto las técnicas de EIA como las de IC se han desarrollado fundamentalmente para el diagnóstico rápido del VRS y de los virus de la gripe⁴³⁻⁵¹. No obstante, los resultados obtenidos, sobre todo en cuanto a sensibilidad, varían mucho según el equipo comercial utilizado, la muestra y la edad de la población estudiada. En este sentido se ha observado que, si bien en pacientes pediátricos algunas de estas pruebas pueden ser útiles, su rendimiento es muy bajo cuando se utilizan en población adulta⁵². Por tanto, se impone cierta cautela a la hora de seleccionar el producto que se utilizará. En la tabla 2 se comparan algunas de las técnicas de detección de antígeno más utilizadas para el VRS y el virus de la gripe.

Técnicas moleculares para la detección de virus respiratorios

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) han supuesto una alternativa muy útil para el diagnóstico de los virus respiratorios, sobre todo para los laboratorios en los que el cultivo celular no estaba disponible. La técnica más comúnmente utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aunque hay otras TAAN que también se han empleado en la detección de estos virus, como es la amplificación isotérmica^{53,54}. Ofrecen 2 ventajas principales con respecto al cultivo: no requieren virus viables y se pueden obtener resultados en menor tiempo. Además, las TAAN son la única posibilidad existente en la actualidad para detectar nuevos virus respiratorios emergentes, como los BoV y nuevos CoV. En el caso de los hMPV, aunque se ha aislado de cultivo celular y se han comercializado algunos equipos de detección de anti-

TABLA 2. Técnicas comerciales para la detección de antígeno de virus respiratorio sincitial y gripe

	Sensibilidad	Especificidad	Tiempo de proceso (min)	Referencias
Directigen RSV ^a	0,78	0,98	20	41
TestPack RSV ^a	0,75	0,99	30	41
IFD RSV	0,85-0,93	0,98	45	41, 52
RSV OIA ^a	0,88	0,99	20	43
Now RSV ^b	0,89-0,97	1,00	15	47, 48, 52
Directigen EZ RSV ^a	0,59	0,98	15	52
Flu-OIA test ^a	0,54	0,74	20	44, 46
Directigen FLU A/B ^a	0,82/0,51	0,92/0,84	20	42, 49
Cytospin-IFD ^c FLU A	0,92	0,99	45	40, 49
Now Flu A y B ^b	0,62-0,76	0,93-0,98	15	34, 49

^aTécnica inmunoenzimática.

^bInmunocromatografía.

^cIFD: inmunofluorescencia directa.

geno³⁹, que podrían emplearse tanto a partir de muestras clínicas como de cultivo celular, las TAAN son las más sensibles hasta la fecha para detectar este virus. Actualmente, además, se consideran más sensibles que el cultivo para detección de los virus respiratorios más comunes. Así, aunque el cultivo celular ha sido el patrón de oro para el diagnóstico de virus de la gripe, se ha propuesto a las TAAN como el nuevo método de referencia⁵⁵.

En principio, estas técnicas tienen una desventaja que no ofrecería el cultivo para los virus tradicionales, y es que no son un sistema abierto. Se debe conocer, al menos en parte, el genoma del virus que se quiere detectar, y las técnicas moleculares deben diseñarse para la detección de un virus específico, aunque esta desventaja se ha solventado en parte con diversos formatos de amplificación múltiple, en los que simultáneamente se pueden identificar numerosos virus⁵⁶⁻⁶⁰.

Otra desventaja original de las TAAN con respecto al cultivo es que requerían mayor tiempo de ejecución que el cultivo, dividido a su vez en numerosos procesos: extracción de ácidos nucleicos, retrotranscripción (para virus ARN), amplificación y detección, sobre todo cuando se emplean métodos de PCR anidada para aumentar la sensibilidad de la técnica. Actualmente, la combinación de métodos automatizados de extracción de ácidos nucleicos con TAAN en tiempo real ha simplificado enormemente el proceso completo. Los sistemas automatizados de extracción permiten procesar un elevado número de muestras con un tiempo de preparación mínimo y las nuevas TAAN, como la PCR en tiempo real, simultanean amplificación y detección, lo cual evita el manejo de los productos postamplificación y, por tanto, el riesgo de contaminación en el laboratorio de biología molecular. Estos nuevos formatos ofrecen sensibilidad y especificidad equiparables a los formatos clásicos de PCR convencional y mayor rapidez en la obtención de resultados (de 10 h para PCR convencional a 4 h para protocolos de PCR en tiempo real), así como mayor rapidez y simplicidad en la ejecución del procedimiento (de 3 h pasaría a 1 h, aproximadamente)³¹. Se han publicado protocolos de PCR en tiempo real para prácticamente todos los virus respiratorios que se investigan en la actualidad^{57,61-64}.

Actualmente, la mayoría de las TAAN empleadas por los laboratorios de virología son métodos "caseros" que pueden variar de un laboratorio a otro; aunque hay publicada mucha bibliografía referente a las TAAN para la detección de virus respiratorios, ésta es enormemente versátil, de forma que cualquier laboratorio puede adaptar estos protocolos a su sistema de trabajo, en función de las necesidades y demanda y de la población que atiende. Es-

tas técnicas serán en un futuro la forma de diagnosticar estas viriasis, porque cabe esperar un aumento de la disponibilidad de equipos comerciales optimizados que eviten el trabajo que ahora supone poner a punto estos protocolos. Además, esta mayor disponibilidad permitirá establecer controles de calidad entre los laboratorios de virología clínica para la continua evaluación y mejora de los métodos diagnósticos de detección de estos virus.

Perspectivas futuras del diagnóstico molecular de los virus respiratorios

Existe un interés creciente en muchos laboratorios por mejorar los métodos moleculares de diagnóstico de los virus respiratorios para conseguir la simplificación del proceso y una mayor rapidez diagnóstica, mediante automatización de los formatos existentes o empleando nuevos formatos de amplificación o detección, como sería el caso de los *arrays* (chips) de ácidos nucleicos^{65,66}. Estos formatos deberían ser sistemas abiertos que permitieran identificar también virus respiratorios nuevos, emergentes y reemergentes.

Compatibilidad de los métodos diagnósticos clásicos y nuevos

En términos generales, la utilidad de los diferentes procedimientos comentados para distintos virus respiratorios se describe en la tabla 3. Dado que el VRS y los virus de la gripe son los más frecuentemente detectados, las técnicas rápidas de detección de antígeno, especialmente en períodos epidémicos y en población pediátrica, son muy útiles, y por su simplicidad se pueden emplear en laboratorios de hospitales de cualquier tipo como determinación de urgencia, lo cual facilita el manejo del paciente y permite optimizar los recursos empleados ante el impacto que generan las epidemias anuales de VRS y gripe en los sistemas sanitarios. Pero tienen una sensibilidad en muchos casos baja, por lo que no deben utilizarse como único procedimiento para establecer el diagnóstico definitivo, sobre todo en aquellas muestras con resultado negativo. Por el contrario, las TAAN actuales de que disponemos para detectar virus respiratorios tradicionales requieren personal entrenado, al igual que el diagnóstico mediante cultivo celular, aunque las primeras permitirían un diagnóstico más rápido.

Parece que las técnicas moleculares estén destinadas a sustituir a los métodos clásicos de cultivo celular, por su mayor versatilidad, para la detección de todos estos virus. Sin embargo, hoy día, hasta que no aparezcan métodos

TABLA 3. Procedimientos diagnósticos útiles en las principales viriasis respiratorias

Virus	Cultivo tradicional	Cultivo en SV	Detección de antígeno	Biología molecular
VRS	++	+++	+	++
Gripe A y B	++	+++	+	++
Parainfluenza 1-4	++	++	+/-	++
Adenovirus	++	++	+/-	++
Rinovirus	++	-	-	+++
Coronavirus	-	-	-	+++
Metapneumovirus	+	-	+/-	+++
Bocavirus	-	-	-	+++

SV: *shell vial*.

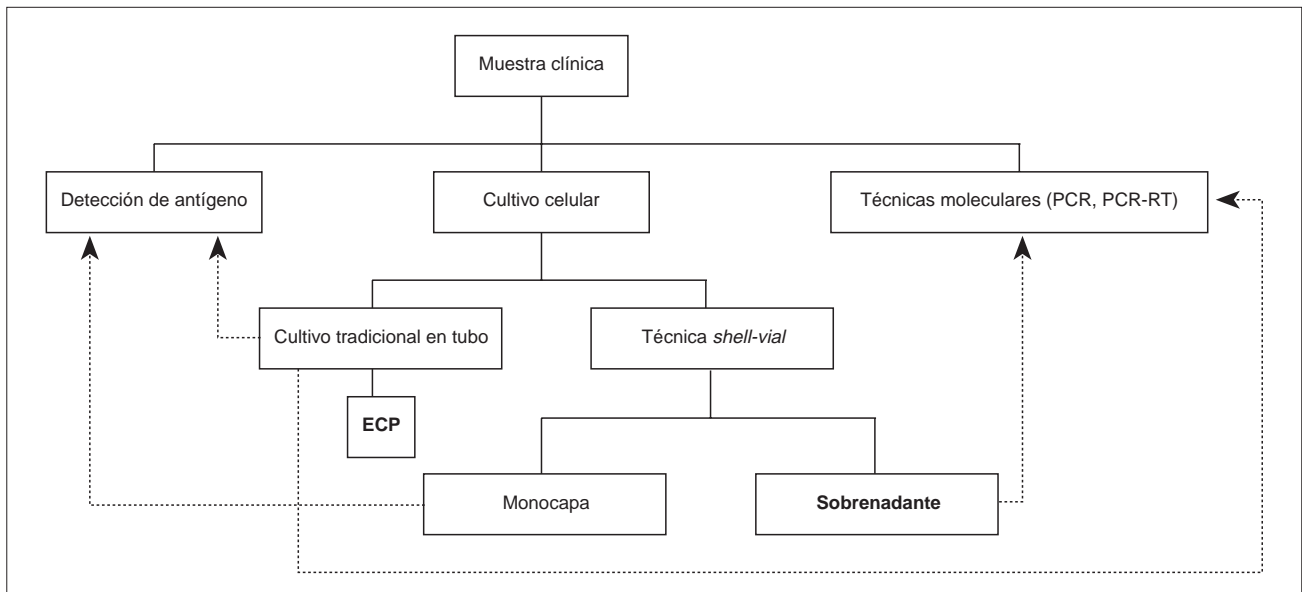


Figura 1. Técnicas y/o combinación de técnicas que se pueden emplear para el diagnóstico de las viriasis respiratorias. PCR: reacción en cadena de la polimerasa; PCR-RT: PCR en tiempo real.

moleculares totalmente automatizados, la técnica rápida de SV permite dar un diagnóstico presuntivo o definitivo de los principales virus respiratorios en 48 h.

Una aplicación añadida de las TAAN es su empleo como técnica de detección de replicación de virus en cultivo celular, ya que es mucho más sensible que las técnicas de IF para detección de antígeno^{39,67}. Esto es especialmente útil cuando se requiere recuperar la cepa para posteriores estudios, como se demanda en laboratorios pertenecientes a redes de vigilancia virológica (vigilancia de gripe, planes de erradicación de polio y sarampión, etc.). Por tanto, las TAAN no tienen por qué sustituir y desplazar al cultivo celular en todos los casos, sino que pueden suponer una herramienta muy sensible para detectar aislados. La combinación de técnicas nuevas y clásicas, en función de la disponibilidad de cada laboratorio, puede aumentar enormemente el rendimiento diagnóstico en las infecciones respiratorias virales y, por consiguiente, permitir una aproximación mayor al impacto real que supone este tipo de infecciones en la población. Un esquema de las posibilidades diagnósticas de los virus respiratorios se muestra en la figura 1.

En situaciones particulares, como en la fase actual de alerta preepidémica gripal, en la que se impone una vigilancia especial de la circulación del virus de la gripe aviar H5N1, debemos seguir estrictamente las recomendaciones de los comités de expertos de la OMS⁶⁸.

Bibliografía

1. Neuzil KM, Maynard C, Griffin MR, Heagerty P. Winter respiratory viruses and health care use: a population-based study in the northwest united states. *Clin Infect Dis.* 2003;37:201-7.
2. Navarro-Marí JM, Palacios E, Pérez M, De la Rosa M. The impact of influenza viruses on hospitalizations in infants younger than two years old during epidemics of respiratory syncytial virus infection. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9:959-63.
3. Murata Y, Walsh EE, Falsey AR. Pulmonary complications of interepidemic influenza A in hospitalized adults. *J Infect Dis.* 2007;195:1029-37.

4. Gonzales R, Malone DC, Maselli JH, Sande MA. Excessive antibiotic use for acute respiratory infections in the United States. *Clin Infect Dis.* 2001;33: 757-62.
5. Neuzil KM, Mellen BG, Wright PF, Mitchel EF, Griffin MR. The effect of influenza on hospitalizations, outpatient visits, and courses of antibiotics in children. *N Engl J Med.* 2000;342:225-31.
6. Barenfanger J, Drake C, Leon N, Mueller T, Troutt T. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2824-8.
7. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med.* 2005;352:1749-59.
8. Shields AF, Hackman RC, Fife KH, Corey L, Meyers JD. Adenovirus infections in patients undergoing bone-marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1985;312:529-33.
9. Dare R, Sanghavi S, Bullotta A, Keightley M, George K, Wadowsky R, et al. Diagnosis of human metapneumovirus infection in immunosuppressed lung transplant recipients and children evaluated for pertussis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:548-52.
10. Ison M. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2006;43:331-9.
11. Williams JV, Martino R, Rabella N, Otegui M, Parody R, Heck J, et al. A prospective study comparing human metapneumovirus with other respiratory viruses in adults with hematologic malignancies and respiratory tract infections. *J Infect Dis.* 2005;192:1061-5.
12. Belshe RB. The origins of pandemic influenza—lessons from the 1918 virus. *N Engl J Med.* 2005;353:2209-11.
13. Ksiazek T, Erdman D, Goldsmith C, Zaki S, Peret T, Emery S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348:1953-66.
14. Drosten C, Gunther S, Preiser W, Van der Werf S, Brodt H, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348:1967-76.
15. Van den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J, Kuiken T, De Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med.* 2004;7:719-24.
16. Fouchier RM, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, De Jong JC, Simon JH, et al. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:6212-6.
17. Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med.* 2004;10:368-73.
18. Woo PC, Lau SK, Chu C, Chan K, Tsoi H, Huang Y, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol.* 2005;79:884-95.
19. Allander T, Tammi T, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respi-

- ratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:12891-6. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:15712.
20. Selwyn BJ. The epidemiology of acute respiratory tract infection in young children: comparison of findings from several developing countries. *Rev Infect Dis* 1990;12:S870-S88.
 21. Klein M, Coviello S, Bauer G, Benitez A, Serra M, Schiatti M, et al. The impact of infection with human metapneumovirus and other respiratory viruses in young infants and children at high risk for severe pulmonary disease. *J Infect Dis*. 2006;193:1544-51.
 22. Williams JV, Harris P, Tollefson S, Halburnt-Rush L, Pingsterhaus J, Edwards K, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med*. 2004; 350:443-50.
 23. Jefferson T, Demicheli V, Rivetti D, Jones M, Di Pietrantonj C, Rivetti A. Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review. *Lancet*. 2006;367:303-13. Erratum in: *Lancet*. 2006;367:322.
 24. Jafri HS. Treatment of respiratory syncytial virus: antiviral therapies. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22 Suppl 2:S89-92.
 25. Vicente D, Montes M, Cilla G, Perez-Trallero E. Human metapneumovirus and chronic obstructive pulmonary disease. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:1338-9.
 26. Garcia-Garcia ML, Calvo C, Perez-Breña P, De Cea JM, Acosta B, Casas I. Prevalence and clinical characteristics of human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain. *Pediatr Pulmonol*. 2006;41:863-71.
 27. Garcia-Garcia ML, Calvo C, Martin F, Perez-Breña P, Acosta B, Casas I. Human metapneumovirus infections in hospitalised infants in Spain. *Arch Dis Child*. 2006;91:290-5.
 28. Ordas J, Boga JA, Alvarez-Arguelles M, Villa L, Rodriguez-Dehli C, De Oña M, et al. Role of metapneumovirus in viral respiratory infections in young children. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2739-42.
 29. Vicente D, Montes M, Cilla G, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Differences in clinical severity between genotype A and genotype B human metapneumovirus infection in children. *Clin Infect Dis*. 2006;42:111-3.
 30. Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Yarza EG, Pérez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. [accedido 2 Abril 2007]. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:636-7. Disponible en: <http://www.cdc.gov/eid/content/13/4/06-1501.htm>
 31. Henrickson KJ. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23 Suppl 1:S6-10.
 32. Leland D, Ginocchio C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:49-78.
 33. Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, Carroll KC. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J Clin Microbiol*. 2004;42:79-82.
 34. Fader RC. Comparison of the Binax NOW Flu A enzyme immunochromatographic assay and R-Mix shell vial culture for the 2003-2004 influenza season. *J Clin Microbiol*. 2005;43:6133-5.
 35. Huang YT, Hite MS, Duane MT, Yam P, Jollinck JA, Goodrum GR. Application of mixed cell lines for detection of viruses from clinical specimens. *Clin Microbiol Newsl*. 2000;22:89-92.
 36. Navarro-Mari JM, Sanbonmatsu-Gómez S, Pérez-Ruiz M, Rosa-Fraile M. Rapid detection of respiratory viruses by shell vial assay using simultaneous culture of Hep-2, LLC-MK2 and MDCK cells in a single vial. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2346-7.
 37. Weinberg A, Brewster L, Clark J, Simoes E, ARIVAC consortium. Evaluation of R-Mix shell vials for the diagnosis of viral respiratory tract infections. *J Clin Virol*. 2004;30:100-5.
 38. Rovida F, Percivalle E, Zavattoni M, Torsellini M, Sarasini A, Campanini G, et al. Monoclonal antibodies versus reverse transcription-PCR for detection of respiratory viruses in a patient population with respiratory tract infections admitted to hospital. *J Med Virol*. 2005;75:336-47.
 39. Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H. Detection of Human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent-antibody test. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1138-41.
 40. Landry ML, Cohen S, Ferguson D. Impact of sample type on rapid detection of influenza virus A by cytospin-enhanced immunofluorescence and membrane enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*. 2000;38:429-30.
 41. Mendoza J, Rojas A, Navarro JM, Plata C, De la Rosa M. Evaluation of three rapid enzyme immunoassays and cell culture for detection of respiratory syncytial virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1992;11:452-4.
 42. Reina J, Padilla E, Alonso F, Ruiz de Gopegui E, Munar M, Mari M. Evaluation of a new dot blot enzyme immunoassay (Directigen flu A+B) for simultaneous and differential detection of influenza A and B virus antigens from respiratory samples. *J Clin Microbiol*. 2002;40:3515-7.
 43. Aldous W, Gerber K, Taggart EW, Rupp J, Wintch J, Daly JA. A comparison of Thermo Electron™ RSV OIA to viral culture and direct fluorescent assay testing for respiratory syncytial virus. *J Clin Virol*. 2005;32:224-8.
 44. 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;39:730-2.
 45. Borek AP, Clemens SH, Gaskins VK, Aird DZ, Valsamaki A. Respiratory syncytial virus detection by Remel Xpect, Binax Now RSV, direct immunofluorescent staining, and tissue culture. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1105-7.
 46. Hindiye H, Goulding C, Morgan H, Kenyon B, Langer J, Fox L, et al. Evaluation of BioStar® FLU OIA® assay for rapid detection of influenza A and B viruses in respiratory specimens. *J Clin Virol*. 2000;17:119-26.
 47. Jonathan N. Diagnostic utility of BINAX NOW RSV—an evaluation of the diagnostic performance of BINAX NOW RSV in comparison with cell culture and direct immunofluorescence. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006;5:13.
 48. Pérez-Ruiz M, Fernández-Roldan C, Navarro JM, De la Rosa M. Evaluación preliminar de nuevos métodos de detección de antígeno para el diagnóstico rápido de virus respiratorio sincitial. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21:599-604.
 49. Smit M, Beynon K, Murdoch D, Jennings L. Comparison of the NOW Influenza A & B, NOW Flu A, NOW Flu B, and Directigen Flu A+B assays, and immunofluorescence with viral culture for the detection of influenza A and B viruses. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;57:67-70.
 50. Weinberg A, Walker ML. Evaluation of three immunoassay kits for rapid detection of influenza virus A and B. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12:367-70.
 51. Zheng X, Quianzon S, Mu Y, Katz B. Comparison of two new rapid antigen detection assays for respiratory syncytial virus with another assay and shell vial culture. *J Clin Virol*. 2004;31:130-3.
 52. Ohm-Smith MJ, Nassos PS, Haller BL. Evaluation of the Binax NOW, BD Directigen, and BD Directigen EZ assays for detection of respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:2996-9.
 53. Shirato K, Nishimura H, Saijo M, Okamoto M, Noda M, Tashiro M, et al. Diagnosis of human respiratory syncytial virus infection using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Method*. 2007;139:78-84.
 54. Ushio M, Yui I, Yoshida N, Fujino M, Yonekawa T, Ota Y, et al. Detection of respiratory syncytial virus genome by subgroups-A, B specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Med Virol*. 2005;77:121-7.
 55. Ellis JS, Zambon MC. Molecular diagnosis of influenza. *Rev Med Virol*. 2002;12:375-89.
 56. Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Perez-Breña P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol*. 2004;72:484-95.
 57. Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MFC, Kroes ACM, Claas ECJ. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:1564-9.
 58. Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods*. 2005;126:53-63.
 59. Kehl SC, Henrickson KJ, Hua W, Fan J. Evaluation of the Hexaplex Assay for Detection of Respiratory Viruses in Children. *J Clin Microbiol*. 2001;39:1696-1701.
 60. Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, et al. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol*. 2006;78:1498-504.
 61. Lu X, Chittaganpitch M, Olsen SJ, Mackay IM, Sloots TP, Fry AM, et al. Real-time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3231-5.
 62. Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB, Quinto JD, Chu M, De Graaf M, et al. Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumovirus from all known genetic lineages. *J Clin Microbiol*. 2004;42:981-6.
 63. Lau SK, Woo PC, Yip CC, Tse H, Tsoi HW, Cheng VC, et al. Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2063-71.
 64. Kuypers J, Wright N, Morrow R. Evaluation of quantitative and type-specific real-time RT-PCR assays for detection of respiratory syncytial virus in respiratory specimens from children. *J Clin Virol*. 2004;31:123-9.
 65. Coiras MT, Lopez-Huertas MR, Lopez-Campos G, Aguilar JC, Perez-Breña P. Oligonucleotide array for simultaneous detection of respiratory viruses using a reverse-line blot hybridization assay. *J Med Virol*. 2005;76:256-64.
 66. Townsend MB, Dawson ED, Mehlmann M, Smagala JA, Dankbar DM, Moore CL, et al. Experimental evaluation of the FluChip diagnostic microarray for influenza virus surveillance. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2863-71.
 67. Choo YJ, Kim SJ. Detection of human adenoviruses and enteroviruses in Korean oysters using cell culture, integrated cell culture-PCR, and direct PCR. *J Clin Microbiol*. 2006;44:162-70.
 68. WHO. Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR). [accedido 25 Mar 2007]. Disponible en: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines-topics/en/index1.html