

Aplicación de los métodos moleculares al diagnóstico y el estudio epidemiológico de las infecciones respiratorias causadas por virus

Francisco Pozo, Inmaculada Casas, Guillermo Ruiz, Ana Falcón y Pilar Pérez-Breña

Laboratorio de Gripe y Virus Respiratorios. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. España.

Hasta la fecha se han identificado más de 200 virus pertenecientes a 6 familias taxonómicas diferentes asociados con la infección del tracto respiratorio humano. La utilización generalizada de métodos moleculares en los laboratorios de microbiología clínica no sólo ha aportado grandes ventajas al diagnóstico de estas infecciones, sino también está permitiendo profundizar en el conocimiento de la enfermedad y el comportamiento epidemiológico de los virus causantes. Esta tecnología incrementa de manera notable el rendimiento de detección de virus en las muestras respiratorias, debido a su elevada sensibilidad en comparación con las técnicas clásicas y a la posibilidad de identificar virus no cultivables o de crecimiento fastidioso en las líneas celulares habituales, lo que permite realizar el diagnóstico etiológico con mayor rapidez. Sin embargo, también comporta algunos inconvenientes, como son detectar virus que se encuentran colonizando la mucosa respiratoria de personas asintomáticas, o en secreciones de pacientes que ya se han recuperado de una infección pasada, a consecuencia de excreción prolongada de éstos. La secuenciación de los productos obtenidos en la reacción de amplificación genómica permite caracterizar de forma adicional los virus detectados mediante su genotipado, realizar estudios de epidemiología molecular e identificar resistencias a determinados antivirales, por citar sólo algunos ejemplos.

Palabras clave: Diagnóstico molecular. Epidemiología molecular. Reacción en cadena de la polimerasa. Gripe. Virus respiratorios. Infección respiratoria.

Application of molecular methods in the diagnosis and epidemiological study of viral respiratory infections

To date, more than two hundred viruses, belonging to six different taxonomic families, have been associated with

human respiratory tract infection. The widespread incorporation of molecular methods into clinical microbiology laboratories has not only led to notable advances in the etiological diagnosis of viral respiratory infections but has also increased insight into the pathology and epidemiological profiles of the causative viruses. Because of their high sensitivity, molecular techniques markedly increase the efficiency of viral detection in respiratory specimens, particularly those that fail to propagate successfully in common cell cultures, thus allowing more rapid etiologic diagnosis. However, there are also some disadvantages in the use of these new technologies such as detection of viruses that merely colonize the respiratory tract of healthy people, or those found in the nasopharyngeal secretions of patients who have recovered from respiratory infections, due to long-term viral shedding, when the viruses are unlikely to act as pathogens. Additionally, sequencing of the amplification products allows further characterization of detected viruses, including molecular epidemiology, genotyping, or detection of antiviral resistance, to cite only a few examples.

Key words: Molecular diagnosis. Molecular Epidemiology. PCR. Influenza. Respiratory viruses. Respiratory infection.

Introducción

La infección respiratoria aguda (IRA) es la enfermedad más frecuente en la vida del ser humano. En la mayoría de los casos, estas infecciones sólo afectan al tracto respiratorio superior y pueden considerarse leves. Sin embargo, se estima que alrededor del 5% pueden afectar al tracto respiratorio inferior, y constituir infecciones potencialmente graves, en niños, ancianos y pacientes inmunodeprimidos o con enfermedad pulmonar subyacente. Según los datos publicados en una revisión reciente realizada en España en pacientes en edad infantil¹, las IRA constituyen aproximadamente el 70% de las enfermedades infecciosas que son motivo de consulta en pediatría extrahospitalaria y, de ellas, más de la mitad tiene un origen viral.

Hasta la fecha se han identificado más de 200 virus diferentes implicados en la patogenia de los distintos cuadros que pueden reconocerse en la IRA (tabla 1). Como

Correspondencia: Dr. F. Pozo.
Laboratorio de Gripe y Virus Respiratorios. Centro Nacional de Microbiología.
Ctra. de Pozuelo, km 2. 28220 Majadahonda. Madrid. España.
Correo electrónico: pacopozo@isciii.es

TABLA 1. Virus asociados con síndromes respiratorios en el ser humano

Familia	Género	Virus/especies	Tipos/subtipos/genotipos
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenzavirus A</i>	Virus de la gripe A	H1N1, H3N2 H5N1, H7N7, H7N3, H9N2
	<i>Influenzavirus B</i>	Virus de la gripe B	
	<i>Influenzavirus C</i>	Virus de la gripe C	
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Respirovirus</i>	Virus parainfluenza 1 Virus parainfluenza 3	
	<i>Rubulavirus</i>	Virus parainfluenza 2 Virus parainfluenza 4	VPI-4A, VPI-4B
	<i>Metapneumovirus</i>	Metapneumovirus humano	MPV-A, MPV-B
	<i>Pneumovirus</i>	Virus respiratorio sincitial	VRS-A, VRS-B
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	Enterovirus A	CVA2-A8, CVA10, CVA12, CVA14, CVA16, EV71, EV76, EV89-91
		Enterovirus B	CVA9, CVB1-B6, E1-7, E9, E11-21, E24-E27, E29-E33, EV69, EV73-75, EV77-88, EV97, EV100-101
		Enterovirus C	CVA1, CVA11, CVA13, CVA15, CVA17-22, CVA24, PV1-3, EV96 EVH68, EVH70
		Enterovirus D	
	<i>Rinovirus</i>	Rinovirus A (75 serotipos)	RV1A,B-2, 7-13, 15-16, 18-25, 28-34, 36, 38-41, 43-47, 49-51, 53-68, 71, 73-78, 80- 82, 85, 88-90, 94-96, 98, 100
		Rinovirus B (25 serotipos)	RV3-6, 14, 17, 26-27, 35, 37, 42, 48, 52, 69-70, 72, 79, 83-84, 86, 91-93, 97, 99
	Probable Rinovirus C*	Desconocido	
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus</i>	Coronavirus 229E Coronavirus OC43 Coronavirus SARS Coronavirus NL63 Coronavirus HKU1	
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	Adenovirus A	ADV12, 18, 31
		Adenovirus B	ADV3, 7, 11, 14, 16, 21, 34-35, 50
		Adenovirus C Adenovirus D	ADV1-2, 5-6 ADV8-10,13, 15, 17, 19-20, 22- 30, 32-33, 36-39, 42-49, 51
	Adenovirus E Adenovirus F	ADV4 ADV40-41	
<i>Parvoviridae</i>	<i>Bocavirus</i>	Bocavirus humano	

CVA: Coxsackievirus A; CVB: Coxsackievirus B; E: Echovirus; EV: Enterovirus; PV: Poliovirus; RV: Rinovirus.

*Recientemente definido a partir de sus características genéticas.

característica general de estas infecciones, un mismo cuadro respiratorio puede ser causado por virus diferentes, y un mismo virus puede originar diversos cuadros. Sin embargo, es frecuente la asociación entre un determinado virus y un cuadro en particular, dependiendo de la estacionalidad y de la edad del paciente, de manera que es posible aventurar un diagnóstico presuntivo basado en las características clínicas y epidemiológicas de la infección. En cualquier caso, el diagnóstico etiológico definitivo siempre debe efectuarse mediante la identificación del agente infeccioso en un laboratorio de microbiología.

La utilización generalizada de métodos moleculares en los laboratorios de microbiología clínica ha aportado notables ventajas al diagnóstico de las IRA de origen viral. En comparación con las técnicas de diagnóstico clásicas, como son el cultivo de virus en líneas celulares (CC) o la detección de antígenos mediante ensayos de inmunofluorescencia (IF) u otros métodos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en sus múltiples variantes, ha permitido incre-

mentar de manera considerable el número de muestras respiratorias en las que se detecta la presencia de alguno de los virus asociados con IRA. Este hecho está contribuyendo a mejorar el conocimiento de los cuadros respiratorios en los que están implicados cada uno de estos virus, particularmente los que presentan dificultades para su aislamiento o no replican en las líneas celulares utilizadas habitualmente.

La gran cantidad de virus diferentes que pueden estar involucrados y su enorme heterogeneidad condicionan la utilización de técnicas de amplio espectro que posibiliten la detección múltiple de un número considerable de virus en una única alícuota de muestra. Los métodos de PCR múltiple constituyen una herramienta muy útil en el complicado diagnóstico de la IRA, con independencia del sistema empleado para detectar los productos de amplificación, ya sea electroforesis en geles de agarosa, espectrometría de masas o *arrays* de ácido desoxirribonucleico (ADN). La aportación más novedosa en este sentido está llegando de la mano de los denominados *arrays* de ADN

en fase líquida. En estos sistemas, la accesibilidad de las sondas nucleotídicas se ha mejorado respecto a los *arrays* de ADN que utilizan sondas unidas a un soporte sólido, de manera que se ha logrado una sensibilidad comparable a métodos de PCR simple.

Otra forma de mejorar el diagnóstico de las IRA de origen viral es utilizar métodos de PCR genéricos, que permitan identificar grupos de virus genéticamente relacionados. Estos métodos se basan en la utilización de iniciadores degenerados. Los iniciadores de reacción, por consiguiente, no son 2, sino un conjunto de especies moleculares diferentes, cuyo número dependerá de la cantidad de posiciones variables y de la variabilidad de éstas. Para que el grado de degeneración de los oligonucleótidos sea mínimo, éstos deben diseñarse en regiones del genoma muy conservadas del grupo de virus que se pretenda identificar, ya sean genes exclusivos o regiones de determinados genes específicas de grupo. Otra estrategia muy utilizada para reducir el grado de degeneración de los oligonucleótidos es la incorporación de inosina en las posiciones degeneradas, capaz de unirse con cualquiera de las 4 bases habituales del genoma. En líneas generales, el diagnóstico molecular de adenovirus, enterovirus o rinovirus en la IRA se basa en la utilización de métodos genéricos de PCR, con posibilidad de identificar los 52 adenovirus y alrededor del centenar de enterovirus y rinovirus diferentes identificados hasta la fecha.

La elevada sensibilidad de los ensayos de PCR también comporta algunos inconvenientes para el diagnóstico etiológico de la IRA, como son la detección de virus que se encuentran colonizando la mucosa respiratoria de personas asintomáticas o la detección, a consecuencia de excreción prolongada, del virus en secreciones de pacientes que ya se han recuperado de una infección. Este hecho es, sin duda alguna, la causa de la elevada tasa de IRA atribuidas a más de una especie viral diferente. Posiblemente, la cuantificación de los virus presentes en las muestras respiratorias mediante la utilización de técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real pueda ayudar a discernir entre una IRA verdadera o una simple colonización del tracto respiratorio. No obstante, debemos ser conscientes de los problemas que plantea este tipo de muestras, muy variables en lo que respecta a localización, cantidad de muestra obtenida y homogeneidad de éstas, que no son comparables a las muestras de suero donde los estudios de carga viral están más normalizados. Los métodos de PCR en tiempo real, con independencia del sistema de emisión-detección de fluorescencia empleado (sondas TaqMan, FRET o *molecular beacon*), cuentan con otra serie de ventajas interesantes como son la rapidez y la elevada sensibilidad alcanzada en una única amplificación, comparable a los métodos de PCR convencional que utilizan 2 amplificaciones secuenciales (*nested-PCR*), así como la disminución de las contaminaciones por producto de amplificación.

Además de mejorar el rendimiento en el diagnóstico, la secuenciación de los productos obtenidos en la PCR permite realizar estudios adicionales de epidemiología molecular, genotipado y sensibilidad a determinados antivirales. Las características y las técnicas moleculares utilizadas se detallarán a continuación para los diferentes virus respiratorios.

Virus Influenza

La gripe es una IRA que puede afectar a las vías respiratorias altas y bajas, suele presentar un patrón epidémico y es causa importante de morbilidad en la población general y de mortalidad en personas de riesgo alto. Los virus gripales se agrupan en 3 géneros distintos: *Influenzavirus A*, B y C, pertenecientes a la familia *Orthomyxoviridae*, cuyo genoma está compuesto por ácido ribonucleico (ARN) fragmentado de polaridad negativa. Los virus gripales A y B contienen 8 segmentos: hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), matriz (M), PA, PB1, PB2 y NS. Los *Influenzavirus C* incluyen 7 fragmentos, pues la función de la hemaglutinina y la neuraminidasa está contenida en una única proteína: hemaglutinina estearasa (HEF). Los *Influenzavirus* están sujetos a importantes cambios genéticos inherentes a su doble condición de virus de ARN carente de actividad correctora por parte de la polimerasa y genoma fragmentado que permite la recombinación entre los distintos segmentos. La variabilidad genética es mayor para los virus gripales A, siendo los virus C los más conservados en términos evolutivos. Los pequeños cambios genéticos o mutaciones puntuales dan lugar a la aparición de cepas lo suficientemente diversas como para ser origen de las epidemias estacionales que determinan la necesidad de una reformulación anual de la vacuna. La recombinación en los virus gripales A puede tener lugar entre segmentos genéticos de virus de distintos orígenes (mamíferos, aves), que originan un nuevo subtipo que nunca haya circulado entre la población humana, y dan lugar a un virus con potencial pandémico. Todos estos fenómenos junto con la aparición cada vez más frecuente de cepas resistentes a los antivirales, determinan la necesidad de realizar una caracterización genética exhaustiva de los virus gripales.

Entre los métodos de biología molecular aplicados a la detección de los virus gripales, la amplificación genómica mediante PCR es la técnica más empleada, ya sea en tiempo final o en tiempo real. Los segmentos diana de las técnicas de PCR encaminadas al diagnóstico de la infección gripal suelen seleccionarse en genes muy conservados, como los que codifican para la proteína M, la NP o el segmento genético NS, que permiten diferenciar entre los 3 géneros (A, B y C) con independencia de las tasas de evolución del virus. Hay diversos métodos diseñados en estos genes, tanto de PCR convencional², en tiempo real^{3,4} y amplificación isotérmica de ARN (NASBA) acoplada a detectar mediante sondas fluorogénicas del tipo *molecular beacon*⁵. En la tabla 2 se resumen los diversos métodos moleculares que pueden utilizarse en la detección y/o la caracterización de virus gripales.

Los genes considerados de más interés para vigilar la infección producida por virus gripales son la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), que en el caso de los *Influenzavirus A* definen el subtipo. La variabilidad genética, consecuencia de mutaciones espontáneas, es más evidente en estos genes codificantes de proteínas de superficie, que son los que están sujetos a presión inmunológica. En consecuencia, el diseño de cebadores en estos genes resulta complicado y, en ocasiones, es necesario degenerar o inosinar determinadas posiciones para poder detectar todas las variantes de virus circulantes. Los subtipos de virus gripales A más importantes desde el punto

TABLA 2. Características de los métodos moleculares disponibles para detectar virus gripales

Método	Ventajas	Desventajas
PCR simple	Sensible y específico Permite análisis posteriores del producto amplificado	Una diana por ensayo
PCR múltiple	Sensible y específico Permite detectar más de una diana por ensayo y el análisis del producto amplificado	Los métodos no comerciales requieren una optimización exhaustiva para asegurar la ausencia de falsos negativos y la competición entre iniciadores
PCR-EIA	Sensible y específico Elevado rendimiento Puede ser múltiple	No permite el análisis posterior de los productos Requiere evaluación y validación minuciosa antes de la rutinización
PCR en tiempo real	Sensible y específico Rápido Permite cuantificar Puede ser múltiple	Requiere equipamiento específico No siempre es posible el análisis del producto La capacidad de analizar varios genes o patógenos en formato múltiple está limitada por las características del termociclador
NASBA	Sensible y específico Permite cuantificar	Utiliza 3 enzimas Procedimiento largo y costoso No siempre es posible el análisis del producto
Microarrays	Sensible y específico Detección de muchas dianas en un solo ensayo	Requiere equipamiento específico y amplio desarrollo No permite el análisis posterior de los productos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; PCR-EIA: PCR acoplada a enzimoanálisis.

de vista clínico-epidemiológico son H3N2, H1N1 y H5N1. Los 2 primeros son virus de carácter epidémico y el tercero es un virus con potencial pandémico que produce infecciones graves con elevada mortalidad, por lo que la identificación del subtipo puede tener importantes repercusiones en el ámbito clínico, terapéutico y epidemiológico. La detección de infecciones en humanos causadas por virus gripales pertenecientes a subtipos distintos de los habituales (H5N1, H7N7, H7N3 y H9N2) ha favorecido en los últimos años el diseño y la comercialización de técnicas de subtipado de los virus gripales A, y especialmente de detección del subtipo H5N1, ya sea mediante PCR^{6,7}, sistemas de detección basados en *microarrays* o *biochips*⁸, e incluso *arrays* de ADN en fase líquida⁹.

Los métodos de PCR pueden acoplarse a técnicas de tipado rápido y caracterización, como la determinación del polimorfismo genómico en función de los fragmentos obtenidos tras la digestión de éste con enzimas de restricción (RFLP) y, especialmente, la secuenciación completa o parcial de los segmentos génicos virales. La técnica de RFLP es capaz de subtipar HA y NA y, a la vez, caracterizar genes internos, lo que facilita la detección de recombinantes y la determinación del origen de los distintos segmentos (humano o zoonótico)¹⁰. La PCR-RFLP también se ha utilizado para detectar resistencias a adamantanos¹¹. Tiene los inconvenientes de no permitir la automatización ni la diferenciación entre genes con bajo nivel de polimorfismo. Una caracterización genética más precisa puede realizarse mediante secuenciación, seguida de análisis filogenético y del estudio de los aminoácidos clave implicados en alguna actividad biológica: unión a receptores, antigenicidad, actividad enzimática, o unión de antivirales, y cuyas mutaciones puedan repercutir en las características clínicas y patogénicas de la cepa estudiada. Por tanto, la secuenciación de genes como la HA, NA y el segmento M aportan mucha información en la caracterización y la epidemiología molecular. La HA es el principal determinante antigénico de los virus gripales y

contiene las subunidades HA1 y HA2, estando en la primera los aminoácidos causantes de la antigenicidad y de la unión al receptor celular. Por tanto, la secuenciación de esta región proporciona información referente a las características antigénicas y de afinidad por el receptor. Otra zona de la HA fundamental desde el punto de vista de la virulencia y que permite diferenciar entre virus de alta y baja patogenicidad en los subtipos H5 y H7 es la que codifica el péptido de fusión, para el que se ha descrito un método de PCR en tiempo real para su diferenciación¹². La NA, al igual que la HA, presenta capacidad antigénica, aunque en menor grado que ésta. Desde la comercialización y la utilización en la práctica clínica de los antivirales inhibidores de la neuraminidasa (zanamivir y oseltamivir), se ha observado un incremento de la frecuencia de resistencias a este grupo de antivirales en niños tratados e inmunodeprimidos, y no se descarta la aparición de variantes resistentes estables surgidas por mutación espontánea. Por ello, una de las principales aplicaciones de la secuenciación de la NA es el seguimiento de las resistencias genotípicas a los inhibidores de neuraminidasa. De igual manera, la secuenciación del segmento M, y en concreto la zona que codifica la proteína M2, permite detectar los cambios que confieren resistencia a los adamantanos (amantadina y rimantadina). Utilizando tecnología basada en la pirosecuenciación, se ha desarrollado un método para detectar de forma rápida resistencias a adamantanos¹³.

La caracterización genética se ha centrado en el estudio de los virus gripales A y B debido a que los *Influenzavirus* C apenas experimentan cambios genéticos, en general carecen de estacionalidad y habitualmente se les atribuye la producción de casos esporádicos. Sin embargo, recientemente se ha publicado un brote epidémico ocurrido en Japón¹⁴, donde el diagnóstico se realizó detectando el gen NS y la caracterización del brote mediante secuenciación del gen que codifica para la proteína de superficie HEF.

Virus respiratorio sincitial y metapneumovirus

El virus respiratorio sincitial (VRSH) y el *Metapneumovirus* (MPVH), se clasifican en la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*, géneros *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*. Están distribuidos por todo el mundo, y ocasionan un número elevado de IRA, con un rango de gravedad que abarca desde una enfermedad leve hasta muy grave, especialmente en niños de corta edad, ancianos y adultos con inmunodepresión importante.

El VRSH se considera uno de los virus humanos con más potencial infeccioso, el cual se transmite mediante gotículas grandes o fómites. El período de incubación es de 4-5 días, seguido de un cuadro clínico cuya duración puede variar. La excreción de virus en los niños puede prolongarse entre 1 y 3 semanas después de la recuperación, y llegar hasta 6 semanas en pacientes inmunodeprimidos. Este virus presenta un claro tropismo por el aparato respiratorio y parece que el daño citopático causado directamente por el virus contribuye significativamente a la enfermedad. La respuesta inflamatoria es muy importante en la generación de la enfermedad respiratoria por VRSH. El sistema inmunitario adaptativo desempeña un papel primordial en la recuperación de la infección y en la resistencia a la reinfección. Ambas respuestas, celular y humoral, contribuyen a la recuperación, y se comprueba que es crucial para ella el equilibrio entre sus distintos componentes. Los cuadros clínicos producidos por el MPVH son semejantes, aunque no idénticos, a los descritos en la infección por el VRSH¹⁵.

El VRSH produce brotes anuales durante los meses de invierno en los países de clima templado, mientras que en los tropicales las infecciones ocurren sobre todo en la estación lluviosa. El MPVH también cursa en brotes, en general de menor intensidad, al final del invierno o durante la primavera. Aunque no se entiende bien el motivo, el VRSH es capaz de infectar durante los primeros meses de vida a pesar de la existencia de anticuerpos maternos. El MPVH también infecta a los lactantes más jóvenes, pero no suele producir cuadros graves en edad tan temprana. La práctica totalidad de los niños presentan la primoinfección por VRSH durante los primeros 2 años de vida y alrededor de la mitad de ellos experimenta también al menos una reinfección en ese tiempo. Lo mismo puede decirse del MPVH en los primeros 5 años de vida¹⁶. Además, el VRSH es una causa muy importante de hospitalización de lactantes y de infección nosocomial en niños y pacientes inmunodeprimidos. Dado que los adultos continúan presentando reinfecciones durante su vida, aun cuando la clínica se va suavizando con ellas, el personal sanitario puede diseminar el virus dentro del hospital si no se aplican las debidas precauciones¹⁷. Se han diferenciado 2 grupos o subtipos antigénicos en el VRSH (A y B), distinguibles por su reacción frente a anticuerpos monoclonales y mediante análisis genéticos, distribuidos por todo el mundo¹⁸. También en el MPVH se han podido identificar subtipos antigénicos y genéticos¹⁹ y en ellos, diferenciar genotipos (tabla 1).

Las partículas virales de VRSH y MPVH (revisión actualizada en Collins y Crowe²⁰) son redondeadas, con diámetros de 150-300 nm, aunque muchas veces se presen-

tan en formas filamentosas. Muestran una envuelta, derivada de la membrana celular y atravesada por espículas de glucoproteínas que intervienen en el inicio de la infección. La proteína G, o glucoproteína mayor de superficie, es la causa del reconocimiento y adsorción del virus al receptor específico que exhibe la célula hospedadora. Presenta una gran variación que se va acumulando con el tiempo en 2 regiones hipervariables. Está muy alejada, en estructura y secuencia, de sus homólogas las proteínas de unión H/N o H de otros paramixovirus. La proteína F dirige la fusión del virus con la membrana plasmática, que es el mecanismo por el que el virus entra en la célula. En el interior de la partícula se encuentra la nucleocápside helicoidal, que contiene un genoma lineal formado por una sola molécula de ARN sencillo, de 15-18 Kb y de sentido negativo, protegido por la nucleoproteína, y donde también se integra el complejo de la polimerasa.

Genoma

El VRSH presenta en el extremo 3' de su genoma una secuencia no codificante, que contiene las señales para la iniciación de la síntesis del ARN, seguida de los genes que codifican las diferentes proteínas del virus (3'-[NS1-NS2]-N-P-M-SH-F-G-L-5'), separados por regiones intergénicas no codificantes. En el extremo 5' hay otra región no codificante, que contiene los promotores para la replicación del ARN viral y las señales para el empaquetamiento del genoma. Los genes cuyas proteínas se necesitan en mayor cantidad se encuentran próximos al extremo 3', de manera que su transcripción se ve favorecida. Mucha de esta información podría extenderse también al MPVH, mucho menos estudiado todavía, ya que se identificó por primera vez en 2001¹⁶.

Métodos de diagnóstico y epidemiología molecular

En niños con bronquiolitis o con episodios repetitivos de asma y en ancianos con bronquitis, neumonía o exacerbaciones asmáticas, ocurridos durante brotes epidémicos, debe establecerse una sospecha de infección por VRSH o MPVH. También debe procederse al diagnóstico microbiológico en caso de brotes, especialmente si se producen en hospitales o en instituciones cerradas. Como ya se ha indicado antes, es importante realizar el diagnóstico diferencial con otros virus respiratorios. El aislamiento viral, en especial en el caso del MPVH, es muy complicado por la poca sensibilidad en los CC habituales y la aparición tardía del efecto citopático²¹. Probablemente ésta fue la causa de la tardanza en el descubrimiento del MPVH. En el VRSH, los métodos rápidos (ELISA, IF e inmunocromatografía) fueron sustituyendo a los CC, sobre todo tras la aparición de los anticuerpos monoclonales. En concreto, la IF proporciona una gran sensibilidad y especificidad y es un método barato, pero tiene el inconveniente de requerir una gran experiencia en la lectura de las preparaciones. Algunos laboratorios la están empleando ahora también con éxito en la detección del MPVH²². Dadas las dificultades encontradas para efectuar el diagnóstico virológico de estos virus, los métodos moleculares han supuesto una gran ayuda para mejorar el conocimiento de estas infecciones. La técnica molecular con más sensibilidad y utilidad ha sido la PCR en sus diferentes modalidades. Para detectar estos virus en las muestras clínicas se amplifican fundamentalmente frag-

mentos de los genes internos, más conservados, como los que codifican la nucleoproteína N o la proteína matriz M. Puede utilizarse también el gen de la proteína de fusión F, más variable que los anteriores, por lo que además del diagnóstico permite diferenciar los 2 subtipos de VRSH². El diagnóstico del MPVH se ha basado desde sus comienzos en las reacciones de amplificación e identificación genómica. En los primeros trabajos se utilizó el gen *L* de la polimerasa¹⁶, pero después se ha extendido el uso de otros genes, como *N* y *M*^{23,24}. La rapidez y la cuantificación en el diagnóstico se han alcanzado gracias a la introducción de técnicas de PCR en tiempo real²⁵.

Para los estudios epidemiológicos se analizan los genes de mayor variabilidad. El gen de la glucoproteína G es el más adecuado para realizar estudios de epidemiología molecular en ambos virus por su elevada variabilidad. No obstante, se han utilizado también los genes de la proteína SH, de variabilidad intermedia y F con menor capacidad de variación. El estudio de diversos genes ha mostrado resultados concordantes para la diferenciación de los subtipos. Dentro de cada subtipo, en ambos virus se distinguen genotipos diferentes, entre los que no siempre se encuentran diferencias antigénicas. Sin embargo, se ha comprobado que en las epidemias pueden encontrarse circulando a la vez los 2 subtipos, e incluso varios genotipos de cada uno de ellos. La secuenciación de los fragmentos amplificados permite establecer relaciones filogenéticas y estudiar la evolución de los linajes de virus. La utilización de programas informáticos para comparar secuencias y la facilidad de acceso a las secuencias depositadas en las bases de datos, están permitiendo también el diseño de ensayos simplificados de RFLP, que pueden ser de gran utilidad para el subtipado o la identificación de genotipos²⁶. La incorporación de los métodos moleculares al diagnóstico etiológico de estos virus está permitiendo tomar medidas de control, así como profundizar en el conocimiento de estas infecciones e identificar las diferencias clínicas y epidemiológicas.

Virus parainfluenza

Los virus parainfluenza se han asociado con todo tipo de IRA de vías altas (laringotraqueítis) y bajas (bronquiolitis, bronquitis, neumonía). Actualmente se reconocen 5 virus parainfluenza diferentes (tabla 1): *a*) los virus parainfluenza 1 y 3 (VPI-1 y VPI-3) encuadrados en el género *Respirovirus*, y *b*) los virus parainfluenza 2, 4A y 4B (VPI-2, VPI-4A y VPI-4B), pertenecientes al género *Rubulavirus*, ambos en la familia *Paramyxoviridae*. Los virus parainfluenza tienen un genoma constituido por una molécula de ARN de polaridad negativa y codifican 6 proteínas estructurales: *a*) 2 proteínas de superficie, la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) implicada en el reconocimiento del receptor, y la proteína de fusión (F) que cataliza la entrada del virus en la célula infectada; *b*) 3 proteínas que forman parte del complejo de la nucleocápside, como son la nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) y proteína L, y *c*) la proteína matriz (M). El número de proteínas no estructurales es variable, dependiendo del tipo de virus parainfluenza, pero codifican al menos una proteína de este tipo. De manera general, podemos representar el mapa genómico de los virus parainfluenza como 3'-N-P-M-F-HN-L-5'.

Debido a que la mayoría de las de cepas de VPI-4 y algunas variantes de VPI-2 y VPI-3 son de difícil cultivo, han sido las técnicas de diagnóstico molecular, las que han adjudicado a estos virus un papel cada vez más destacado en la etiología de la IRA. Los virus parainfluenza tienen menor diversidad genética que otros virus respiratorios, como los virus gripales A o el VRSH, por lo que para el diseño de técnicas de detección molecular se han utilizado genes diana muy diversos, entre los que se incluyen los genes que codifican proteínas de superficie (HN y F), sometidos a mayor presión selectiva y que, por tanto, presentan una variabilidad mayor. Los segmentos utilizados en el diagnóstico molecular y la diferenciación de los virus parainfluenza mediante técnicas de PCR múltiple convencional son los que codifican la HN, para VPI-1, VPI-2 y VPI-3^{27,28}, y la fosfoproteína (P), para distinguir VPI-4A y VPI-4B²⁷. Una importante ventaja de estos métodos es que la secuenciación posterior del producto de amplificación permite realizar estudios de epidemiología molecular^{27,29}. Estos mismos genes también se han utilizado como dianas en el diseño de PCR múltiple en tiempo real³⁰ y NASBA adaptada a la detección mediante sondas del tipo *molecular beacon*³¹. El gen *N* es uno de los segmentos más conservados y el que presenta mayor número de transcritos. La disminución prematura de actividad polimerasa, común para todos los *Paramyxovirus*, da como resultado un gradiente de transcripción de manera que los genes próximos al promotor proximal 3' del genoma se transcriben más eficientemente que los genes distales, más próximos al extremo 5'. Por esta razón, algunas técnicas de PCR para la detección y la cuantificación de virus parainfluenza se han diseñado en este segmento³².

Los virus parainfluenza, y en concreto el VPI-3, se han asociado con brotes nosocomiales, fundamentalmente en unidades de trasplante de médula ósea. El estudio de la epidemiología molecular de estos brotes se ha basado en la caracterización de los genes que codifican las proteínas de superficie (HN y F), las cuales, al ser más variables, son las que más información epidemiológica proporcionan³³. Es posible discernir la cadena de transmisión y la existencia de múltiples reintroducciones de cepas virales circulantes en ese momento en la comunidad, pero debido a la relativa baja variabilidad que presentan los virus parainfluenza, la epidemiología molecular aplicada al estudio de estos virus, siendo una herramienta útil, debe siempre apoyarse en los datos epidemiológicos y clínicos.

Como consecuencia de la escasez de métodos rápidos para el diagnóstico y su difícil crecimiento en cultivo celular, el VPI-4 es un virus al que se le ha otorgado escasa importancia y se dispone de poca información acerca de sus características clínicas y epidemiológicas³⁴. Los estudios de epidemiología molecular realizados sobre este virus se han basado en la caracterización completa de los genes *F* y *HN*³⁵ o *P*³⁶. Los trabajos publicados hasta el momento coinciden en la mayor incidencia de infecciones por VPI-4A respecto a VPI-4B.

Adenovirus

Los adenovirus (ADV) humanos están asociados a una gran variedad de cuadros clínicos y destacan, entre las IRA, la neumonía y otras afecciones del tracto respirato-

rio inferior. Los 52 serotipos/genotipos de ADV humanos reconocidos hasta la fecha, clasificados en 6 especies distintas, A-F (tabla 1), se encuadran dentro de la familia *Adenoviridae*, en el género *Mastadenovirus*. La clasificación taxonómica de los ADV, basada tradicionalmente en los anticuerpos neutralizantes generados frente a determinadas proteínas de la cápside viral, coincide exactamente con la clasificación más actualizada, basada en la homología en la secuencia de nucleótidos del genoma o de los aminoácidos correspondientes. Son virus sin envuelta, cuya cápside de simetría icosaédrica mide 70-90 nm. Los viriones contienen 11 tipos de proteínas diferentes, 7 de ellas localizadas en la cápside y 4, en el *core*. En cada uno de los vértices de la cápside se imbrica una proteína denominada *fibra*, acabada en una cabeza redondeada. La proteína de la base de la fibra se denomina *pentón* y la mayoritaria de la cápside es el *hexón*.

Desde el punto de vista patológico, estos virus se transmiten por vía oral utilizando como receptores el ácido siálico y el receptor común para *Coxsackievirus* y ADV (CAR). Los cuadros respiratorios asociados más frecuentes son bronquiolitis, bronquitis necrosante y neumonía intersticial. Otros cuadros clínicos no respiratorios como la infección ocular, la cistitis hemorrágica aguda y la meningoencefalitis, pueden comenzar también con sintomatología respiratoria. Son ubicuos en el organismo y se excretan durante varios meses, lo que es de enorme importancia a la hora de interpretar resultados positivos de diagnóstico. Además de los casos esporádicos que se producen durante todo el año de manera individual, son frecuentes como agentes causales de brotes escolares, guarderías o cuarteles que pueden llegar a ser epidémicos.

Genoma

Está constituido por una única molécula lineal de ADN bicatenario, con una longitud de 26-45 Kb, asociado a proteínas codificadas por el virus. Los extremos 5' de cada cadena de ADN están unidos covalentemente a una proteína terminal codificada por el virus.

Métodos de diagnóstico y epidemiología molecular

Al tratarse de virus ADN, los métodos de extracción de ácidos nucleicos de muestras respiratorias deben asegurar la obtención tanto de ARN como de ADN. Los métodos moleculares están sustituyendo a los tradicionales, basados en el aislamiento en CC y en la detección de antígenos por IF. Los métodos más utilizados se basan en la posibilidad de detección simultánea de los 52 serotipos conocidos mediante PCR genérica. Los oligonucleótidos se diseñan en regiones conservadas, frecuentemente en el gen *L3* que codifica el hexón³⁷, aunque hay métodos diseñados en el gen *L5* que codifica la fibra o el gen que codifica la ADN polimerasa³⁸. Algunos métodos detectan una única especie de las 6 reconocidas³⁹, lo que les circunscribe a un número parcial de serotipos. La introducción de la PCR en tiempo real supone una gran ventaja por su rapidez y, además, permite cuantificar la cantidad de ADN genómico de los diferentes serotipos⁴⁰.

Al igual que ocurre en los métodos de diagnóstico, los métodos tradicionales de tipificación basados en la neutralización, en la inhibición de la hemaglutinación con sueros tipo específicos o la PCR-RFLP, se han sustituido por métodos moleculares. Muchos de estos métodos se

basan en el análisis de la secuencia del producto de amplificación y están diseñados en regiones que codifican los determinantes antigénicos para poder diferenciar de manera precisa la totalidad de los serotipos de ADV reconocidos hasta ahora^{41,42}. Estos métodos están permitiendo asociar a cuadros respiratorios determinados serotipos de ADV que tradicionalmente no se han asociado a IRA. En algunos de los serotipos (ADV3 y ADV7, por ejemplo), el análisis de la secuencia genómica de determinados genes ha revelado una variabilidad importante, de manera que, además, permitiría poder identificar el origen biogeográfico de las cepas asociadas a brotes epidémicos concretos.

Picornavirus

La familia *Picornaviridae* está compuesta por virus encuadrados en un total de 9 géneros, de los cuales 5 producen infección en humanos: *Rinovirus*, *Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus* y *Parechovirus*. En concreto, los *Rinovirus* (RV), y en menor medida los *Enterovirus* (EV), se han asociado con IRA. Son virus muy simples, pequeños (20-30 nm), con forma esférica. Su cápside, de simetría icosaédrica y sin envuelta lipídica, está compuesta por 60 monómeros de 4 proteínas estructurales, VP1, VP2, VP3 y VP4, organizados en 12 pentámeros.

Los RV son los virus más frecuentes en el catarro común, aunque en estudios recientes se han asociado a infecciones del tracto respiratorio inferior más graves, sobre todo en niños, ancianos y pacientes inmunodeprimidos. El riesgo de producir una infección grave en personas con enfermedad respiratoria previa (asma, bronquitis crónica, fibrosis quística) es muy elevado. Se han descrito un total de 100 serotipos diferentes agrupados en 2 especies, A y B (tabla 1), y más recientemente una nueva especie C⁴³. Los métodos de PCR son los de elección para realizar una detección y una tipificación molecular de elevada sensibilidad directamente en muestra clínica de cada uno del centenar de RV conocidos.

Los EV se asocian a un número muy elevado de cuadros clínicos y, aunque su nombre alude a infección entérica, no producen sólo infección gastrointestinal, sino también son muy comunes en cuadros respiratorios y neurológicos. Las vías de transmisión habituales son la respiratoria y la oral-fecal. Los cuadros de bronquitis y de neumonía intersticial son ocasionales. Se han descrito cerca de 100 serotipos y genotipos que se agrupan en 4 especies: A-D (tabla 1). Los métodos de PCR son de elección para realizar una detección sensible, una tipificación molecular y una caracterización de los diferentes linajes dentro de cada serotipo circulante.

Genoma

Está constituido por una molécula de ARN de polaridad positiva que se empaqueta en la cápside. El 90% del genoma es codificante, aunque en ambos extremos hay secuencias no codificantes que participan en la replicación y la traducción del ARN. En la porción codificante del genoma se pueden diferenciar 3 regiones bien definidas: a) P1 que constituirá las proteínas estructurales (VP4, VP2, VP3 y VP1); b) P2 que constituirá las proteínas 2A, 2B y 2C, y c) P3 que constituirá las proteínas 3A,

3B, 3C y 3D. La proteína 3D se define funcionalmente como la ARN polimerasa dependiente del ARN. La organización del genoma en EV y RV es similar, con la excepción de una delección de 120 nucleótidos en la región 5'NCR de los RV.

Métodos de diagnóstico y epidemiología molecular

La aplicación de los métodos moleculares ha introducido numerosos cambios en el diagnóstico de RV y EV. Las principales ventajas de estos métodos son la diferenciación entre ambos géneros y la posibilidad de detección directa en muestras clínicas, gracias al diseño de métodos con elevada sensibilidad y especificidad.

Los métodos de PCR genéricos para la detección simultánea y la diferenciación posterior de EV y RV están diseñados de manera que la delección de 120 nucleótidos de los RV en la región 5'NCR se incluya en el producto de amplificación. Esta región contiene fragmentos de secuencias conservadas para ambos géneros, que son la diana para el diseño de los oligonucleótidos genéricos. Para diferenciar EV de RV, se realiza un análisis posterior del producto amplificado, ya sea por diferenciación del tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa⁴⁴, por hibridación con sondas específicas^{45,46} o secuenciación⁴⁷. La PCR en tiempo real permite detectar y cuantificar estos virus en un período breve⁴⁸.

En el caso de los métodos de PCR específicos, la diversidad de RV y EV es un gran problema para el diseño de oligonucleótidos y sondas específicas que permitan detectar de forma eficaz todos los serotipos/genotipos de cada género en las muestras clínicas. Además, en el caso de los RV, la falta de secuencias en las bases de datos públicas dificulta el diseño de nuevos métodos moleculares. Son escasas las referencias de métodos convencionales específicos^{49,50} y de PCR en tiempo real^{51,52}. No ocurre lo mismo en el caso de los EV, para los que se dispone de un buen número de métodos de PCR específicos convencionales⁵³⁻⁵⁵ y PCR en tiempo real^{56,57}.

En la actualidad, tras el uso de métodos de PCR, la secuenciación de los productos de amplificación y el análisis filogenético de estas secuencias son la herramienta más generalizada para la identificación, clasificación y la epidemiología molecular de los RV y EV. Estos métodos se diseñan en regiones genómicas que presenten suficiente variabilidad para definir con rango taxonómico los picornavirus conocidos o los posibles nuevos picornavirus. Este sistema ha sustituido al tradicional de serotipificación. En el caso de los EV, estas regiones suelen corresponder con los genes que codifican la proteína estructural VP1 y la no estructural 3D (polimerasa)^{58,59}. Además, en los últimos años se ha descubierto un gran número de nuevos EV (EV74-76, EV79-91, EV94, EV97, EV100 y EV101), identificados a partir de diferencias genéticas y encuadrados en alguna de las 4 especies reconocidas^{58,60-63}. Por otro lado, el estudio de la secuencia completa o parcial del gen de la proteína VP1 de determinados serotipos muy prevalentes es fundamental para conocer la evolución del virus en el tiempo, así como su capacidad de infectar durante diferentes temporadas de circulación a un gran número de personas. La definición de linajes y sublinajes y su presentación en el ámbito local y global es de enorme interés en los estudios de epidemiología de determinadas infecciones⁶⁴. Respecto a RV,

hay trabajos en los que se secuencian y analizan las proteínas estructurales VP4, VP2 y VP1⁶⁵⁻⁶⁷.

Coronavirus

Los coronavirus (CoV), del orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, género *Coronavirus*, son grandes virus con envuelta y genoma ARN de polaridad positiva, que reciben su nombre por las proteínas de la espícula que presentan de forma radiada en la superficie del virión. El género *Coronavirus* se ha dividido clásicamente en 3 grupos. Antes del descubrimiento del SARS-CoV, los CoV humanos conocidos eran el CoV humano 229E (HCoV-229E) y el OC43 (HCoV-OC43). El grupo 1 contiene, además de HCoV-229E, virus porcinos productores de gastroenteritis y virus felinos productores de peritonitis. El grupo 2 incluye HCoV-OC43, coronavirus bovinos y virus de la hepatitis murinos. El grupo 3 está formado únicamente por virus aviares productores de bronquitis infecciosa. En noviembre de 2002 apareció en China el síndrome respiratorio agudo grave (SARS, en inglés), que se extendió rápidamente y llegó a afectar a 8.096 personas en 29 países y causó 774 muertes (Organización Mundial de la Salud). En marzo de 2003 se identificó un nuevo CoV (SARS-CoV) como el agente causal de la enfermedad. Desde la aparición del SARS-CoV, dada la elevada mortalidad asociada a éste, se ha incrementado el interés por los CoV, lo que ha permitido identificar, al menos, 3 nuevos CoV humanos, incluido el propio SARS-CoV, y la descripción de nuevos subgrupos de CoV. El SARS-CoV presenta una entidad tal que se ha considerado como una nueva especie asociada filogenéticamente al subgrupo 2b. En el año 2004 se describió el HCoV-NL-63, que representa una nueva especie de CoV incluida en el grupo 1b; y en el año 2005 se identificó el HCoV-HKU1 como integrante del grupo 2⁶⁸.

Los CoV humanos clásicos (HCoV-229E y HCoV-OC43) son virus causantes de resfriado común, que pueden llegar a provocar IRA más graves en niños, ancianos, y personas con una enfermedad de base. Sin embargo, los virus HCoV-HKU1 y HCoV-NL63 se han asociado a infecciones tanto del tracto respiratorio superior como inferior, y el HCoV-NL63 se ha asociado al síndrome *croup* o laringotraqueítis aguda. El SARS-CoV es el CoV humano más agresivo, que ocasiona una enfermedad pulmonar que puede ser causa de muerte hasta en un 10% de los casos.

Genoma

Está constituido por una molécula de ARN de polaridad positiva con un tamaño variable entre 27 y 33 Kb, lo que les convierte en los más grandes entre los virus ARN. Todos los CoV comparten una organización conservada de su genoma, donde los 2 tercios próximos al extremo 5' contienen los genes no estructurales que codifican el conjunto de proteínas necesarias para la replicación (1ab o replicasa). El tercio 3' restante del genoma contiene los genes que codifican las proteínas estructurales, espícula (S), proteína de la envuelta (E), membrana (M) y nucleoproteína (N), que generalmente se encuentran en el orden 5'-Rep1a-1b-S-E-M-N-3'. Sólo algunos miembros del grupo 2 contienen también la proteína hemaglutinina es-

terasa (HE). Además, el genoma de los CoV contiene un número variable de genes que codifican proteínas no estructurales que se intercalan entre estos genes en un orden característico de cada grupo de virus.

Métodos de diagnóstico y epidemiología molecular

Clásicamente, las infecciones causadas por CoV se diagnosticaban mediante aislamiento en CC, microscopía electrónica y serología. Después, el diagnóstico se basó en ensayos de detección antigénica y PCR, siendo estos últimos los más utilizados actualmente, debido a su mayor sensibilidad y a la posibilidad de detectar varios virus simultáneamente en la misma muestra. Los *primers* para los ensayos de PCR se pueden diseñar para que de forma genérica reconozcan todos los miembros del género, o para que reconozcan un determinado virus. La mayoría de los métodos de PCR utilizados en el diagnóstico de CoV humanos se basan en la amplificación de la secuencia correspondiente a la polimerasa (ARN polimerasa, ARN dependiente o RpRd) dentro del gen *Replab*, tanto PCR en tiempo real⁶⁹, como PCR convencional⁷⁰. Otro de los genes utilizados para este fin es el gen *N*^{71,72}.

La secuenciación de los productos de amplificación y su posterior análisis filogenético se utilizan para identificar, clasificar y realizar el estudio evolutivo de los CoV. Para estos estudios, se han utilizado también los genes *N* y *replacasa*, especialmente la secuencia correspondiente a RpRd, junto con el gen más variable, *S*⁷³⁻⁷⁶. La secuencia de RpRd es la más versátil, puesto que contiene zonas muy conservadas entre todos los miembros del género CoV, intercaladas por secuencias variables. En lo que respecta a SARS-CoV, la aplicación de las técnicas moleculares a la detección y análisis filogenético ha permitido realizar estudios exhaustivos en cuanto a evolución del virus, los mecanismos del salto interespecie y la adaptación al nuevo huésped tras encontrar el reservorio animal natural de los CoV⁷⁷.

Bocavirus

El bocavirus humano (HBoV) fue descubierto en 2005 y es, hasta el momento, el último en incorporarse a la larga lista de los virus asociados con infección respiratoria. Según estudios de homología de secuencia se asignó al género *Bocavirus*, hasta entonces compuesto por otros 2 virus, uno **bo**vino y otro **ca**nino (que dan origen al nombre del género), perteneciente a la subfamilia *Parvovirinae*, familia *Parvoviridae*⁷⁸. Como todos los parvovirus, son virus esféricos de pequeño tamaño (18-26 nm de diámetro) y simetría icosaédrica, carentes de envoltura, y con genoma constituido por una molécula lineal de ADN monocatenario de alrededor de 5 Kb. La estructura del genoma es similar a la que se observa en los parvovirus autónomos, que presentan un gen que codifica para una proteína no estructural, NS-1, localizado en uno de los extremos y otro que codifica las proteínas de la cápside, VP1 y VP2, en el otro. La presencia de un tercer gen localizado entre los 2 anteriores y que codifica otra proteína no estructural, NP-1, de función desconocida, es una característica exclusiva del género *Bocavirus*.

Desde su descubrimiento, HBoV se ha asociado con IRA en niños de corta edad, y ha causado cuadros que

van desde una simple infección del tracto respiratorio superior, a enfermedades más graves, como sibilancias recurrentes, bronquiolitis o neumonía. Hasta la fecha, HBoV no ha podido replicarse *in vitro* en CC, por consiguiente, el único método diagnóstico es la detección del genoma en muestras respiratorias mediante PCR, en la mayor parte de los casos diseñadas para amplificar un fragmento de los genes más conservados del genoma, NS-1 y NP-1. Las tasas de prevalencia observadas en los diferentes estudios realizados en todo el mundo varían entre el 1,5 y el 19%, probablemente debido a diferencias propias a las poblaciones estudiadas, tipo de muestra obtenida o sensibilidad de los métodos de PCR empleados, más que a diferencias inherentes a la propia prevalencia del virus⁷⁹.

A pesar de que HBoV se detecta como patógeno único en un porcentaje nada desdeñable de muestras respiratorias de pacientes con IRA, la tasa de codetección con otros virus respiratorios es elevada, con un rango que oscila entre el 37 y el 90%⁸⁰. Este hecho hace que el papel patógeno de este virus en la infección respiratoria sea cuestionado por determinados autores. Sin embargo, en la mayor parte de los estudios en los que se ha comparado, la prevalencia de HBoV en pacientes con IRA ha sido significativamente superior a la que se ha observado en pacientes asintomáticos⁸¹⁻⁸³. No obstante, es preciso indicar que un problema inherente a los estudios que incluyen pacientes asintomáticos es que las muestras respiratorias obtenidas en estos controles no es comparable, en cuanto a su volumen y calidad, con las que se obtienen a partir de pacientes sintomáticos.

Los estudios de cuantificación viral en muestras respiratorias también podrían ser concluyentes en atribuir a HBoV un papel patógeno en la IRA. Se ha propuesto que una carga viral elevada estaría asociada con enfermedad respiratoria, en tanto que la detección de una carga viral baja no parece tener relevancia clínica y podría ser indicativa de una excreción prolongada del virus después de haber causado la infección^{79,83}. Sin embargo, otros autores no han observado correlación alguna entre carga viral de HBoV y gravedad de los síntomas⁸⁴⁻⁸⁶.

Además de infecciones respiratorias, HBoV también ha podido detectarse en heces de niños con gastroenteritis^{87,88}, orina de niños con sintomatología respiratoria⁸⁹, así como en muestras de suero de pacientes con sibilancias⁸³, hallazgos que indican la posibilidad de que sea capaz de inducir infección sistémica, como ocurre con otros parvovirus.

En lo que respecta a la epidemiología molecular, la variabilidad genética de HBoV es muy baja, comparada con la de otros virus respiratorios. Se ha identificado un número escaso de variaciones en la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para las proteínas de la cápside VP1 y VP2, suficientes como para diferenciar entre 2 variantes que se encuentran cocirculando en la mayor parte de los países en los que se han realizado estudios filogenéticos^{80,84}, lo que demuestra que estas variaciones no se corresponden con agrupamientos geográficos.

En términos generales, la implantación progresiva de los métodos moleculares en la práctica microbiológica asistencial comporta un buen número de ventajas relacionadas directamente con el diagnóstico y, además, la secuenciación de los productos de amplificación permite

una caracterización más completa de los virus detectados. La utilización de estos métodos se generalizará en la medida que los potenciales usuarios se vayan familiarizando con las técnicas moleculares, éstas vayan aumentando su nivel de automatización, y se comercialicen técnicas aprobadas para el diagnóstico.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. García-Rodríguez JA, Fresnadillo MJ. Microbiología de la infección respiratoria pediátrica. *An Esp Pediatr.* 2002;56(Supl 1):2-8.
2. Coiras MT, Pérez-Breña P, García ML, Casas I. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol.* 2003;69:132-44.
3. Smith AB, Mock V, Melear R, Colarusso P, Willis DE. Rapid detection of influenza A and B viruses in clinical specimens by Light Cycler real time RT-PCR. *J Clin Virol.* 2003;28:51-8.
4. 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;39:196-200.
5. Moore C, Hibbitts S, Owen N, Corden SA, Harrison G, Fox J, et al. Development and evaluation of a real-time nucleic acid sequence based amplification assay for rapid detection of influenza A. *J Med Virol.* 2004;74:619-28.
6. Poddar SK. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. *J Virol Methods.* 2002;99:63-70.
7. 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;38:1552-8.
8. Quan PL, Palacios G, Jabado OJ, Conlan S, Hirschberg DL, Pozo F, et al. Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by GreeneChipResp oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2359-64.
9. Zou S, Han J, Wen L, Liu Y, Cronin K, Lum SH, et al. Human influenza A virus (H5N1) detection by a novel multiplex PCR typing method. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1889-92.
10. Cooper LA, Subbarao K. A simple restriction fragment length polymorphism-based strategy that can distinguish the internal genes of human H1N1, H3N2, and H5N1 influenza A viruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2579-83.
11. Saito R, Oshitani H, Masuda H, Suzuki H. Detection of amantadine-resistant influenza A virus strains in nursing homes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis with nasopharyngeal swabs. *J Clin Microbiol.* 2002;40:84-8.
12. Hoffmann B, Harder T, Starick E, Depner K, Werner O, Beer M. Rapid and highly sensitive pathotyping of avian influenza A H5N1 virus by using real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2007;45:600-3.
13. 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;295:891-4.
14. Matsuzaki Y, Abiko C, Mizuta K, Sugawara K, Takashita E, Muraki Y, et al. A nationwide epidemic of influenza C virus infection in Japan in 2004. *J Clin Microbiol.* 2007;45:783-8.
15. García-García ML, Calvo C, Pérez-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.
16. 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.* 2001;7:719-24.
17. Tablan OC, Anderson LJ, Besser R, Bridges C, Hajjeh R. Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia, 2003: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR Recomm Rep.* 2004;53:1-36.
18. García O, Martín M, Dopazo J, Arbiza J, Frabasile S, Russi J, et al. Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *J Virol.* 1994;68:5448-59.
19. Van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, De Swart RL, et al. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:658-66.

20. Collins PL, Crowe JE. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. En: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology.* Vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1601-46.
21. Reina J, Ferrer F, Alcoceba E, Mena A, De Gopegui ER, Figuerola J. Comparison of different cell lines and incubation times in the isolation by the shell vial culture of human metapneumovirus from pediatric respiratory samples. *J Clin Virol.* 2007;40:46-9.
22. Percivalle E, Sarasini A, Visai L, Revello MG, Gerna G. Rapid detection of human metapneumovirus strains in nasopharyngeal aspirates and shell vial cultures by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3443-6.
23. López-Huertas MR, Casas I, Acosta-Herrera B, García ML, Coiras MT, Pérez-Breña P. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods.* 2005;129:1-7.
24. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med.* 2004;350:443-50.
25. Pabbaraju K, Wong S, McMillan T, Lee BE, Fox JD. Diagnosis and epidemiological studies of human metapneumovirus using real-time PCR. *J Clin Virol.* 2007;40:186-92.
26. Montes M, Vicente D, Esnal O, Cilla G, Pérez-Trallero E. A PCR-restriction fragment length polymorphism assay to genotype human metapneumovirus. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:91-3.
27. Aguilar JC, Pérez-Breña MP, García ML, Cruz N, Erdman DD, Echevarría JE. Detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4 in clinical samples of pediatric patients by multiplex reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1191-5.
28. Echevarría JE, Erdman DD, Swierkosz EM, Holloway BP, Anderson LJ. Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, and 3 from clinical samples by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1388-91.
29. Echevarría JE, Erdman DD, Meissner HC, Anderson L. Rapid molecular epidemiologic studies of human parainfluenza viruses based on direct sequencing of amplified DNA from a multiplex RT-PCR assay. *J Virol Methods.* 2000;88:105-9.
30. Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC, Claas EC. 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.
31. Hibbitts S, Rahman A, John R, Westmoreland D, Fox JD. Development and evaluation of NucliSens basic kit NASBA for diagnosis of parainfluenza virus infection with 'end-point' and 'real-time' detection. *J Virol Methods.* 2003;108:145-55.
32. Hu A, Colella M, Zhao P, Li F, Tam JS, Rappaport R, et al. Development of a real-time RT-PCR assay for detection and quantitation of parainfluenza virus 3. *J Virol Methods.* 2005;130:145-8.
33. Zambon M, Bull T, Sadler CJ, Goldman JM, Ward KN. Molecular epidemiology of two consecutive outbreaks of parainfluenza 3 in a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2289-93.
34. García ML, Aguilar JC, Echeverría JE, Calvo C, Pinto I, Ordobás M, et al. Parainfluenza virus type 4 infections. *An Esp Pediatr.* 2002;57:116-20.
35. Vachon ML, Dionne N, Leblanc E, Moisan D, Bergeron MG, Boivin G. Human parainfluenza type 4 infections, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1755-8.
36. Lau SK, To WK, Tse PW, Chan AK, Woo PC, Tsoi HW, et al. Human parainfluenza virus 4 outbreak and the role of diagnostic tests. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4515-21.
37. Avellón A, Pérez P, Aguilar JC, Lejarazu R, Echevarría JE. Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 2001;92:113-20.
38. Chmielewicz B, Nitsche A, Schweiger B, Ellerbrok H. Development of a PCR-based assay for detection, quantification, and genotyping of human adenoviruses. *Clin Chem.* 2005;51:1365-73.
39. Adhikary AK, Inada T, Banik U, Numaga J, Okabe N. Identification of subgroup C adenoviruses by fiber-based multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42:670-3.
40. Wong S, Pabbaraju K, Pang XL, Lee BE, Fox JD. Detection of a broad range of human adenoviruses in respiratory tract samples using a sensitive multiplex real-time PCR assay. *J Med Virol.* 2008;80:856-65.
41. Casas I, Avellón A, Mosquera M, Jabado O, Echevarría JE, Campos RH, et al. Molecular identification of adenoviruses in clinical samples by analyzing a partial hexon genomic region. *J Clin Microbiol.* 2005;43:6176-82.
42. Ebner K, Suda M, Watzinger F, Lion T. Molecular detection and quantitative analysis of the entire spectrum of human adenoviruses by a two-reaction real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3049-53.
43. Lamson D, Renwick N, Kapoor V, Liu Z, Palacios G, Ju J, et al. MassTag polymerase-chain-reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza-like illness in New York State during 2004-2005. *J Infect Dis.* 2006;194:1398-402.

44. Coiras MT, Aguilar JC, García ML, Casas I, Pérez-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.
45. Andreoletti L, Lesay M, Deschilde A, Lambert V, Dewilde A, Wattré P. Differential detection of rhinoviruses and enteroviruses RNA sequences associated with classical immunofluorescence assay detection of respiratory virus antigens in nasopharyngeal swabs from infants with bronchiolitis. *J Med Virol.* 2000;61:341-6.
46. Halonen P, Rocha E, Hierholzer J, Holloway B, Hyypia T, Hurskainen P, et al. Detection of enteroviruses and rhinoviruses in clinical specimens by PCR and liquid-phase hybridization. *J Clin Microbiol.* 1995;33:648-53.
47. Arola A, Santti J, Ruuskanen O, Halonen P, Hyypia T. Identification of enteroviruses in clinical specimens by competitive PCR followed by genetic typing using sequence analysis. *J Clin Microbiol.* 1996;34:313-8.
48. Kares S, Lonnrot M, Vuorinen P, Oikarinen S, Taurianen S, Hyoty H. Real-time PCR for rapid diagnosis of entero- and rhinovirus infections using LightCycler. *J Clin Virol.* 2004;29:99-104.
49. Andeweg AC, Bestebroer TM, Huybregts M, Kimman TG, De Jong JC. Improved detection of rhinoviruses in clinical samples by using a newly developed nested reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol.* 1999;37:524-30.
50. Steininger C, Aberle SW, Popow-Kraupp T. Early detection of acute rhinovirus infections by a rapid reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2001;39:129-33.
51. Lu X, Holloway B, Dare RK, Kuypers J, Yagi S, Williams JV, et al. Real-time reverse transcription-PCR assay for comprehensive detection of human rhinoviruses. *J Clin Microbiol.* 2008;46:533-9.
52. Dagher H, Donninger H, Hutchinson P, Ghildyal R, Bardin P. Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR. *J Virol Methods.* 2004;117:113-21.
53. Casas I, Klapper PE, Cleator GM, Echevarría JE, Tenorio A, Echevarría JM. Two different PCR assays to detect enteroviral RNA in CSF samples from patients with acute aseptic meningitis. *J Med Virol.* 1995;47:378-85.
54. Casas I, Tenorio A, Echevarría JM, Klapper PE, Cleator GM. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J Virol Methods.* 1997;66:39-50.
55. Pozo F, Casas I, Tenorio A, Trallero G, Echevarría JM. Evaluation of a commercially available reverse transcription-PCR assay for diagnosis of enteroviral infection in archival and prospectively collected cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1741-5.
56. Costa AM, Lamb D, Garland SM, Tabrizi SN. Evaluation of LightCycler as a platform for nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) in real-time detection of enteroviruses. *Curr Microbiol.* 2008;56:80-3.
57. Landry ML, Garner R, Ferguson D. Comparison of the NucliSens Basic kit (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) and the Argene Biosoft Enterovirus Consensus Reverse Transcription-PCR assays for rapid detection of enterovirus RNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5006-10.
58. Oberste MS, Maher K, Williams AJ, Dybdahl-Sissoko N, Brown BA, Gookin MS, et al. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol.* 2006;87:119-28.
59. Palacios G, Casas I, Tenorio A, Freire C. Molecular identification of enterovirus by analyzing a partial VP1 genomic region with different methods. *J Clin Microbiol.* 2002;40:182-92.
60. Smura T, Blomqvist S, Paananen A, Vuorinen T, Sobotova Z, Bubovica V, et al. Enterovirus surveillance reveals proposed new serotypes and provides new insight into enterovirus 5'-untranslated region evolution. *J Gen Virol.* 2007;88:2520-6.
61. Smura TP, Junttila N, Blomqvist S, Norder H, Kaijalainen S, Paananen A, et al. Enterovirus 94, a proposed new serotype in human enterovirus species D. *J Gen Virol.* 2007;88:849-58.
62. Oberste MS, Maher K, Nix WA, Michele SM, Uddin M, Schnurr D, et al. Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79-88, EV97, and EV100-101, members of the species Human Enterovirus B. *Virus Res.* 2007;128:34-42.
63. Oberste MS, Michele SM, Maher K, Schnurr D, Cisterna D, Junttila N, et al. Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J Gen Virol.* 2004;85:3205-12.
64. Palacios G, Casas I, Cisterna D, Trallero G, Tenorio A, Freire C. Molecular epidemiology of echovirus 30: temporal circulation and prevalence of single lineages. *J Virol.* 2002;76:4940-9.
65. Lau SK, Yip CC, Tsoi HW, Lee RA, So LY, Lau YL, et al. Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3655-64.
66. McErlean P, Shackelton LA, Lambert SB, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Characterisation of a newly identified human rhinovirus, HRV-QPM, discovered in infants with bronchiolitis. *J Clin Virol.* 2007;39:67-75.
67. Savolainen C, Blomqvist S, Mulders MN, Hovi T. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J Gen Virol.* 2002;83:333-40.
68. Pyrc K, Berkhout B, Van der Hoek L. Identification of new human coronaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007;5:245-53.
69. Garbino J, Crespo S, Aubert JD, Rochat T, Ninet B, Deffernez C, et al. A prospective hospital-based study of the clinical impact of non-severe acute respiratory syndrome (Non-SARS)-related human coronavirus infection. *Clin Infect Dis.* 2006;43:1009-15.
70. Cheng VC, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:660-94.
71. Druce J, Tran T, Kelly H, Kaye M, Chibo D, Kosteci R, et al. Laboratory diagnosis and surveillance of human respiratory viruses by PCR in Victoria, Australia, 2002-2003. *J Med Virol.* 2005;75:122-9.
72. Birch CJ, Clothier HJ, Seccull A, Tran T, Catton MC, Lambert SB, et al. Human coronavirus OC43 causes influenza-like illness in residents and staff of aged-care facilities in Melbourne, Australia. *Epidemiol Infect.* 2005;133:273-7.
73. Woo PC, Lau SK, Tsoi HW, Huang Y, Poon RW, Chu CM, et al. Clinical and molecular epidemiological features of coronavirus HKU1-associated community-acquired pneumonia. *J Infect Dis.* 2005;192:1898-907.
74. Lambert SB, Allen KM, Druce JD, Birch CJ, Mackay IM, Carlin JB, et al. Community epidemiology of human metapneumovirus, human coronavirus NL63, and other respiratory viruses in healthy preschool-aged children using parent-collected specimens. *Pediatrics.* 2007;120:e929-37.
75. Kaplan NM, Dove W, Abd-Eldayem SA, Abu-Zeid AF, Shamoon HE, Hart CA. Molecular epidemiology and disease severity of respiratory syncytial virus in relation to other potential pathogens in children hospitalized with acute respiratory infection in Jordan. *J Med Virol.* 2008;80:168-74.
76. Chibo D, Birch C. Analysis of human coronavirus 229E spike and nucleoprotein genes demonstrates genetic drift between chronologically distinct strains. *J Gen Virol.* 2006;87:1203-8.
77. Zhao GP. SARS molecular epidemiology: a Chinese fairy tale of controlling an emerging zoonotic disease in the genomics era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007;362:1063-81.
78. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:12891-6.
79. Allander T. Human bocavirus. *J Clin Virol.* 2008;41:29-33.
80. Longtin J, Bastien M, Gilca R, Leblanc E, De Serres G, Bergeron MG, et al. Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:217-21.
81. García ML, Calvo C, Pozo F, Pérez-Breña P, Quevedo S, Bracamonte T, et al. Human bocavirus detection in nasopharyngeal aspirates of children without clinical symptoms of respiratory infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27:358-60.
82. Kesebir D, Vázquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis.* 2006;194:1276-82.
83. Allander T, Jarti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis.* 2007;44:904-10.
84. Neske F, Blessing K, Tollmann F, Schubert J, Rethwilm A, Kreth HW, et al. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2116-22.
85. Kleines M, Scheithauer S, Rackowitz A, Ritter K, Hausler M. High prevalence of human bocavirus detected in young children with severe acute lower respiratory tract disease by use of a standard PCR protocol and a novel real-time PCR protocol. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1032-4.
86. 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.
87. Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Yarza EG, Pérez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:636-7.
88. Lee JI, Chung JY, Han TH, Song MO, Hwang ES. Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. *J Infect Dis.* 2007;196:994-7.
89. Pozo F, García ML, Calvo C, Cuesta I, Pérez-Breña P, Casas I. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol.* 2007;40:224-8.