

Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Departamento de de Anatomía Patológica,  
Microbiología, Medicina Preventiva y Salud  
Pública y Medicina Legal y Forense.



# Inmunopatogenia de la neumonía vírica.



TESIS DOCTORAL  
M<sup>a</sup> del Mar Justel Álvarez  
Valladolid, 2015





---

# **Universidad de Valladolid**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA, MICROBIOLOGÍA,  
MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA Y MEDICINA LEGAL Y  
FORENSE.**

**TESIS DOCTORAL:**

**INMUNOPATOGENIA DE LA NEUMONÍA VÍRICA.**

Presentada por M<sup>a</sup> del Mar Justel Álvarez para optar al grado de  
doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Jesús Fco. Bermejo Martín y Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo



D. **JESÚS FCO. BERMEJO MARTÍN**, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA, ESPECIALISTA DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA, INVESTIGADOR PRINCIPAL DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INFECCIÓN E INMUNIDAD -IMI- DEL SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA EN EL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID-IECSCYL.

D. **RAÚL ORTIZ DE LEJARAZU LEONARDO**, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA, PROFESOR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA, MICROBIOLOGÍA, MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA Y MEDICINA LEGAL Y FORENSE DE LA FACULTAD DE MEDICINA, JEFE DE SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID.

CERTIFICAN QUE:

D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> del Mar Justel Álvarez ha realizado bajo su dirección el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor con el título:

**“Inmunopatogenia de la neumonía vírica.”**

Examinado dicho trabajo, damos nuestra conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral. Y para que así conste y obre a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valladolid, julio de 2015.

Fdo. Dr. Jesús Fco. Bermejo Martín

Fdo. Dr. Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo



A mi familia y a Carlos



A mi director de tesis, Jesús, un investigador con mayúsculas que contagia a todos los que le rodean con su pasión por la investigación. De Jesús he aprendido tantas cosas que creo que no es posible plasmarlas en este breve agradecimiento, lo que he aprendido de Jesús está impregnado en todas y cada una de las páginas de esta tesis, no solo son conocimientos teóricos, es sobre todo una manera de pensar distinta porque ya no es pensar, es investigar. Algo que por desgracia no he podido aprender de Jesús porque no se puede enseñar es la imaginación, gracias Jesús por compartir tus ideas conmigo, esa visión que va más allá de lo que vemos los demás y que es lo que le da valor añadido a todo lo que haces.

A mi director Raúl, que ha sido una fuente inagotable de conocimientos sobre microbiología en general y sobre virología y el virus de la gripe en particular, que me ha impulsado por el camino de la investigación durante los cuatro años que compartimos en el Servicio de Microbiología e Inmunología, por tener siempre tiempo para mí cuando lo necesitaba y por saber tanto criticar el trabajo que no está bien hecho, como reconocer y felicitar cuando sí lo está.

No aparece como directora, pero podría hacerlo perfectamente la Dra. Raquel Almansa, que me ha ayudado en todos los pasos desde el principio hasta el final de esta Tesis, desde creación de la base de datos hasta la corrección del primer borrador de esta tesis, solo espero no haber abusado de tu paciencia.

A las “chicas del laboratorio”, Lucía, Verónica y Alicia. Parte imprescindible de esta tesis no solo por su inmenso trabajo en el laboratorio sino por estar siempre disponibles y con una sonrisa para aclararme cualquier duda, hacéis un trabajo muy grande que seguramente muchas veces no es reconocido, que sepáis que no me olvido de vosotras y que tengo muy presente que sois parte esencial de esta tesis.

No puedo dejar de mencionar a la Dra. MariFe Muñoz por su ayuda con la estadística, no solo en lo referente a esta tesis, sino en otros proyectos de investigación.

Dentro del Servicio de Microbiología son tantas las personas que se han interesado este trabajo que no puedo mencionar a todas. Sí que lo haré con la Dra. Silvia Rojo, parte esencial de esta tesis junto con el personal de virología en lo que respecta al diagnóstico virológico.

También del Servicio de Microbiología tengo reservado un espacio especial para mis compañeros residentes: Gabi, Cristina, Anita, Ana, Eleda, Irene y Jose. Anita que está pasando ahora por las mismas dudas y agobios que yo pase en su momento; Ana por su risa contagiosa que me recarga de energía y Eleda, que tiene la habilidad de hacer que estar con ella sea como estar en casa.

No me puedo olvidar de Concha, residente adoptada de microbiología y una de las personas que más me animó a empezar cuanto antes con este proyecto; Iván, por todos los ratos compartidos haciendo PCRs y todo tipo de experimentos alocados con hielo seco, algas o blattas.

A mi familia, mis padres y hermanos, que siempre me animaron a estudiar, que me dieron la libertad de elegir y las alas para poder volar hacia este sueño, cuyos orígenes vienen de mucho más atrás de los varios años que nos ha llevado completar esta tesis. Espero que os sintáis tan orgullosos de esto como yo porque ha sido un esfuerzo común el que ha hecho posible esta tesis.

Y por último a Carlos, no puedo recordar de cuantos apuros me has sacado no solo durante esta tesis sino durante tantos años, mi informático particular, y que me ha dado una de las cosas imprescindibles para realizar una tesis, tiempo. Sin duda la persona que más ha aguantado mi estrés, nervios, angustias, también los buenos ratos y alegrías cuando las cosas salían bien. Aprovecho este espacio para darte un enorme gracias, gracias por la ayuda en esta tesis y por estar siempre ahí.

*Índice*

---



<b>Índice</b>	<b>9</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>13</b>
<b>Resumen</b>	<b>17</b>
<b>Introducción</b>	<b>21</b>
<b>Neumonía adquirida en la comunidad</b>	<b>23</b>
<b>Gripe y otros virus causantes de neumonías</b>	<b>27</b>
Gripe	27
Enterovirus	38
Rinovirus	40
Virus respiratorio sincitial	42
Metapneumovirus humano	47
Coronavirus	50
Herpesvirus	53
<b>Respuesta inmune del huésped</b>	<b>54</b>
Respuesta inmune innata	55
Respuesta inmune adaptativa	57
Respuesta inmune específica frente a virus	59
Citoquinas	60
Inmunoglobulinas	63
<b>Hipótesis y objetivos</b>	<b>69</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>73</b>
Pacientes	75
Diagnóstico virológico	78
Perfiles de mediadores inmunológicos. Proteómica.	85
Análisis estadístico de los resultados.	88
<b>Resultados</b>	<b>93</b>
<b>Pacientes</b>	<b>95</b>

<b>Estudio de los factores de mortalidad asociados a la neumonía por gripe</b>	<b>97</b>
Características demográficas, clínicas y analíticas de la población:	97
Perfiles de citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento en plasma	104
Perfiles de Inmunoglobulinas en plasma	111
Correlación entre los perfiles de Inmunoglobulinas y citoquinas en plasma	115
Análisis de mortalidad, supervivencia y AUROC.	121
<b>Estudio de los factores diferenciales entre neumonía por gripe o por otros virus</b>	<b>127</b>
Busqueda de factores diferenciales entre gripe y otros virus	127
Perfiles de citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento en plasma	132
Perfiles de Inmunoglobulinas en plasma	138
Factores diferenciales entre gripe y otros virus	140
<b>Discusión</b>	<b>143</b>
Estudio de las características demográficas, clínicas y analíticas	146
Estudio de los perfiles de citoquinas en respuesta a la neumonía vírica	153
Estudio de los niveles de inmunoglobulinas endógenas en la neumonía vírica	158
Correlación entre niveles de citoquinas, inmunoglobulinas y gravedad	162
Modelo de inmunopatogénesis	164
Modelos predictivos de mortalidad en pacientes con infección por gripe	166
Biomarcadores	168
Nuevos enfoques terapéuticos en el tratamiento de la NAC gripal grave	169
<b>Conclusiones</b>	<b>173</b>
<b>Rendimiento científico</b>	<b>177</b>
<b>Anexos</b>	<b>193</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>199</b>

*Abreviaturas*

---



## Abreviaturas

---

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APACHE II	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
EE.UU.	Estados Unidos de América
HA	Hemaglutinina
HCoV	Coronavirus humanos
HCUV	Hospital Clínico Universitario de Valladolid
HR	<i>Hazard ratio</i>
IC	Intervalo de confianza
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i> (Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas)
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IVIG	Inmunoglobulina intravenosa
NA	Neuraminidasa
NAC	Neumonía adquirida en la comunidad
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-TI	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
RI	Rango intercuartil
RN	Recién nacidos
RNP	Ribonucleoproteína
SARS	Síndrome respiratorio agudo grave
T <sup>a</sup>	Temperatura
TNF	Factor de necrosis tumoral
UCI	Unidad de cuidados intensivos
VMI	Ventilación mecánica invasiva
VN	Valores normales
VRS	Virus respiratorio sincitial



*Resumen*

---



## Resumen

---

La neumonía adquirida en la comunidad es una de las patologías que causa más morbimortalidad a nivel mundial, aproximadamente el 10% de los pacientes con neumonía desarrollan enfermedad grave que requiere el ingreso en UCI. Un tercio de las neumonías son producidas por virus, siendo el más frecuente el virus de la gripe, aunque los nuevos métodos de diagnóstico molecular están permitiendo diagnosticar cada vez más neumonías causadas por virus distintos al gripal (rinovirus, virus respiratorio sincitial, etc.)

En el año 2009 apareció un nuevo virus gripal, el virus A/H1N1pdm09, el cual causó una pandemia durante la temporada 2009-10 y en la temporada siguiente se estacionalizó siendo el responsable de la epidemia anual gripal en Europa. En este trabajo se reclutaron pacientes con neumonía viral grave durante la temporada postpandémica (2010-2011) con el objetivo de estudiar el papel que juega el sistema inmune en la gravedad y mortalidad de la neumonía vírica grave, así como analizar los factores diferenciales según la etiología de la neumonía. Para lograr estos objetivos se midieron los niveles de diversas citoquinas, de todos los isotipos de inmunoglobulinas y de todas las subclases de la IgG en el plasma de los pacientes.

Los pacientes con neumonía gripal grave presentan frecuentemente inmunosupresión previa. Los niveles de citoquinas en el plasma de los pacientes se encuentran elevados mientras que por el contrario, sus niveles de inmunoglobulinas están disminuidos. Dentro de las inmunoglobulinas, la IgM y la IgG2 juegan un papel protector, ya que los pacientes con menores niveles de estas inmunoglobulinas muestran menor tiempo de supervivencia. Además los niveles de IgM en plasma son un factor predictor de mortalidad.

La neumonía grave por virus distintos al gripal ha sido escasamente estudiada. Este trabajo ha permitido definir importantes características sobre los pacientes afectados por esa patología, como son que presentan mayor edad que los pacientes infectados por el virus gripal y un peor estado basal con numerosas comorbilidades, pese a lo cual la tasa de mortalidad es muy inferior a la de la neumonía gripal. Por primera vez se han identificado dos citoquinas, MCP-1 y MIP-1 $\beta$ , y una inmunoglobulina, IgA, cuyos niveles permiten diferenciar si el paciente está infectado por el virus de la gripe u otro virus.



## *Introducción*

---



## Neumonía adquirida en la comunidad

Las infecciones respiratorias del tracto respiratorio inferior y principalmente la neumonía, son la tercera causa de mortalidad a nivel mundial (1).

La neumonía se define como la respuesta inflamatoria del parénquima pulmonar a la invasión por agentes externos infecciosos del tracto respiratorio inferior y pulmón que condiciona la exudación y condensación del espacio aéreo en dicho tejido (2).

Según el lugar de adquisición, las neumonías se clasifican como neumonía adquirida en la comunidad (NAC), neumonía nosocomial y neumonía asociada al cuidado sanitario (2).

La neumonía puede ser causada por bacterias, virus, hongos o parásitos (3). La frecuencia relativa de cada agente etiológico varía de acuerdo a numerosos factores, tales como la edad del paciente, la existencia de enfermedades asociadas y el contexto en el que se adquiere la infección (comunidad, hospital, residencia de ancianos, etc.) entre otros. Estos factores influyen en la presentación clínica, las imágenes radiológicas, condicionan la selección del tratamiento, son determinantes en la evolución, las complicaciones y el pronóstico de la enfermedad.

La clínica de la neumonía se caracteriza por fiebre, sintomatología respiratoria variable y aparición de infiltrados en la radiología. Por lo tanto es una entidad de diagnóstico clínico, radiológico y evolutivo (3).

En las edades extremas de la vida su incidencia es mayor que en el resto de la población, siendo los pacientes mayores de 65 años los que presentan las consecuencias más graves. Representa un problema relevante en salud pública, tanto en sus aspectos sociales como económicos: elevada morbimortalidad, altas tasas de hospitalización, estancia hospitalaria prolongada y costes elevados.

### Epidemiología

En los Estados Unidos (EE.UU.) se diagnostican más de 2 millones de casos de NAC anuales, que conllevan 500.000 hospitalizaciones y 45.000 muertes, siendo la sexta causa más común de muerte en ese país (4). En Europa la incidencia de NAC oscila entre 1.07-1.7 casos por 1.000

habitantes/año y aumenta con la edad siendo de 14 casos por 1.000 habitantes/año en adultos mayores de 65 años (5).

La incidencia en España oscila entre 3 y 8 casos por 1.000 habitantes/año, requiriendo aproximadamente el 4% de ellas ingreso en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). La mortalidad global de la NAC está alrededor del 10% (6), aunque en pacientes graves se eleva hasta el 20% (7).

En Europa el coste anual de la neumonía es de 10 billones de euros anuales. De los cuales 5.7 corresponden a los pacientes hospitalizados, 0.5 a los pacientes ambulatorios, 0.2 a medicación y 3.6 a costes indirectos como la pérdida de días de trabajo (8). A este respecto, las infecciones respiratorias víricas causan mayor pérdida de días de trabajo que cualquier otra infección (9).

La incidencia de la NAC presenta variación estacional siendo más frecuente durante el invierno. El ratio de neumonía es más alto en hombres que en mujeres (10).

### **Patogénesis**

Los pulmones están constantemente expuestos a una mezcla de gases, partículas y microorganismos que se encuentran en el aire inspirado. Además los microorganismos presentes en la cavidad oral frecuentemente alcanzan las vías respiratorias superiores por microaspiración. Sin embargo el tracto respiratorio inferior suele permanecer estéril gracias a los diversos mecanismos de defensa del aparato respiratorio.

El desarrollo de una infección pulmonar aguda indica o bien un defecto en las defensas, la exposición a un organismo altamente virulento o a un inóculo muy elevado (11,12). Los microorganismos patógenos alcanzan las vías respiratorias inferiores por aspiración desde las vías superiores, inhalación de aerosoles o diseminación hematológica, siendo este último mecanismo el menos frecuente (13) y vinculado solo a microorganismos que posean esta capacidad hematológica.

Sistemas de defensa pulmonares: Los mecanismos de defensa respiratorios incluyen mecanismos innatos y adaptativos, como son la existencia de barreras anatómicas y mecánicas, inmunidad humoral, celular, etc.

Algunos factores interfieren en estos mecanismos y deber ser tenidos en cuenta para entender la patogenia de esta infección, como son las alteraciones en el nivel de vigilia (pueden comprometer el cierre epiglótico y conducir a la aspiración del contenido de la orofaringe), la exposición al humo del tabaco (altera la función mucociliar y la actividad macrofágica), las manipulaciones sobre la vía digestiva y respiratoria (intubación orotraqueal, colocación de sonda nasogástrica, fibroscopias,...), la edad (por inmadurez del sistema inmune en niños o por inmunosenescencia en ancianos), las alteraciones en la producción de inmunoglobulinas, los trastornos subyacentes del aparato respiratorio, etc. (3).

## Clínica

Desde el punto de vista clínico clásicamente se ha diferenciado la neumonía en neumonía típica o bacteriana, y atípica. Pese a que en la actualidad se pone en duda la especificidad global de los signos y síntomas con respecto a una etiología determinada, se considera útil mantener los citados subgrupos con fines didácticos (3).

La neumonía típica, causada habitualmente por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, bacilos gramnegativos o *Staphylococcus aureus*, es un cuadro de evolución aguda caracterizado por compromiso del estado general, fiebre, escalofríos, tos, expectoración purulenta y dificultad respiratoria, asociado en el examen físico a taquicardia, taquipnea, fiebre, y signos focales en el examen pulmonar: disminución del murmullo pulmonar, crepitaciones, etc. (14).

La neumonía atípica se describe en 1938 por Reimann (15) en un grupo de pacientes que presentaba un cuadro clínico atípico en el cual episodios que comenzaban como una enfermedad respiratoria leve avanzaban hacia neumonía con disnea y tos sin expectoración. La neumonía atípica se caracteriza por una disociación clínico-radiológica. *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydothila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, y los virus respiratorios son los agentes etiológicos que causan con más frecuencia neumonía atípica (13). El cuadro en este caso suele iniciarse de modo insidioso con cefalea, astenia, escasa afectación del estado general, tos seca o con escasa expectoración, fiebre y dolor torácico retroesternal que aumenta con la tos. Son frecuentes los síntomas extrarrespiratorios como náuseas, vómitos, exantema cutáneo, artromialgias, etc. La auscultación pulmonar revela la presencia de crepitantes finos, aunque puede ser normal. En la radiografía se observa un patrón intersticial. Los lóbulos inferiores son los que se afectan más frecuentemente (3).

Una mención especial merece la neumonía en ancianos. La presentación clínica se caracteriza por menor sintomatología que además es menos específica. En ocasiones se presentan con taquicardia inexplicable y trastornos en el nivel de vigilia sin fiebre. La radiología puede presentar opacidades tenues lo cual dificulta el diagnóstico. La curación y la resolución radiológica son más lentas, el pronóstico depende del retraso en el inicio del tratamiento, de la etiología y la presencia de comorbilidades (3).

### Neumonía grave

Aproximadamente el 10% de los pacientes con NAC desarrollan enfermedad grave, la cual se define por admisión en UCI por la presencia de shock que requiera vasopresores o insuficiencia respiratoria que requiera ventilación mecánica (7).

La identificación temprana de los pacientes en riesgo de desarrollar neumonía grave es esencial ya que estos pacientes presentan mayor mortalidad y requieren más tratamiento de soporte. Además el patrón de microorganismos causantes de neumonía grave difiere del patrón encontrado en casos leves por lo que el tratamiento empírico debe ser distinto. Algunos factores asociados con neumonía grave son la edad, presencia de comorbilidades, terapia antibiótica inadecuada o tardía y factores genéticos (16) .

### **Etiología**

Más de 100 microorganismos, incluyendo bacterias, virus, hongos y parásitos, pueden causar NAC. Aunque la lista de posibles agentes etiológico es amplia, hay algunos en los que la detección es especialmente importante ya que presenta una mayor importancia epidemiológica, enfermedad más grave o requieren tratamientos distintos a los regímenes estándar, entre estos se incluyen *Legionella spp.*, virus de la gripe, SARM, etc. (17).

El patógeno más frecuentemente aislado en la NAC es el *Streptococcus pneumoniae*. Otros agentes comunes son los virus respiratorios, *Mycoplasma pneumoniae*, y *Legionella spp.* *Chlamydophila pneumoniae* suele aparecer series como la cuarta o quinta causa más común. Las bacterias relacionadas con neumonías atípicas (*M. pneumoniae*, *Legionella spp.*, *C. pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*) con frecuencia no son identificadas en la práctica clínica al no existir test específicos, rápidos o estandarizados para su detección, con la excepción de *Legionella pneumophila* (10).

El uso de técnicas de diagnóstico molecular como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la cual presenta mayor sensibilidad que las técnicas clásicas como el cultivo viral o la detección de antígeno, ha permitido aumentar el diagnóstico de virus en la NAC, llegándose a documentar la presencia de virus en aproximadamente un 30% de los casos (18–20). El virus más frecuentemente identificado es el virus de la gripe(18,21,22). Otros virus comunes son el virus respiratorio sincitial (VRS), adenovirus o virus parainfluenza (18).

*Staphylococcus aureus*, Enterobacterias, y *Pseudomonas aeruginosa* son patógenos frecuentes en situaciones especiales, como después de padecer gripe, después de recibir tratamiento antibiótico, o en pacientes con comorbilidades pulmonares (10) .

La frecuencia de otros agentes etiológicos, como *Mycobacterium tuberculosis*, *C. psittaci* (psitacosis), *Coxiella burnetii* (fiebre Q ), *Francisella tularensis* (tularemia), y hongos (histoplasmosis, coccidioidomicosis, blastomicosis) varía según el contexto epidemiológico (10).

## **Gripe y otros virus causantes de neumonías**

Aunque el virus de la gripe continua siendo la principal causa viral de NAC en adultos, hay otros virus que son comunes en esta patología, como el VRS, adenovirus o virus parainfluenza, así como otros virus menos comunes, incluyendo el metapneumovirus humano, herpesvirus, coronavirus, o virus del sarampión. A continuación repasaremos las características generales de los virus mencionados en esta tesis.

### **Gripe**

#### **Introducción**

La gripe es una de las infecciones víricas de mayor importancia actualmente. La pandemia de gripe más famosa es la denominada “Gripe Española”, que ocasionó el fallecimiento de alrededor de 40 millones de personas entre 1918 y 1919. De hecho, murieron más personas debido a la gripe durante dicho período que en la Primera Guerra Mundial. (23).

Los virus de la gripe son virus con tropismo respiratorio principalmente que provocan sintomatología respiratoria y los clásicos síntomas gripales de fiebre, malestar, cefalea y mialgias. Epidemiológicamente se caracterizan por presentarse en forma de brotes o picos epidémicos estacionales principalmente en época invernal. La neumonía gripal primaria se desarrolla cuando la infección afecta al pulmón, y en muchas ocasiones cursa como una infección grave (10).

Los periodos epidémicos varían en pocos meses en su periodo de presentación anual. Este patrón de presentación estacional anual refleja los cambios que se producen en los componentes antigénicos del virus, y su diseminación depende de múltiples factores, incluyendo transmisibilidad del virus y susceptibilidad de la población. En particular los virus de la gripe A, tienen una gran capacidad de desarrollar cambios periódicos en sus glicoproteínas de membrana, la hemaglutinina y la neuraminidasa (24) que se conocen como variantes menores y variantes mayores.

### **Clasificación y morfología**

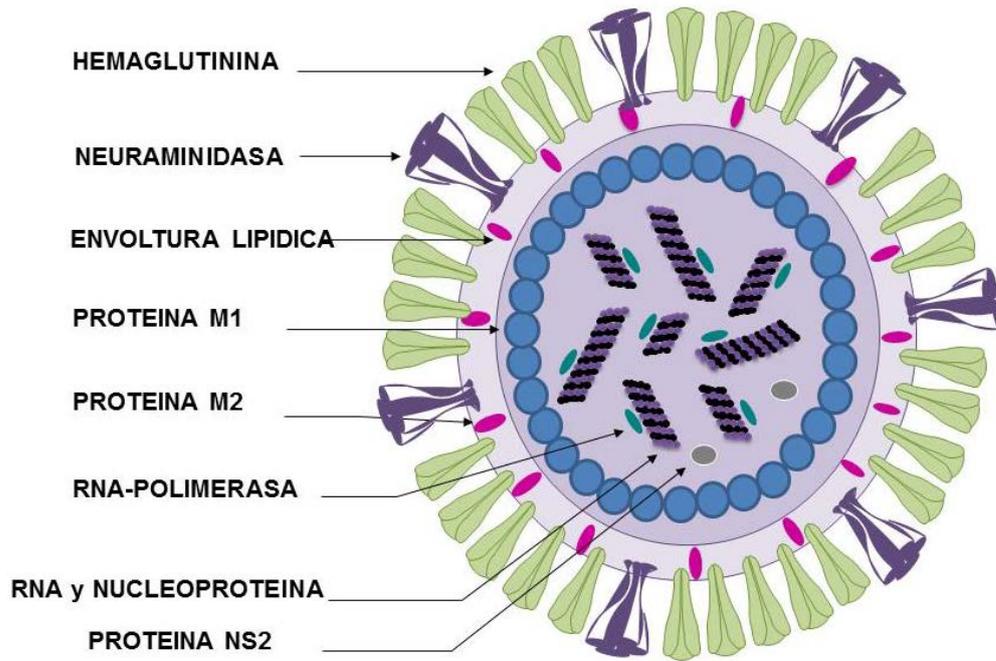
Los virus de la gripe pertenecen a la familia Orthomyxoviridae, la cual incluye cinco géneros, siendo el virus de la gripe A y el virus de la gripe B las dos especies más importantes en patología humana (Tabla 1).

El nombre Orthomyxoviridae hace referencia a la afinidad que presentan por la mucina, mucoproteína presente en el moco de diversas secreciones, en algunos receptores epiteliales, en la membrana de los hematíes y en el suero (de ahí su capacidad hemaglutinante)(25).

Orthomyxoviridae: Clasificación Baltimore Grupo V: (-) virus del ARNss			
Género	Especie	Subtipo	Huésped
<b>Influenzavirus A</b>	Gripe A	H1N1, H1N2, H2N2, H3N1, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H9N2, H10N7	Humanos, aves, otros mamíferos (cerdo, caballo...)
<b>Influenzavirus B</b>	Gripe B		Humanos, focas
<b>Influenzavirus C</b>	Gripe C		Humanos, cerdos y perros.
<b>Isavirus</b>	Virus de la Anemia Infecciosa del Salmón		<i>Salmo salar</i> (Salmón del Atlántico).
<b>Thogotovirus</b>	Thogoto virus	Thogoto virus	Garrapatas, Mosquitos, Mamíferos (incluyendo humanos)
	Dhori virus	Batken virus, Dhori virus	

**Tabla 1:** Clasificación de los virus de la familia Orthomyxoviridae.

Son virus de tamaño medio, ARN monocatenario fragmentado y simetría helicoidal. Los viriones tienen un diámetro de 80 a 120 nm, son pleomórficos pero tienden a adquirir una forma esférica o filamentosa en función de la cepa y el tipo de célula hospedadora. Están provistos de una membrana de envoltura lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula infectada (26).



**Figura 1:** Estructura del virus de la gripe (Modificado de R. Ortiz de Lejarazu).

En la superficie interna de la envuelta se encuentra el armazón proteico del virus, compuesto principalmente por la proteína matriz M1, a la que se asocia la proteína NEP (*Nuclear Export Protein*), implicada en la exportación de las ribonucleoproteínas (RNPs) al citoplasma (27).

Atravesando la membrana lipídica encontramos la glicoproteína M2, que forma un canal iónico necesario para la infectividad viral (28) debido a que facilita la acidificación interna del virus, paso decisivo para iniciar la replicación viral.

Por fuera en la estructura y ancladas en la envoltura, a modo de proyecciones, se disponen dos tipos de glicoproteínas, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). La glicoproteína NA forma un homotetrámero (29) con forma de seta, mientras que la HA forma un homotrímero (30) y su estructura termina en una forma globular.

La HA es el componente glicoproteico más importante constituyendo el 25 % de las proteínas víricas. Es la responsable de la fijación del virus a los receptores mucoproteicos de las células del epitelio respiratorio y de la fusión entre la envoltura vírica y la membrana celular. Es uno de los principales antígenos del virus siendo el desencadenante fundamental de la producción de anticuerpos neutralizantes protectores (31).

La NA es una N-acetilneuraminilhidrolasa, enzima que cataliza la liberación del ácido N-acetilneuramínico, componente de todas las mucinas. Su función principal es la liberación de las partículas virales de las mucosas permitiendo el ingreso del virus en la célula así como la liberación y difusión de nuevos viriones y apoptosis celular. Al igual que la HA, contiene determinantes antigénicos específicos de cada cepa (31).

En el interior del virión se encuentra la nucleocápside de simetría helicoidal, constituida por 8 segmentos de ARN asociados a la polimerasa viral y múltiples copias de una nucleoproteína (NP) formando lo que se conocen como ribonucleoproteínas (RNPs). En estas RNPs la estructura básica está formada por un fragmento de RNA monocatenario de polaridad negativa superenrollado asociado a la nucleoproteína (NP) y la polimerasa viral – un trímero formado por la proteína básica 1 (PB1), la proteína básica 2 (PB2) y la proteína ácida (PA) –, que constituyen el complejo enzimático viral encargado de la síntesis del ARN o ARN polimerasa (32).

Las ocho ribonucleoproteínas (RNPs) contienen aproximadamente 13.500 nucleótidos y codifican las 10 proteínas virales esenciales mencionadas así como al menos siete proteínas accesorias (33).

### **Variaciones antigénicas**

Los virus gripales poseen dos clases de antígenos: los antígenos internos específicos de tipo: NP y M, y los antígenos superficiales específicos de subtipo dependientes de la hemaglutinina (antígeno H) y de la neuraminidasa (antígeno N) (34).

La variabilidad antigénica es característica de los virus de la gripe A y se debe a que estos virus ARN tienen mecanismos de mutación, recombinación y reordenamiento genético que les permiten exhibir una mayor o menor virulencia y patogenicidad e incluso la capacidad de atravesar las barreras de susceptibilidad inter-especies (35). Los virus de la gripe B tienen variantes menores pero no mayores, habiéndose descrito únicamente cambios en la hemaglutinina (24).

La frecuencia de mutación de los virus de la gripe es de 1:100.000/nucleótidos. Estas nuevas variantes obtienen una ventaja evolutiva ya que los anticuerpos existentes no pueden neutralizar al virus.

La variabilidad antigénica de los virus gripales sigue dos formas, una constante llamada deriva antigénica (*antigenic drift*) en la que intervienen de un lado la capacidad de mutación del virus y de otro la selección natural de sus huéspedes humanos que da lugar a las variantes menores. Las variaciones menores suponen la aparición de una cepa frente a la cual la población presenta una inmunidad parcial por exposiciones previas a las cepas originales. Las epidemias anuales de gripe se producen como consecuencia de estas variaciones menores (36).

La otra forma de variabilidad la constituyen las variantes mayores (salto antigénico o *antigenic shift*) que implican la aparición de una cepa antigénicamente nueva. Si estos cambios se dan en genes que codifican para la HA o la NA la cepa resultante puede extenderse rápidamente y provocar una gran morbilidad y mortalidad en toda la población, incluyendo población joven y sana, ya que la inmunidad previa existente no es capaz de frenar el desarrollo de la infección. Estos cambios antigénicos son responsables del origen de la grandes pandemias de gripe de la historia (35), incluyendo la pandemia del 2009.

Las variaciones mayores se producen por fenómenos de reordenamiento genético o de salto de barrera de especie. El reordenamiento consiste en un intercambio de genes de virus que coinfectan la misma célula. Si el reordenamiento se produce entre virus humanos y animales el resultado puede ser una cepa pandémica, esto ocurrió con las cepas que causaron las pandemias del 57, 68 y 2009 (24).

El segundo caso (salto de barrera de especie) se trata de una transmisión directa a humanos sin intermediarios. La mayor parte de estas transmisiones inter-especie no prosperan y simplemente causan brotes ocasionales aislados (37,38) o casos esporádicos durante largos períodos de tiempo.

Hasta la fecha se conocen 17 HA y 10 NA distintas (Tabla 2).

Hemaglutinina		Neuraminidasa	
Subtipo	Hospedadores predominantes	Subtipo	Hospedadores predominantes
H1	Humanos, cerdos, aves	N1	Humanos, cerdos, aves
H2	Humanos, cerdos, aves	N2	Humanos, cerdos, aves
H3	Aves, humanos, cerdos, caballos	N3	Aves
H4	Aves	N4	Aves
H5	Aves (humanos)	N5	Aves
H6	Aves	N6	Aves
H7	Aves, caballos (humanos)	N7	Caballos, aves
H8	Aves	N8	Caballos, aves
H9	Aves (humanos)	N9	Aves
H10-H16	Aves		
H17	Murciélago	N10?	Murciélago

**Tabla 2:** Hospedadores naturales de los virus de la gripe A (modificado de (34)).

## Epidemiología y Patogenia

El virus de la gripe infecta principalmente células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior. Las partículas virales se adhieren a su receptor celular, el ácido siálico, que es reconocido por la HA (30).

La gripe es una enfermedad altamente transmisible y de distribución mundial. Se presenta anualmente en forma de epidemias de unas ocho- diez semanas de duración (39).

En climas templados las epidemias se producen en invierno (40). Normalmente se detecta una cepa mayoritaria o predominante, pero es posible la convivencia de dos cepas diferentes, o incluso 2 subtipos (por ejemplo A/H1N1 y A/H3N2) o 2 tipos distintos (A y B) en proporción variable (13).

Durante una epidemia se infectan entre el 10 y el 20% de las personas no vacunadas. La transmisión se puede producir por contacto (directo o indirecto), aerosoles (partículas >10 µm) o por vía aérea (partículas <5 µm), siendo las dos primeras vías las más comunes (41).

El primer signo de comienzo de la epidemia gripal generalmente se da en población pediátrica, con un aumento de los casos de enfermedad respiratoria febril. Posteriormente comienzan a aparecer cuadros gripales en adultos, tras lo cual aumentan los ingresos hospitalarios por

neumonía, exacerbaciones de EPOC e insuficiencia cardíaca congestiva. En esa fase también es llamativo el aumento del absentismo tanto laboral como escolar. Un indicador muy específico pero tardío de gripe es el aumento de la mortalidad por neumonía (13).

Las pandemias son brotes que se asocian a la aparición de un virus nuevo contra el que la mayoría de la población carece de inmunidad, existe transmisión de persona a persona y se detectan epidemias en varias regiones distantes del planeta al mismo tiempo (42). Las pandemias gripales pueden aparecer fuera de la estacionalidad habitual, incluso en los meses de verano. Las tasas de ataque son altas en todos los grupos de edad, destacando un aumento de la mortalidad entre adultos jóvenes respecto a las epidemias anuales (13).

Las epidemias más importantes descritas en el siglo pasado y que alcanzaron características de pandemias fueron la denominada “Gripe Española” en el año 1918 (H1N1), la “Gripe Asiática” en 1957 (H2N2) y la “Gripe Hong Kong” en 1967 (H3N2). La pandemia del año 1918 fue la que registró un mayor número de muertos (34).

### **Pandemia de 2009**

En marzo de 2009 se detectó en México un aumento de neumonías de origen viral, con síntomas similares a los producidos por la gripe. Al mismo tiempo los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) declararon el descubrimiento de una nueva cepa del virus de la gripe en dos niños californianos (43).

Esta nueva cepa se identificó posteriormente como una cepa de gripe A H1N1 procedente de un reordenamiento genético de virus humanos, aviares y porcinos (44,45). Los primeros estudios indicaron que se trataba de un virus de baja virulencia y alta transmisibilidad (46).

La expansión del virus fue rápida y en junio la OMS declaró el nivel de alerta pandémica de fase 6, después de confirmarse más de 27.000 casos en 74 países, con un total de 141 fallecidos (42). Este fue el inicio de la primera pandemia gripal del siglo XXI (47). En agosto del 2010, la OMS declara el final de la pandemia, hubo casos confirmados en más de 200 países y más de 18.000 fallecidos (48).

La circulación del virus A/H1N1pdm09 en España se detectó por primera vez en la semana 21/2009 (del 24 al 30 de mayo de 2009) en la red centinela de Madrid, propagándose después al resto del territorio español

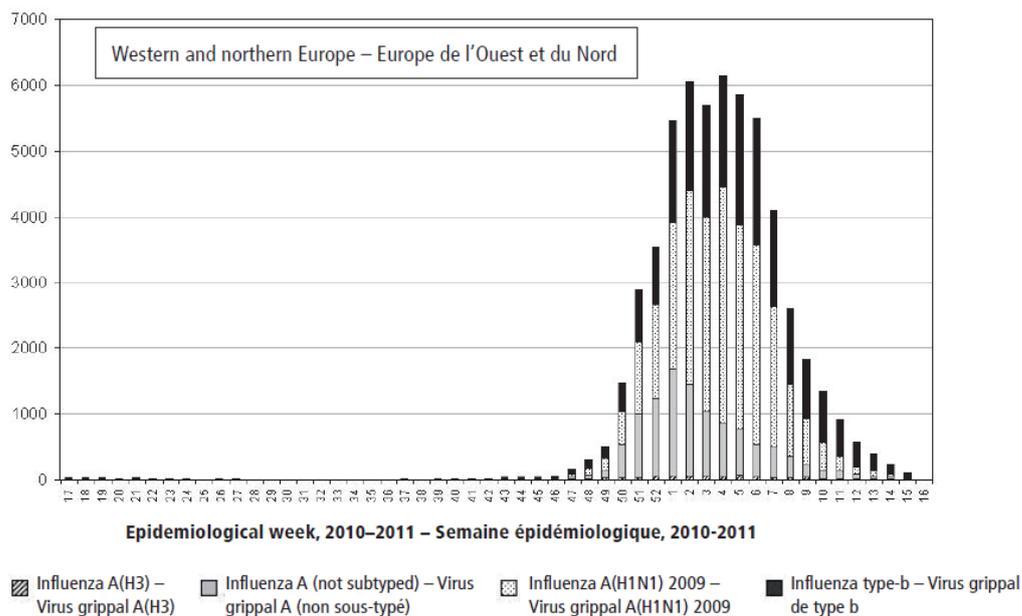
Tras la pandemia de 2009, el virus (denominado ahora como virus A/H1N1pdm09), se ha estacionalizado y continua circulando en humanos causando epidemias estacionales de distinta intensidad.

### **Temporada postpandémica 2010-2011**

En Estados Unidos y Canadá, la temporada de gripe estacional comenzó en noviembre, siendo el virus A(H3N2) el mayoritario, aunque en EE.UU. también se detectaron virus de la gripe B y virus pandémico.

En Europa y Oriente Medio, por el contrario, el virus pandémico fue el predominante (49). En Europa la temporada gripal comenzó en diciembre en Inglaterra. El 75% de los casos se debieron al virus pandémico y el 20% a virus de la gripe B.

El porcentaje fue similar en España, con un 72% de casos debidos a virus pandémico y un 27% a virus B. En otros países el porcentaje de virus pandémico fue muy superior, llegando por ejemplo al 98% en Grecia (50).



**Figura 2:** Detección semanal de virus gripales en Europa (norte y oeste), mayo 2010-Abril 2011. (49).

En Asia la temporada comenzó a finales de octubre, en las primeras semanas prácticamente todos los casos estaban causados por virus A(H3N2), pero los aislamientos de virus pandémico fueron aumento al avanzar la temporada. Por ejemplo en Taiwán finalmente el 45% de los casos fueron causados por virus pandémico, y 46% por virus H3N2 (50).

En España en la temporada postpandémica, a diferencia de la temporada pandémica, los pacientes presentaban mayor edad media y más comorbilidades. Este comportamiento probablemente se debió a que en esta temporada gran parte de la población presentaba ya inmunidad frente al virus, bien por vacunación o bien por haber padecido la infección la temporada previa, por lo que el virus encontraba menor población susceptible y la infección era más común en pacientes con algún tipo de alteración inmunológica (51). Es llamativo el porcentaje de pacientes no vacunados entre los pacientes graves, que en algunas series alcanzo el 92.6% (52).

## Clínica

- Gripe no complicada

En la mayoría de las ocasiones la gripe cursa como un cuadro autolimitado de unos 5 días de duración que afecta a vías aéreas superiores. El cuadro comienza tras un período de incubación de 1 a 2 días y cursa con fiebre, escalofríos, cefalea, mialgias, malestar general y anorexia. Los síntomas sistémicos y la fiebre suelen durar unos 3 días. Los síntomas respiratorios – tos seca, dolor faríngeo, obstrucción nasal o rinorrea– aunque aparecen al comienzo de la enfermedad suelen verse eclipsados por los síntomas sistémicos. Este predominio de los síntomas sistémicos es una característica típica de la gripe y ayuda a su diagnóstico diferencial con otras infecciones virales de las vías respiratorias altas. En población anciana el cuadro puede presentarse con fiebre y confusión, con pocos o ningún síntoma respiratorio. En adultos sanos, los síntomas pueden variar ampliamente desde la presentación sintomática clásica hasta una presentación leve y prácticamente asintomática (53).

- Complicaciones de la gripe

Las complicaciones de la gripe pueden ser pulmonares o no pulmonares. Entre las primeras destacan la neumonía viral primaria y la neumonía bacteriana secundaria. La neumonía viral primaria comienza como un síndrome gripal típico, con una progresión rápida de la fiebre, tos, disnea y cianosis. Además de neumonía se pueden producir otras complicaciones respiratorias como laringotraqueobronquitis o exacerbación de EPOC (13). Entre las complicaciones no respiratorias se encuentran la miositis, complicaciones cardíacas, síndrome de Reye y otras (13).

En las temporadas epidémicas del 11 al 19% de los pacientes hospitalizados por gripe requieren ingreso en UCI. Las complicaciones y la muerte por gripe ocurren fundamentalmente en población en las edades extremas de la vida, o en aquellos pacientes con patologías crónicas (54).

## Enterovirus

### Introducción

Los enterovirus pertenecen a la familia Picornaviridae. Existen más de 60 serotipos de enterovirus humanos, los cuales originalmente se clasificaron en 4 grupos: poliovirus, virus coxsackie del grupo A, virus coxsackie del grupo B y ECHOvirus, esta clasificación ofrecía dificultades por lo que en base a la homología del ARN dentro de la región que codifica la proteína VP1 actualmente los enterovirus se han dividido en 4 especies (A, B, C y D) (55,56).

Un serotipo específico de enterovirus puede provocar diversos síndromes patológicos distintos. De igual modo, varios serotipos distintos pueden causar una misma enfermedad dependiendo de cuál sea el órgano diana afectado (23).

En contra de lo que parece indicar su nombre, los enterovirus normalmente no provocan enfermedades entéricas, aunque se transmiten por vía feco-oral. Las enfermedades que producen los enterovirus están determinadas principalmente por diferencias en su tropismo tisular, y por la capacidad citolítica de cada uno de ellos (23).

### Clasificación y morfología

Los viriones de enterovirus carecen de envoltura y poseen una cápside icosaédrica de unos 30 nm, que rodea un genoma de ARN monocatenario (13).

### Epidemiología y patogenia

Los enterovirus presentan distribución mundial. Las tasas de infección varían con la estación, con la geografía y con la edad y nivel socioeconómico de la población estudiada. Las infecciones por enterovirus se producen a lo largo de todo el año, pero en los climas templados las infecciones son más prevalentes en los meses de verano y otoño (junio a octubre en el hemisferio norte) (56). El 75% de las infecciones enterovirales se producen en niños menores de 15 años de edad (56).

Los enterovirus se eliminan por las heces y en las secreciones del aparato respiratorio. La transmisión puede producirse por contacto directo interpersonal o de forma indirecta por la

exposición a fuentes ambientales contaminadas por enterovirus (13). La vía de entrada son las vías respiratorias superiores, la bucofaringe o el tubo digestivo (23).

El virus se multiplica en tejidos linfáticos submucosos y ganglios linfáticos regionales dando lugar a una viremia primaria también denominada menor o transitoria cuyo resultado más común es una infección subclínica.-En una minoría de pacientes, se produce una replicación posterior de virus en el sistema reticuloendotelial, que da lugar a una viremia secundaria, sostenida o principal que permite la diseminación del virus a diversos órganos diana, como el sistema nervioso central, el corazón y la piel (13).

Alrededor del 95% de las infecciones causadas por poliovirus de tipo natural y al menos el 50-80% de las debidas a enterovirus no-polio son asintomáticas. Cuando aparece la enfermedad, suele corresponder a un cuadro febril que dura sólo unos pocos días, a menudo acompañado de síntomas de infección de las vías respiratorias altas (57). Estas enfermedades pueden estar causadas por casi todos los serotipos de enterovirus y su clínica es indistinguible de la infección causada por otros muchos virus. Los síndromes clínicos característicos de los enterovirus, (por ejemplo, meningitis aséptica, pericarditis, exantemas, fiebre, etc.) se producen en una minoría de los pacientes infectados, siendo lo normal que existan numerosas infecciones asintomáticas por cada caso clínico que aparece.

### **Clínica**

Los enterovirus manifestaciones clínicas muy diversas, incluyendo cuadros febriles inespecíficos, infección respiratoria, parálisis, meningitis, encefalitis, enfermedad boca-mano-pie, exantema, conjuntivitis hemorrágica, etc. (23).

## Rinovirus

### Introducción

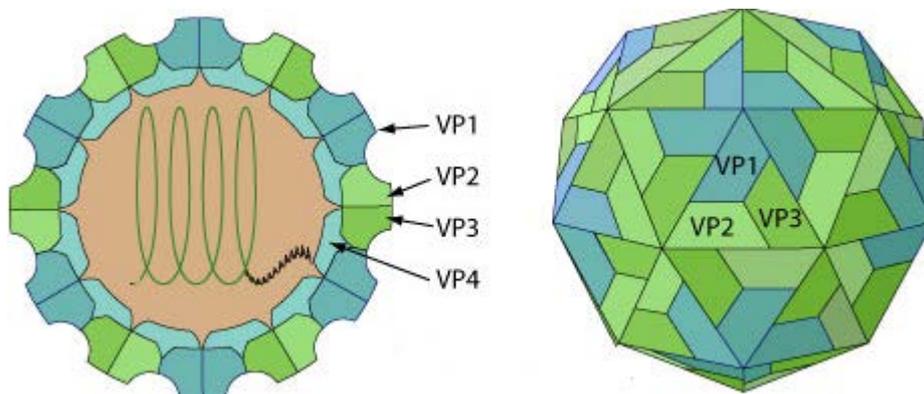
La familia Picornaviridae incluye nueve géneros, entre los cuales cuatro causan infecciones en humanos: *Rhinovirus*, *Enterovirus*, *Parechovirus*, y *Hepatovirus*

Los rinovirus se encuentran entre los patógenos más comunes que afectan a humanos. Están implicados en un 30-50% de los casos de enfermedad respiratoria aguda y son la causa más frecuente del resfriado común (13).

### Clasificación y morfología

El método tradicional de clasificación de los rinovirus humanos es el serotipado, existiendo más de 100 serotipos, aunque también existen otras clasificaciones (tipo de receptor, sensibilidad a los antivirales o genotipo). Los avances tecnológicos han permitido secuenciar bastantes de estos serotipos, y el análisis filogenético de las secuencias ha dividido los serotipos en 2 grupos genéticos, conocidos como A y B (13).

Poseen un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva de aproximadamente 7.200pb que codifica un sola poliproteína formada por cerca de 2.200 aminoácidos. El genoma está rodeado de una cápside icosaédrica de unos 30 nm de diámetro. La cápside está formada por repeticiones de cuatro polipéptidos (VP1 a VP4) (23).**(Figura 3)**



**Figura 3:** Estructura de los rinovirus (58).

## **Epidemiología y Patogenia**

Los rinovirus se distribuyen a nivel mundial y causan infecciones durante todo el año, aunque presentan dos picos epidémicos anuales. Uno de ellos entre finales de agosto y principios de septiembre, y un segundo pico en abril o mayo (59).

La mayoría de los rinovirus se replican mejor entre 33-35°C, lo que llevó a la asunción de que sus infecciones se limitaban a las vías respiratorias superiores, ya que la temperatura de esas superficies mucosas es relativamente fría. Actualmente existen numerosas evidencias de que las infecciones del tracto respiratorio inferior son frecuentes. (60).

El diagnóstico molecular por PCR ha aumentado sustancialmente la capacidad para detectar virus respiratorios incluidos los rinovirus, que son virus de difícil cultivo celular. Los estudios que usan diagnóstico molecular han aportado abundantes evidencias que relacionan los rinovirus con bronquitis, bronquiolitis y neumonía y exacerbaciones de EPOC (60).

El mecanismo de transmisión principal es DE persona a persona por contacto directo (manos, conjuntiva,...) o por fómites o aerosoles (59). Los rinovirus resisten viables durante largos períodos de tiempo en las superficies.

Una vez se ha establecido la infección, los síntomas respiratorios son resultado de dos procesos: la destrucción del tejido aéreo causada directamente por el virus y la respuesta inmune proinflamatoria. El daño producido en el epitelio altera la fisiología de las vías aéreas mediante mecanismos como el edema, el aumento en la producción de moco y mecanismos biomoduladores del propio rinovirus (60).

En los virus que infectan a relativamente pocas células en las vías aéreas, como es el caso del rinovirus, la respuesta inmune inflamatoria contribuye considerablemente a los síntomas. La mayoría de las células reclutadas hacia las vías aéreas son neutrófilos, los productos de la activación neutrofílica están implicados en la obstrucción de las vías aéreas y causan síntomas respiratorios de vías inferiores (60). Existen evidencias de que los rinovirus han desarrollado mecanismos que inhiben la respuesta antiviral específica mediante la escisión de proteínas como RIG-I e IPS-1, implicadas en las rutas de reconocimiento de los virus (60).

## Clínica

El síndrome clínico principal que se asocia con la infección por rinovirus es una enfermedad de las vías respiratorias superiores que suele denominarse resfriado común. Los síntomas más frecuentes incluyen tos, rinorrea y obstrucción nasal. Los niños pueden presentar fiebre en los estadios iniciales de la enfermedad, aunque no los adultos. La duración de los síntomas en adultos suele ser de una semana, en niños se puede prolongar hasta los 10 días. Los rinovirus contribuyen significativamente a la aparición de exacerbaciones asmáticas y sibilancias, sobre todo en niños y adultos jóvenes.

Es responsable del 15% de las neumonías en el primer mes de vida, y también es causa común de neumonías en pacientes inmunodeprimidos. En pacientes receptores de médula ósea la mortalidad puede ascender hasta el 30% (9).

## Virus respiratorio sincitial

### Introducción

El virus respiratorio sincitial (VRS), causa infecciones respiratorias en personas de todas las edades. Tradicionalmente considerado como un patógeno infantil, el VRS también puede causar NAC en adultos, siendo la enfermedad especialmente grave en pacientes ancianos y en individuos inmunocomprometidos (61).

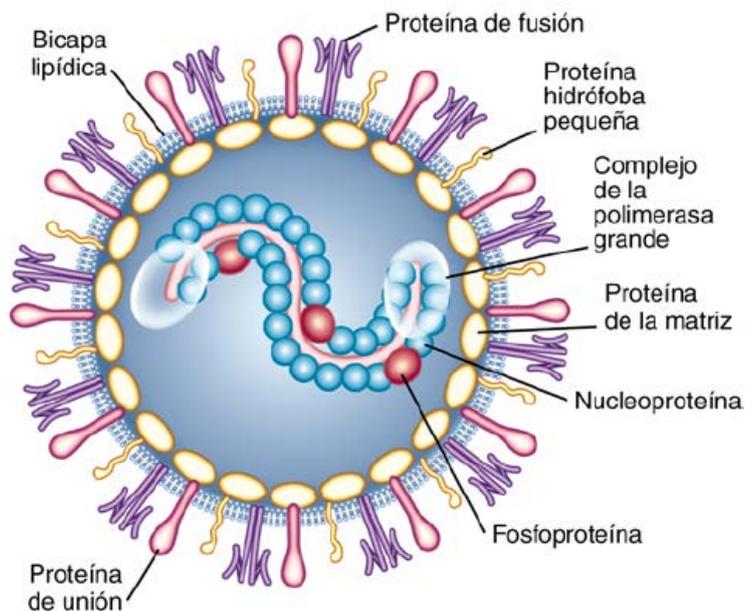
### Clasificación y morfología

Pertenece al orden Mononegavirales, familia Paramyxoviridae, subfamilia Pneumovirinae, género *Pneumovirus*. Dentro de la misma subfamilia también se encuentra el género *Metapneumovirus*, al que pertenece el Metapneumovirus humano. Los rasgos característicos del VRS son el número y orden de los genes y la ausencia de actividad hemaglutinante y neuraminidasa (13).

La morfología de los viriones de VRS coincide con la del resto de los paramyxovirus, debido a que poseen una envuelta procedente de la membrana plasmática de la célula infectada pueden adoptar formas esféricas, filamentosas o pleomórficas. En dicha membrana pueden distinguirse unas espículas correspondientes a glicoproteínas de membrana.

Es un virus de tamaño medio (120-300 nm). Su genoma, de alrededor de 15.000 nucleótidos, consta de una única molécula de ARN monocatenario de polaridad negativa que se asocia con proteínas de origen vírico constituyendo la nucleocápside, que presenta simetría helicoidal. Un armazón proteico, denominado matriz, separa al nucleocápside de la envuelta exterior.

El genoma del VRS codifica diez proteínas, siendo tres de ellas no estructurales (NS1, NS2 y M<sub>2-2</sub>). De las siete proteínas estructurales restantes, cuatro forman parte del complejo de la nucleocápside: la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), polimerasa (L) y el factor de procesividad de la transcripción (M<sub>2-1</sub>). A la envoltura se asocian tres proteínas transmembrana de superficie, dos de las cuales, la proteína de fusión (F) y la proteína de unión (G) son glicoproteínas de membrana que se corresponden con las espículas que se proyectan desde la envuelta del virus, y la tercera es la proteína que conforma el armazón de la matriz (M). Por último existe una proteína pequeña e hidrófoba (SH) de función desconocida (**Figura 4**).



**Figura 4:** Estructura del virus respiratorio sincitial. (13)

Atendiendo a variaciones antigénicas y genéticas los diferentes aislados de VRS pueden diferenciarse en dos grupos denominados VRS-A y VRS-B (26). Ambos subtipos suelen estar presentes simultáneamente en los brotes causando infecciones con similar gravedad (62,63).

### **Epidemiología y patogenia.**

El VRS se presenta habitualmente en forma de brotes, los cuales ocurren entre noviembre y abril en el hemisferio norte, con un pico en enero o febrero (64). Las cepas de ambos grupos circulan simultáneamente durante los brotes, pero las proporciones entre A y B varían en cada brote (65).

El virus causa enfermedad respiratoria del tracto inferior en personas de todas las edades. Los pacientes en riesgo para padecer infección del tracto respiratorio inferior incluyen niños menores de 6 meses de edad, especialmente aquellos nacidos durante la primera mitad de la temporada viral y aquellos que acuden a guarderías (66,67), niños con enfermedades respiratorias de base (68), recién nacidos pretérminos de menos de 35 semanas de gestación (68), pacientes inmunocomprometidos (69,70), ancianos en residencias (71) o con enfermedades respiratorias crónicas (72).

El VRS es la causa más frecuente de infecciones del tracto respiratorio inferior en niños menores de un año (73). En los países de nuestro entorno, en los que la epidemiología de este virus es relativamente homogénea, el VRS es el responsable del 42-45% de las hospitalizaciones por enfermedad respiratoria del tracto inferior en niños menores de 2 años. En estos pacientes, particularmente en neonatos, cuyos pulmones aún son inmaduros, el riesgo de bronquiolitis o neumonía asociados a la primoinfección con VRS es elevado (26).

El VRS también es una causa significativa y frecuentemente infradiagnosticada de enfermedad respiratoria del tracto inferior en ancianos e inmunodeprimidos (71,74). Dada la similitud de los síntomas y la ausencia de diagnóstico etiológico en numerosos casos de neumonía, es frecuente que se atribuyan al virus de la gripe muertes causadas por el VRS (75).

La enfermedad aguda causada por el VRS no está restringida a población pediátrica y población adulta de riesgo. Los adultos sanos se infectan repetidamente a lo largo de su vida presentando típicamente síntomas restringidos a las vías respiratorias superiores (76). En adultos el VRS es responsable del 2.6% de los casos de NAC (77), y es el tercer agente

etiológico más frecuente en la NAC que requiere hospitalización, por detrás de *S. pneumoniae* y del virus de la gripe (78). Las reinfecciones son relativamente frecuentes, incluso en una misma temporada, dado que la inmunidad frente a este virus no es totalmente efectiva (26).

En cuanto a la predisposición genética a padecer enfermedad grave por VRS, se ha encontrado asociación con polimorfismos en genes relacionados con citoquinas y quimiocinas, incluyendo IL-4 y su receptor, IL-8, IL-10, IL-13 y CCR5 (79–83).

El VRS se transmite por vía respiratoria a través de mucosas como la nasofaríngea o la ocular. El contacto directo, por aerosoles a corta distancia (1 metro), es la vía más común de transmisión (84,85). El virus puede sobrevivir varias horas en manos y fómites (86).

El período de incubación es de 4 a 6 días (87). El período de excreción viral dura 3-8 días, aunque puede alargarse hasta 4 semanas en recién nacidos y varios meses en el caso de niños infectados por VIH (88).

El virus se replica en el epitelio respiratorio, sobre todo en las células cilíndricas ciliadas. Durante la primoinfección, la infección de las vías respiratorias inferiores suele manifestarse como bronquiolitis (89). El VRS se encuentra en general restringido al epitelio respiratorio. Aunque no es común, en ocasiones se ha recuperado el virus de tejidos extrapulmonares, como el hígado (90) o líquido cefalorraquídeo (91).

La respuesta inmune frente al VRS, especialmente en lo referido a liberación de cito y quimiocinas parece jugar un papel en la patogenia y la gravedad de la bronquiolitis (92,93). En las secreciones pulmonares de los pacientes infectados se detectan numerosas citoquinas, habiendo demostrado la IL-6 y la MIP-1 $\alpha$  asociación con la gravedad (76).

Aunque prácticamente todos los individuos han sido infectados por VRS antes de los 3 años de edad, la infección previa no proporciona protección completa frente a la reinfección, ni siquiera cuando el título de anticuerpos es elevado (94). La inmunidad humoral parece ser más importante para disminuir la gravedad de la infección que para proteger completamente de la enfermedad ya que los individuos pueden infectarse más de una vez en la misma temporada viral, las infecciones siguientes a la primera suelen ser más leves (95), los anticuerpos adquiridos por vía transplacentaria no protegen al recién nacido de la infección (aunque aquellos que poseen títulos elevados suelen presentar enfermedades más leves y restringidas

a las vías respiratorias superiores(96)) y los individuos ancianos con bajos niveles de IgG-anti VRS son más propensos a desarrollar infecciones sintomáticas que aquellos que presentan altos niveles (72).

### **Clínica**

Las manifestaciones clínicas varían dependiendo de la edad, estado de salud, y si la infección es primaria o secundaria. En general se puede establecer una relación inversa entre gravedad y edad, cuanto mayor edad, menor gravedad y viceversa. En recién nacidos y niños la infección primaria se suele presentar como infección del tracto respiratorio inferior, siendo la presentación más frecuente la bronquiolitis, seguida de neumonía y traqueobronquitis (73) que a menudo requieren ingreso, de hecho la infección por VRS representa una de las principales causas de ingreso hospitalario en menores de 2 años (97). En adultos se presenta con síntomas de afectación de vías altas o traqueobronquitis (98), aunque se puede desarrollar cualquier tipo de infección respiratoria inferior, sobre todo en ancianos institucionalizados o en individuos inmunocomprometidos (99).

La infección por VRS en los adultos mayores supone una elevada morbimortalidad. Se ha descrito que en centros de crónicos, el 5-27% de las infecciones respiratorias están causadas por VRS. La tasa de ataque suele estimarse en un 1-15%, la tasa de neumonía en el 10-20% y la mortalidad en un 2-5% (100).

El riesgo de afectación de las vías respiratorias inferiores es alto en la primoinfección. Se estima que la neumonía o bronquiolitis ocurre en el 30-71% de los casos, dependiendo de la edad y población (73). Las infecciones recidivantes suelen ser enfermedades respiratorias de vías respiratorias superiores, pero el 20-50% de las infecciones recidivantes en los niños en edad preescolar afectan a las vías respiratorias inferiores (101). Los segundos episodios de enfermedad de las vías respiratorias inferiores en los niños pocas veces son tan graves como el episodio inicial y muchos se asocian a sibilancias. Los adultos también pueden tener infecciones repetitivas por VRS en años consecutivos (98).

# Metapneumovirus humano

## Introducción

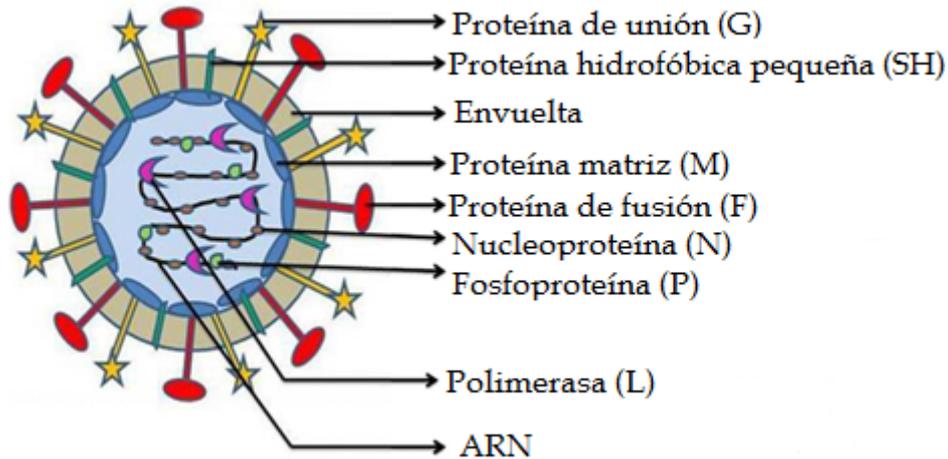
Se describió por primera vez en Holanda en 2001. Fue aislado en secreciones nasofaríngeas de 28 niños con infecciones de las vías respiratorias superiores, en muestras recogidas a lo largo de veinte años. Los análisis serológicos demuestran que la infección por metapneumovirus es de casi universal a los 5 años de edad y que su difusión humana se ha producido al menos durante 50 años (102).

Causa infecciones respiratorias superiores e inferiores en todos los grupos de edad, aunque la enfermedad sintomática es más frecuente en niños y ancianos (103).

## Clasificación y morfología

Pertenece al orden Mononegavirales, familia Paramyxoviridae, subfamilia Pneumovirinae, género *Metapneumovirus* (102). Dentro de la misma subfamilia también se encuentra el género *Pneumovirus*, al que pertenece el VRS.

Es un virus ARN envuelto, con ARN monocatenario no segmentado de polaridad negativa. Los viriones son pleomórficos, esféricos o filamentosos, con una envoltura lipídica (102). Su diámetro varía de 150 a 6000 nm (104). El genoma contiene 8 genes que codifican 9 proteínas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína matriz (M), proteína de fusión (F), factor de elongación de la transcripción ( $M_{2-1}$ ), factor regulador de la síntesis de ARN ( $M_{2-2}$ ), proteína hidrofóbica pequeña (SH), proteína de unión (G) y subunidad mayor de la polimerasa (L) (105).



**Figura 5:** Estructura del Metapneumovirus (modificado de (104)).

Presenta un alto nivel de homología con el metapneumovirus aviar. Se han observado variaciones genéticas entre las distintas cepas, que se agrupan en dos genotipos principales (A y B) y cuatro subgrupos con dos sublinajes (A1, A2a, A2b, B1 y B2) (106,107). Los dos genotipos suelen circular simultáneamente, aunque cada año normalmente predomina uno de ellos (104).

### **Epidemiología y Patogenia**

El virus es ubicuo, causa infecciones respiratorias inferiores y superiores en pacientes de todos los grupos de edad (102). Se cree que la transmisión se produce por vía respiratoria directa o por contacto con secreciones contaminadas, incluyendo aerosoles, gotículas o fómites (103).

En climas templados el virus circula predominantemente durante el final del invierno y principio de la primavera, aunque también se puede presentar una circulación de bajo nivel durante el verano (13).

Cerca del 2% de las enfermedades respiratorias agudas en la población general se deben al metapneumovirus (108).

A los 5 años de edad prácticamente todos los niños presentan evidencia serológica de infección previa (102). Dependiendo de la época del año el metapneumovirus es la segunda o tercera causa de enfermedad grave del tracto respiratorio inferior en niños, después del VSR y de la gripe (109,110).

Como otros miembros de la familia Paramyxoviridae, el metapneumovirus interfiere con la respuesta inmune innata del huésped afectando a los TLR, a la actividad de las células dendríticas y reduciendo la activación de células T, de manera que el aclaramiento viral no es completo y aumenta la probabilidad de reinfecciones, las cuales son frecuentes. (104).

La información relativa a la patogenia de la enfermedad causada por el metapneumovirus se ha obtenido sobre todo de modelos animales. En roedores, el virus se replica con eficacia en las vías respiratorias superiores e inferiores, con un pico de los títulos virales entre los días 3 y 5. La infección pulmonar se caracteriza por inflamación alveolar e intersticial (105). Comparado con el VRS el metapneumovirus provoca una respuesta más intensa de IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y una inducción más débil de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  (104).

### **Clínica**

El periodo de incubación es de unos 5 días (111). No se conoce la cinética de excreción viral ni su relación con los síntomas.

Las manifestaciones clínicas de la infección por el metapneumovirus son similares a las del VRS y oscilan desde infecciones leves de vías altas hasta bronquiolitis o neumonías graves que requieran ventilación mecánica (105). La infección sintomática es más frecuente en niños y ancianos.

El curso típico de la infección es leve y probablemente incluye un período asintomático de varios días, seguido de un período de aproximadamente una semana en el que se presentan los síntomas respiratorios. En los casos de infección grave del tracto respiratorio inferior, el curso típico comprende un breve período asintomático tras la inoculación, seguido de uno o dos días de síntomas respiratorios superiores, que progresa hacia sibilancias y otros signos de afección del tracto inferior (103). Las manifestaciones más frecuentes son bronquiolitis (59%), croup (18%), exacerbaciones asmáticas (14%) y neumonía (8%)(9). En muchos pacientes, las sibilancias duran varios días(103).

En adultos la presentación más común incluye tos (100%), congestión nasal (85%), rinorrea (75%), disnea (69%) y sibilancias (62%) (9).

La reinfección en adultos suele cursar con síntomas leves, pero en ancianos puede producir síntomas graves, como neumonitis, o incluso la muerte (104). En algunos brotes se ha descrito hasta un 11% de mortalidad (111).

## Coronavirus

### Introducción

En la década de los 60, se identificaron los 2 primeros coronavirus humanos (HCoV): HCoV-229E y HCoV-OC43 (112–114), los cuales fueron ampliamente estudiados hasta los años 80. Infectando voluntarios sanos, los investigadores descubrieron que la infección por estos virus resultaba en un resfriado común (115,116) y desde entonces los coronavirus fueron considerados patógenos relativamente inocuos. Esta idea cambió radicalmente con la aparición en escena del SARS (Síndrome respiratorio agudo grave) en el invierno del año 2002 en China. El virus SARS causó una enfermedad respiratoria muy grave con alta morbimortalidad (117,118).

El brote de SARS volvió a renovar el interés por los coronavirus, lo cual resultó en la identificación de tres nuevos coronavirus humanos: el HCoV-NL63, un nuevo miembro del grupo I, descubierto en un niño con bronquiolitis en Holanda en 2003 (119), el HCoV-HKU1, nuevo miembro del grupo II, descrito en un adulto con enfermedad pulmonar crónica en Hong Kong en 2005 (120) y el coronavirus MERS, descubierto en 2012 en Arabia Saudí (121) que presenta una tasa de mortalidad cercana al 50% (122).

### Clasificación y morfología

La familia Coronaviridae contiene dos géneros, el género *Coronavirus* y el género *Torovirus* (13). Hasta el momento se conocen 6 serotipos que infectan a humanos; SARS, 229E, NL63, OC43, HKU1 y MERS (123).

Los coronavirus son virus ARN monocatenario de polaridad positiva. Poseen el mayor genoma viral de ARN conocido (27 a 33 kb) (120). Son virus envueltos, las glucoproteínas de la superficie de la envoltura tienen el aspecto de proyecciones en forma de bastón (de una longitud de 20 nm y una anchura comprendida entre 5 y 11 nm) (23) que aparecen en las

imágenes de microscopía electrónica en tinción negativa como un halo alrededor del virus que le dan el aspecto de corona del cual deriva su nombre. Los viriones miden entre 80 y 160 nm de diámetro (23).

El genoma se traduce para producir una poliproteína que se hidroliza y origina una polimerasa de ARN dependiente de ARN que produce entre cinco y siete moléculas individuales de ARNm que codifican cada una de las proteínas virales. Varias proteínas no estructurales (ARN polimerasa dependiente de ARN, ATPasa/helicasa, etc.) y cuatro o cinco proteínas estructurales: hemaglutinina-esterasa (no en todas las cepas), glucoproteína de superficie, proteína de la envuelta, glucoproteína de membrana y proteína de la nucleocápside (13).

En adelante se tratarán las características de los coronavirus respiratorios excluyendo los virus SARS y MERS.

### **Epidemiología y patogenia.**

Existen evidencias de infecciones respiratorias por coronavirus en todas las zonas del mundo donde se han estudiado. En los climas templados, las infecciones respiratorias por coronavirus son más frecuentes en invierno y primavera. La contribución de las infecciones por coronavirus al número total de enfermedades de las vías respiratorias superiores puede alcanzar el 35% durante las fases de máxima actividad viral. En conjunto, la proporción de resfriados en adultos por coronavirus puede estimarse en un 15% (13).

Los coronavirus se transmiten por contacto directo o por aerosoles. Se replican en células epiteliales ciliadas de la nasofaringe, produciendo probablemente tanto una degeneración directa de las células ciliadas como una liberación de quimiocinas e interleucinas, con un conjunto de síntomas de resfriado común similar al producido por la infección por rinovirus.

El período de incubación es, como promedio, de 2 días, y el punto álgido de los síntomas respiratorios, así como de la excreción de virus, se alcanza alrededor de los 3 o 4 días desde la inoculación (13).

La inmunidad se desarrolla rápidamente tras la infección pero la protección se va perdiendo con el tiempo. Las reinfecciones son comunes, tanto por pérdida de inmunidad como por infección con diferentes cepas (124).

### Clínica

Los síntomas más frecuentes son cefalea, malestar general, dolor de garganta y rinorrea. El cuadro clínico es similar al producido por rinovirus, aunque el período de incubación de los resfriados es más prolongado y su duración es algo menor. En ocasiones, se produce una infección asintomática y, de hecho, es una característica de los estudios serológicos sobre infección natural en niños y adultos 78,79.

La infección grave de las vías respiratorias inferiores también está causada por las cuatro cepas de HCoV no-SARS no-MERS. Parece probable que todas las cepas puedan causar neumonía y bronquiolitis en lactantes, otitis y reagudizaciones del asma en niños y adultos jóvenes, neumonía en adultos sanos, reagudizaciones del asma y de la bronquitis crónica en adultos, neumonía y bronquitis grave en ancianos y neumonía en pacientes inmunodeprimidos (13).

En el caso particular del virus NL63 el primer caso descrito de infección, como se ha comentado previamente, se describió en un niño hospitalizado con infección grave del tracto respiratorio inferior hospital. Otro estudio identificó el virus en un paciente anciano en Canadá, que murió 5 días tras el comienzo de la enfermedad, demostrando que la infección podía tener consecuencias fatales, aunque también ha sido descrito en varios casos en pacientes con síntomas leves como fiebre, tos, dolor de garganta o rinitis.

Hay pruebas que muestran que la infección en niños es diferente de otros coronavirus respiratorios, en un estudio prospectivo en niños menores de 3 años con enfermedades del tracto respiratorio inferior, se vio que el 45% de los niños infectados con HCoV-NL63 desarrollaban laringotraqueobronquitis, comparado con el 6% en el grupo control, el análisis multivariante mostró que el riesgo de laringotraqueobronquitis es casi 7 veces mayor en niños infectados por el virus NL63 (125–127). Esta entidad se asocia corrientemente con los virus parainfluenza, pero los datos indican que el coronavirus NL63 también es un agente etiológico a tener en cuenta (120).

# Herpesvirus

## Introducción

La familia *Herpesviridae* comprende una serie de virus ADN de gran importancia en la clínica, cuya característica biológica más importante es su capacidad de establecer latencia. Tras la infección primaria, que puede ser sintomática o asintomática, el virus permanece latente, en santuarios particulares, a partir de los que se reactiva con la consiguiente replicación vírica.

## Clasificación y morfología

Los herpesvirus son virus ADN con nucleocápside icosaédrica. Son virus envueltos, su tamaño varía desde los 120 hasta los 260 nm de diámetro. Contienen de 125.000 a 229.000 pares de bases en su ADN bicatenario. El genoma viral es lineal en el interior del virión, pero se circulariza en las células infectadas. Los virus herpes tienen una fase lítica de replicación que provoca la muerte celular y una fase latente de replicación en la que no se sintetiza ninguna proteína viral o sólo un pequeño conjunto de ellas (13).

Los virus herpes humanos se subdividen en tres subfamilias. Los herpesvirus alfa comprenden los virus del herpes simple (VHS) de tipo 1 y 2 y el virus varicela-zóster (VVZ) (128). Estos virus quedan latentes en las neuronas de los ganglios sensitivos y la infección de células en cultivo provoca la destrucción rápida de las células. Provocan infecciones mucocutáneas en personas sanas. Los herpesvirus beta son el citomegalovirus (CMV), el virus herpes humano 6 (VHH-6) y el virus herpes humano 7 (VHH-7) (128). Estos virus se replican lentamente en cultivos celulares y establecen latencia en las células mononucleares. Los herpesvirus gamma comprenden el virus de Epstein-Barr (VEB) y el virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi o virus herpes 8 (128). Estos virus quedan latentes en las células linfoides y causan infección lítica en las células epiteliales o en los fibroblastos. Los herpesvirus beta y gamma pueden causar linfoproliferación con mononucleosis.

## Epidemiología y patogenia

Casi todos los adultos están infectados por VHS-1, VVZ, VEB, VHH-6 o VHH-7. Los herpesvirus suelen propagarse por contacto directo, ya que los virus con envoltura no sobreviven mucho

tiempo en el medio ambiente. El VVZ es la excepción, pues se contagia por transmisión aérea (13).

Muchos herpesvirus, como el VHS, el VEB, el CMV, el VHH-6 y el VHH-7, se desprenden de la mucosa oral sin síntomas y es precisamente durante su diseminación asintomática, más que durante la enfermedad sintomática, cuando la mayor parte de los virus se transmiten de forma interpersonal.

Ciertos herpesvirus causan una enfermedad sintomática que se asocia a la replicación lítica del virus y cuya consecuencia es la aparición de lesiones cutáneas debidas a VHS o VVZ o lesiones viscerales por VHS, VVZ o CMV. Otras enfermedades, como el eritema multiforme asociado a VHS o la anemia hemolítica asociada a CMV o VEB, se deben a la respuesta inmunitaria frente al virus.

### **Clínica**

Varios virus herpes causan síndromes clínicos similares consistentes en lesiones cutáneas vesiculares, retinitis, hepatitis, encefalitis y mononucleosis. Se precisan pruebas diagnósticas específicas de cada virus para distinguir el que causa un síndrome concreto. Los herpesvirus causan enfermedades más graves en personas con deterioro de la inmunidad celular, pero no tanto en aquellas con alteraciones de la inmunidad humoral.

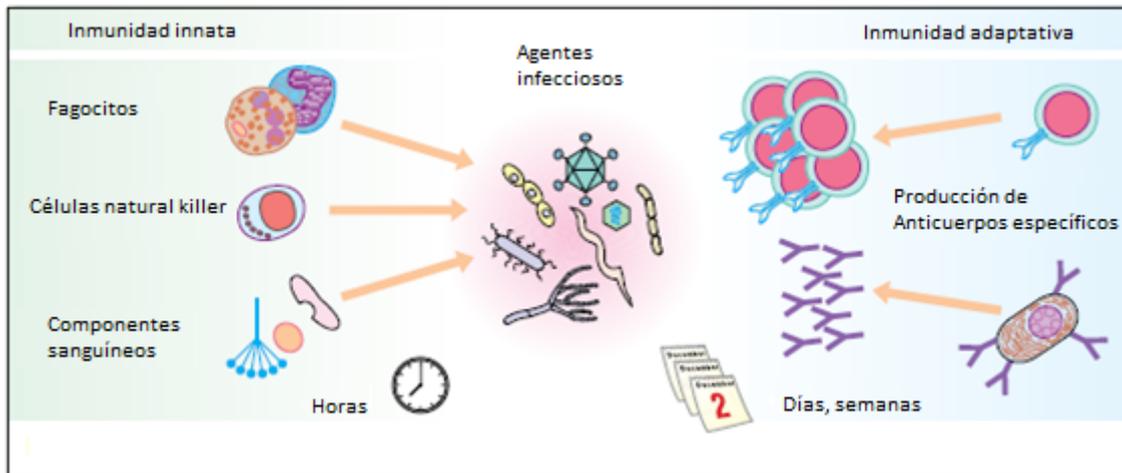
Prácticamente todos los virus herpes pueden causar neumonías, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos (129), aunque los más frecuentes en esta patología son el VVZ, VHS y el CMV (130).

## **Respuesta inmune del huésped**

El sistema inmune se encarga de proteger, vigilar y mantener la homeostasis y adaptación al medio del organismo.

Las barreras iniciales que evitan la entrada de los agentes infecciosos en el pulmón incluyen defensas mecánicas específicas como la glotis, las secreciones respiratorias, un aparato mucociliar que recubre la superficie de las grandes vías respiratorias, y el reflejo de la tos. Cuando estos mecanismos de defensa iniciales son superados y los microorganismos infectan

las células del tracto respiratorio se activa la respuesta inmune innata o inespecífica y a medida que la infección progresa, se produce el despliegue de la respuesta inmunitaria adaptativa o específica.



**Figura 6:** Respuesta inmune innata y adaptativa (131).

## Respuesta inmune innata

Los componentes de la inmunidad innata, también conocida como natural o inespecífica, están presentes desde el nacimiento, y carecen de especificidad y memoria (131). La inmunidad innata es la primera línea de defensa en la respuesta del huésped a la invasión viral, es una respuesta inmediata y rápida.

Los mecanismos innatos de defensa incluyen neutrófilos y macrófagos, los cuales, entre otras funciones, fagocitan y destruyen patógenos. Aunque su función es protectora, la inmunidad innata se asocia con daños tisulares en el cumplimiento de su función defensiva. Como se ha mencionado no posee memoria por lo que las respuestas futuras frente al mismo agente no son más eficientes que la respuesta inicial.

Las células que participan en la respuesta inmune innata incluyen monocitos, macrófagos, células dendríticas, leucocitos y células natural killer (NK), todas ellas poseen receptores para la detección de patógenos (131).

El reconocimiento de los patógenos es problemático debido a su heterogeneidad y a su elevada tasa de mutaciones. No obstante, el sistema inmune innato utiliza un número relativamente pequeño de moléculas para reconocer una amplia variedad de estructuras moleculares asociadas a los microorganismos. Estos receptores reconocen patrones moleculares compartidos por un amplio número de patógenos y han sido denominados receptores de reconocimiento de patrones o PRR e incluyen numerosos tipos de receptores: TLRs, NLRs, RLRs, etc. Los patrones reconocidos por estos PRR se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y son componentes estructurales básicos de los productos microbianos como ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos que los microorganismos no pueden seleccionar porque son imprescindibles para su supervivencia (132).

Tras el reconocimiento del microorganismo, el sistema inmune innato controla el inicio de la respuesta inflamatoria y el de la respuesta inmunitaria específica. Las señales endógenas inducidas por la interacción PAMP-PRR incluyen señales que activan la respuesta inflamatoria como el TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 IFN  $\alpha/\beta$  y quimiocinas (IL-8).

La activación de los macrófagos representa uno de los primeros eventos en la respuesta innata contra el patógeno. Los microorganismos, ingeridos por el macrófago, segregan toxinas que activan en esta célula la producción de citoquinas inflamatorias que contribuyen a la activación de las células fagocíticas. Así, el macrófago libera IL-12 y TNF- $\alpha$ , estas citoquinas, en sinergia, activan en las células NK la producción de IFN- $\gamma$  que estimulará la actividad bactericida del macrófago.

Ante una carga bacteriana baja o la exposición a microbios poco virulentos, los macrófagos residentes en el alveolo ingieren y eliminan el microorganismo. Por el contrario, si la carga bacteriana es elevada o si un patógeno virulento alcanza la superficie del alveolo se requiere el reclutamiento de los neutrófilos para contener de manera efectiva el microorganismo en el pulmón, y eventualmente eliminarlo.

Con la llegada del microorganismo al tracto respiratorio también son reclutadas las células dendríticas, células del sistema inmunitario innato que actúan como presentadoras de antígeno. Las células dendríticas capturan los antígenos en el epitelio respiratorio, migran hacia los ganglios linfáticos regionales y los presentan a los linfocitos T.

Un tercer tipo de células involucradas en la respuesta innata son las NK, estas células reconocen y destruyen células infectadas que no expresan HLA. Interaccionan con células infectadas por virus, linfocitos T y células dendríticas (133).

Los linfocitos B1, que difieren fenotípica y funcionalmente de los linfocitos B2 o convencionales, son secretores de IgM natural (134,135). Un alto porcentaje de la IgM pentamérica presente en suero es IgM natural (134). Esta IgM presenta una estructura flexible, siendo una inmunoglobulina polireactiva, es decir, capaz de unirse a múltiples antígenos (135).

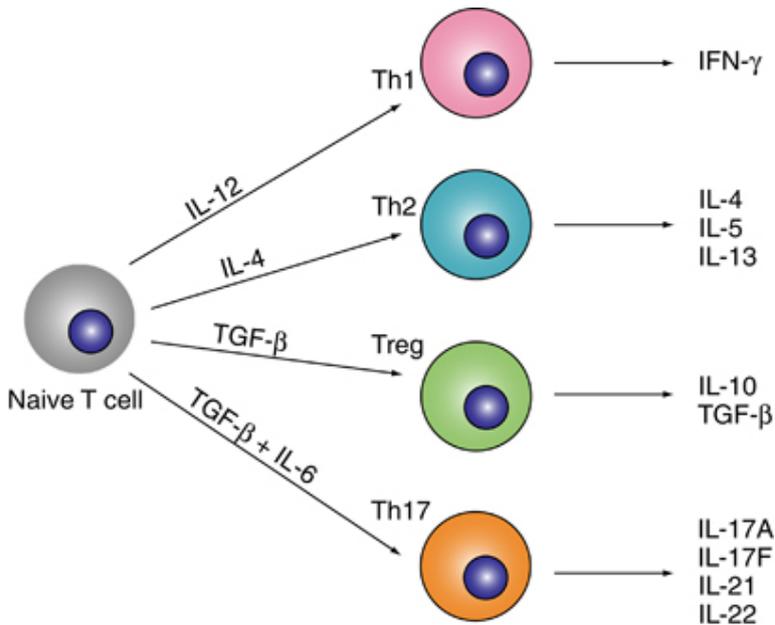
Las inmunoglobulinas naturales cumplen un papel fisiológico, estando implicadas en la eliminación de células envejecidas y apoptóticas, en mecanismos de inmunomodulación y tienen también un papel protector contra infecciones (136,137).

La respuesta innata no específica de antígeno con frecuencia es efectiva en la eliminación del agente infeccioso o en limitar su multiplicación hasta que la respuesta inmunitaria específica pueda ser generada y sea completamente funcional, entre 7 y 10 días después de la entrada del patógeno. A partir de ese momento serán los linfocitos T los que orquestarán la respuesta inmunitaria específica.

## **Respuesta inmune adaptativa**

La respuesta adaptativa es más lenta que la innata, pero en contrapartida, posee dos funciones importantes de las cuales carece la respuesta innata: reconoce antígenos específicos y posee memoria inmunológica, la cual permite que las sucesivas respuestas frente al antígeno sean más rápidas y eficientes que la respuesta inicial. Se divide en dos ramas: la inmunidad humoral, que conlleva la producción de anticuerpos por linfocitos B y células plasmáticas, y la inmunidad celular, en la que participan los linfocitos T (131).

Las células dendríticas reconocen a los virus, migran a los ganglios linfáticos y presentan los antígenos virales, restringidos por el MHC II, a los linfocitos T. Los linfocitos T CD4, en función del ambiente de citoquinas en el que se encuentre, se diferenciarán a células T colaboradoras (Th o T *helper*) de tipo 1, si el ambiente es rico en IFN- $\gamma$  ; en Th2, si el ambiente es rico en IL-4 (138); en Th17, si el ambiente es rico en IL-6 y TGF- $\beta$  (139) o en Treg si el ambiente es rico en TGF- $\beta$  (140).



**Figura 7:** Diferenciación de las células T (141).

Las células Th1 y Th17 promueven principalmente la respuesta celular contra patógenos intracelulares. En el caso de las infecciones virales, la respuesta celular en su modalidad citotóxica es la más efectiva. Las células Th1 secretan IL-2 e IFN- $\gamma$  que activan la proliferación de células T CD8+ citotóxicas principalmente, estas células CD8+ activadas migran hacia el foco de infección, reconocen a las células infectadas que muestran los péptidos virales asociados a moléculas del MHC I en su superficie celular y las eliminan mediante la liberación de perforina y granzima B (138).

Si el ambiente es rico en IL-4 las células T CD4 se diferenciarán a células Th2 que son capaces de activar las células B (138). La célula B evolucionará hacia una célula plasmática productora de anticuerpos. Lo normal es que en la respuesta primaria sólo se fabrique IgM de baja afinidad, la cual se detecta tras una fase de latencia de 5 días. Algunas células B se convertirán en células B memoria que fabricarán anticuerpos de mayor afinidad, IgG, IgA, IgE de manera casi inmediata durante la respuesta inmunitaria secundaria, cuando se enfrentan al mismo antígeno en situaciones sucesivas.

Recientemente se han descrito otra subpoblación de células T, CD4+CD25+ conocidas como células T reguladoras (Treg) que modulan la respuesta inmune como mecanismo de prevención del daño tisular (142). Estas células juegan un papel muy importante ya que una respuesta adaptativa apropiada se traduce en la eliminación del virus y la resolución de la enfermedad, pero un fallo en la regulación de esta respuesta se traduce en inmunopatología y

daño pulmonar. Las células Treg son capaces de inhibir y modular los fenómenos inmunopatogénicos controlando la proliferación de células CD4+ y CD8+ en vivo (143). Se cree que algunos virus inducen la activación de este tipo de células como una estrategia de inmunoevasión (144).

## **Respuesta inmune específica frente a virus**

Tras reconocer los PAMPs, los TLR desencadenan la señalización intracelular necesaria para producir citoquinas inflamatorias, quimiocinas así como IFN- $\beta$ , el cual inicia la producción de IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por células epiteliales y células del sistema inmune innato (145,146). La acción conjunta de los interferones induce la expresión de genes con función antiviral en las células epiteliales, desencadenando la apoptosis de las células infectadas y activando las células NK, limitando así la replicación viral y la infección de más células (147,148).

Entre todos los TLR, los tipos 3, 4, 7, 8 y 9 son los más frecuentemente implicados en la respuesta innata frente a virus (132,145).

La mayoría de los virus respiratorios (incluyendo gripe, VRS, rinovirus, parainfluenza, metapneumovirus, coronavirus) son virus ARN. La hebra doble de ARN que se produce durante la replicación es reconocida por receptores TLR-3 (132,147). El TLR-4 reconoce algunas proteínas de envuelta virales, por ejemplo la proteína F del VRS (132). Los receptores TLR-7 y TLR-8 reconocen hebras simples de ARN (132). El TLR-9 reconoce secuencias de ADN que contengan motivos CpG hipometilados y es importante en el reconocimiento de virus ADN como los virus del herpes simple 1 y 2 (132).

Además del interferón otros mecanismos intervienen en la defensa frente a virus respiratorios como la IgA. El papel de la IgA en el tracto respiratorio se pone claramente de manifiesto en individuos con alteraciones inmunológicas como la deficiencia selectiva de IgA, los cuales sufren infecciones respiratorias recurrentes (149).

Un tercer mecanismo de defensa vírica en el las vías respiratorias es la producción de citoquinas proinflamatorias. El reconocimiento de los virus por parte de las células epiteliales y las células inmunes también desencadena la producción de citoquinas, incluyendo IL-1 $\beta$ , TNF, IL-8, G-CSG y GM-CSF (147).

## Citoquinas

Las células del sistema inmune producen sustancias que les permiten comunicarse entre ellas para orquestar una respuesta conjunta. Dentro de estas sustancias se encuentran las citoquinas, un grupo de glicoproteínas de bajo peso molecular que actúan mediando interacciones complejas entre células linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas. Sus funciones son muy variadas: diferenciación y maduración de células del sistema inmunitario, comunicación entre las mismas y en algunos casos, ejercen funciones efectoras directas.

### Propiedades generales de las citoquinas

- Tienen pesos moleculares bajos (menos de 30 kDa), semividas cortas (del orden de segundos o minutos), y son efectivas a concentraciones muy bajas (138).
- Las citoquinas se producen durante las fases efectoras de la inmunidad natural y específica y sirven para regular las respuestas inmunitarias.
- La producción y secreción de citoquinas es un hecho breve y autolimitado. En muchos casos ello se debe a que los correspondientes ARNm tienen una corta vida media.
- Muchas citoquinas están sintetizadas por múltiples tipos celulares. Dentro del sistema inmune natural los macrófagos son los principales responsables de su secreción, mientras que en el sistema específico este papel corresponde a las células T.
- Las citoquinas son pleiotrópicas, es decir, que la misma citoquina es capaz de actuar en múltiples tipos celulares.
- Las actividades funcionales de las citoquinas son redundantes, es decir, que distintas citoquinas pueden producir el mismo efecto.
- Algunas citoquinas inducen la síntesis de otras citoquinas, lo que conlleva a la producción de cascadas en la que la segunda o tercera citoquina pueden mediar el pretendido efecto de la primera.
- Las citoquinas pueden influir sobre el efecto de otras citoquinas: efecto antagonista (p. ej. el IFN- $\gamma$  bloquea el cambio de clase promovido por IL-4) o sinérgico (p. ej. la

acción conjunta de IL-4 e IL-5 induce en células B el cambio de clase para que produzcan IgE).

- Inician su acción tras fijarse a receptores específicos de la superficie celular: acción autocrina (en la propia célula que las produce) o paracrina (en células vecinas). Los receptores para las citoquinas tienen una afinidad elevada ( $K_a=10^{-10}$ - $10^{-12}$ ), y en consecuencia hacen falta cantidades muy pequeñas de citoquinas para saturar los receptores.
- Las citoquinas “controlan” el sistema inmune: regulando (activando o inhibiendo) la activación, proliferación y diferenciación de varios tipos de células o regulando la secreción de anticuerpos y de otras citoquinas.

Las citoquinas pueden clasificarse funcionalmente en cuatro grupos:

1. Mediadoras y reguladoras de la inmunidad innata: Estas citoquinas son producidas por macrófagos en respuesta a agentes infecciosos, van a estimular o inhibir las reacciones inflamatorias. Ejemplos: IL-1  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ .
2. Quimiocinas: Las quimiocinas son un tipo de citoquinas de pequeño tamaño (8 a 15 KDa), producidas por varios tipos celulares. Su misión es atraer quimiotácticamente a leucocitos a las zonas de inflamación. Se conocen más de 50.
3. Mediadoras y reguladoras de la inmunidad específica: Este grupo de citoquinas son producidas por los linfocitos T tras el reconocimiento antigénico. Potencian, enfocan y especializan las reacciones inmunitarias. Incluyen las citoquinas IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, TGF- $\beta$ .
4. Estimuladoras de la proliferación y diferenciación de leucocitos maduros: producidas por linfocitos activados y otras células. Son potentes activadores del crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas. Este grupo incluye entre otras a la IL-3, IL-7, G-CSF, GM-CSF.

Una vez la citoquina se une a su receptor específico provoca la activación de diversas proteínas de la familia de JAK y STAT, que posteriormente emigran al núcleo celular y activan la transcripción de ciertos genes. Existen mecanismos de inhibición de respuestas mediadas por citoquinas como la desactivación rápida de la vía JAK/STAT, o la inhibición retroactiva de la fosforilación de STATs y los inhibidores SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling).

También existen dos tipos de antagonistas que regulan la actividad de las citoquinas: los bloqueadores del receptor de citoquinas y los inhibidores de la acción de las citoquinas, que suelen ser versiones solubles de los respectivos receptores.

Algunos virus han evolucionado para producir proteínas que se unen e inactivan a las citoquinas. Por ejemplo, los poxvirus codifican una proteína soluble que se une al TNF- $\alpha$ , y otra que se liga a la IL-1 (150).

Dado el alto grado de pleiotropismo de las citoquinas es difícil establecer una clasificación funcional de estas, sin embargo en la Tabla 3 se describen las citoquinas estudiadas en este trabajo.

Mediador	Tipo	Función
CXCL8 (IL-8)	Quimiocinas CXC	Atraer células de respuesta inmune al foco de la infección.
CCL2 (MCP-1)	Quimiocinas CC	
CCL4 (MIP-1 $\beta$ )		
G-CSF	Factores de crecimiento	Favorecer la migración a través de los vasos sanguíneos, movilizar neutrófilos, monocitos, promover fibrogénesis y vascularización
GM-CSF		
IL-1 $\beta$	Citoquinas Th1	Promover respuesta inmune celular
IFN- $\gamma$		
TNF- $\alpha$		
IL-2		
IL-12p70		
IL-4	Citoquinas Th2	Promover respuesta inmune humoral
IL-5		
IL-13		
IL-17	Citoquinas Th17	Funciones en autoinmunidad, asma, defensa antiviral y antibacteriana
IL-6	Citoquina pro-Th17 /proinflamatoria	Defensa antiviral. Procesos inflamatorios y autoinmunes
IL-10	Mediador antiinflamatorio	Modular la inflamación
IL-7	Citoquina con función propia	Movilizar linfocitos T

**Tabla 3:** Mediadores inmunológicos y sus funciones.

## Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas sintetizadas por linfocitos B (IgM, IgD) y células plasmáticas derivadas de ellos (IgG, IgA, IgE).

Están presentes en la sangre (plasma) y otros fluidos biológicos (saliva, lágrimas, secreción mucosa intestinal, líquido intersticial, etc.). En el plasma se detectan dentro de la fracción de las  $\gamma$ -globulinas. Son capaces de reconocer a otras moléculas – antígenos – de manera muy específica, y formar complejos estables con ellos – inmunocomplejos –. Su aparición en plasma forma parte de la respuesta inmunológica adaptativa, en lo que se conoce como respuesta humoral específica.

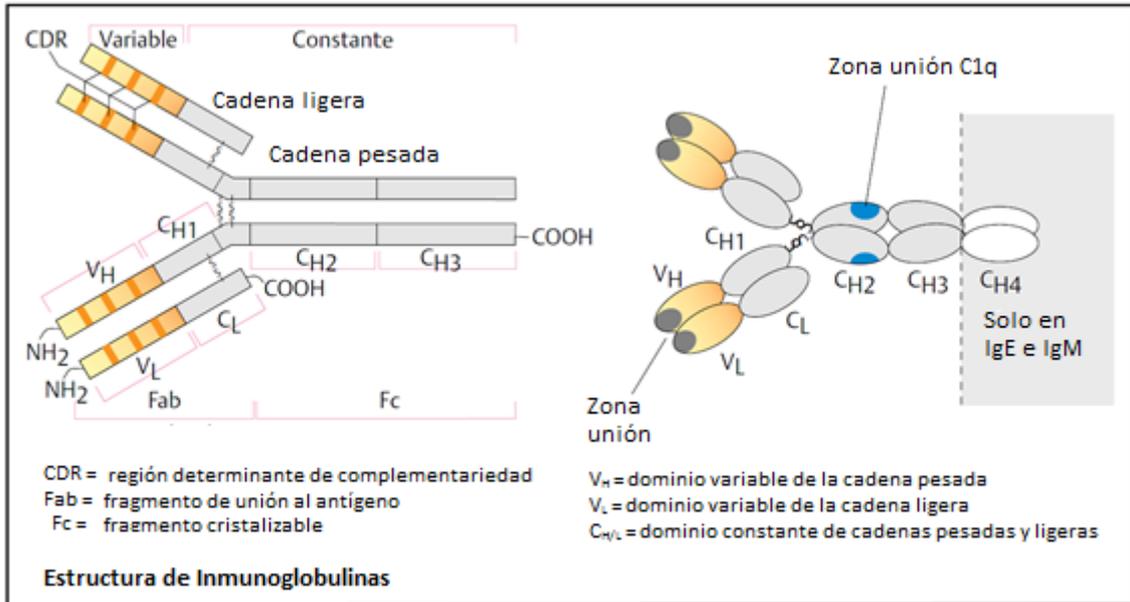
Están compuestas por dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H) idénticas entre sí. Cada una de las cuatro cadenas polipeptídicas está compuesta por varios dominios de unos 110 aminoácidos unidos por puentes disulfuro (131).

Los mamíferos poseen 2 clases de cadenas ligeras: kappa y lambda (151). En el caso de las cadenas pesadas, los mamíferos poseen 5 clases: mu, delta, gamma, alfa y épsilon. Cada uno de los tipos se corresponden con las 5 clases de inmunoglobulinas, respectivamente: IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE. Existen cuatro subtipos de cadenas gamma:  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$ ; y dos subtipos de cadenas alfa:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , que dan lugar a cuatro subclases de IgG y dos subclases de IgA (13).

Las cadenas ligeras se dividen en dos dominios. En el extremo carboxiterminal está el dominio constante ( $C_L$ ), y en el aminoterminal el dominio variable ( $V_L$ ), que presenta una amplia variabilidad. Las cadenas pesadas poseen igualmente un dominio variable ( $V_H$ ) y tres dominios constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ) (cuatro en el caso de IgM e IgE) (131).

Cada inmunoglobulina presenta dos sitios de unión al antígeno, de la misma especificidad localizados en la región variable. El centro de unión con el antígeno está formado por tres segmentos peptídicos no colineales pertenecientes al dominio variable de la cadena pesada y tres de la cadena ligera que se yuxtaponen para formar una superficie o cavidad (parátopo) donde se aloja la región del antígeno reconocida por el anticuerpo (epítopo). Cada uno de estos segmentos tiene una longitud de 6 a 8 aminoácidos. El parátopo conforma una imagen especular del epítopo, y los seis segmentos que lo forman reciben el nombre de regiones

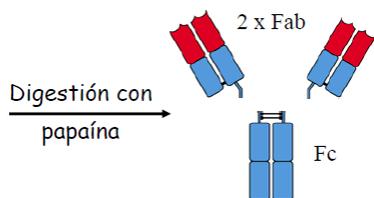
determinantes de la complementariedad (CDR). En las CDRs de ambas cadenas se concentra la mayor variedad secuencial de los dominios variables de la inmunoglobulina, por lo que también se denominan regiones hipervariables (131).



**Figura 8:** Estructura de las inmunoglobulinas(131).

La región variable, la que interactúa con el antígeno, esta codificada por segmentos génicos diferentes de aquellos que codifican las regiones constantes. Las regiones constantes determinan las clase de la inmunoglobulina, como los genes de la región variable son distintos, inmunoglobulinas de diferentes clases pueden poseer la misma región variable (151).

El tratamiento con papaína divide la inmunoglobulina en 2 fragmentos de unión al antígeno o Fab (*antigen binding fragment*) y un fragmento cristalizale o Fc (*crystalline fragment*). El fragmento Fc es la parte que interacciona con los receptores celulares y contiene la zona de unión para el fragmento C1q del complemento.



**Figura 9:** Fragmentos resultantes tras tratamiento de inmunoglobulinas con papaína.

Los anticuerpos no tienen una función microbicida directa, pero pueden marcar al patógeno y convertirse en un vínculo entre éste y el mecanismo destructor. Las vías mediante las que actúan las inmunoglobulinas son el bloqueo o neutralización, la activación del complemento, la opsonización y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (13).

## **IgG**

La IgG es la inmunoglobulina más abundante, constituyendo el 75% de las inmunoglobulinas presentes en el suero. Su concentración varía entre 870-2180 mg/dL. Es una inmunoglobulina monomérica con un peso molecular de 150 kDa.

Dado su tamaño la IgG puede moverse al líquido extracelular en el compartimento tisular. Menos del 50% del contenido de IgG está en la circulación en un momento dado. La IgG es el único isotipo que atraviesa la placenta humana hasta el feto. A partir de las 20 o 21 semanas de gestación, las IgG maternas cruzan la placenta por medio de un receptor especial de transporte placentario, el FcRn, y se introducen en la circulación fetal (13). Su vida media en suero es de unos 23 días (152).

En humanos la IgG se divide en 4 subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 las cuales varían en su composición de aminoácidos y en el grado de glucosilación. Se presentan en diferentes concentraciones en el suero, la mayoritaria es la IgG1 que supone del 60 al 70% del total, seguida de la IgG2: 20-30%, IgG3: 5-8% y por último la IgG4: 1-4% (152).

Las funciones biológicas de la IgG incluyen la opsonización y la activación del complemento. Las inmunoglobulinas pueden, al igual que las proteínas del complemento, actuar como opsoninas (152). Las distintas subclases varían en cuanto a su habilidad para unirse a la proteína C1q y activar la vía clásica del complemento. IgG1 e IgG3 fijan el complemento de manera más efectiva mientras que IgG2 lo fija débilmente e IgG4 no lo fija (153).

## **IgM**

La IgM es la inmunoglobulina de mayor peso molecular, 900 kDa., lo que la mantiene en gran medida restringida al compartimento intravascular. La concentración de IgM en suero es de 60-220 mg/dL y su vida media en sangre son 5 días.

En la superficie de los linfocitos B se encuentra en forma monomérica. Esta IgM de membrana permite al linfocito B detectar el antígeno correspondiente cuando se encuentra con él y desencadenar su posterior activación y proliferación.

En el suero se encuentra en forma pentamérica, las 5 unidades monoméricas se mantienen unidas mediante de puentes disulfuro y un polipéptido llamado cadena J. La inhibición estérica típicamente permite que sólo 5 de los 10 sitios de unión a antígeno de la IgM se unan simultáneamente al antígeno. Aun así, esta capacidad de unión polivalente permite que la IgM aporte una defensa eficaz a pesar de su característica baja afinidad por el antígeno. Los anticuerpos IgM defienden al huésped mediante el bloqueo de la unión del patógeno a las células y la agregación de agentes infecciosos, lo que facilita su eliminación. De las 5 clases de inmunoglobulinas la IgM es la más potente activadora del complemento (154).

La IgM muestra actividad inmunomoduladora en enfermedades autoinmunes (155,156).

La mayor parte de la IgM se produce por linfocitos B1 o B2 después de la exposición al antígeno, pero una parte se produce de manera T independiente por linfocitos B1 sin necesidad de estímulo antigénico previo, es lo que se conoce como IgM natural. Ambas formas de IgM son muy similares aunque la natural presenta una estructura más flexible en las zonas de unión al antígeno lo que facilita una interacción con mayor variedad de antígenos. Los anticuerpos naturales se encuentran en títulos bajos en suero y junto a otros componentes de la respuesta innata, forman parte de la primera línea de defensa frente a la infección (154,157).

La IgM natural ha demostrado un papel protector en la defensa frente a numerosos patógenos, incluidos virus (157).

### **IgA**

Su concentración en suero es de 117-420 mg/dL, pero es la inmunoglobulina predominante en secreciones. Su semivida en suero es de unos 6 días. La IgA tiene una semivida menor que la IgG, es secretada abundantemente en espacios corporales y superficies mucosas (intestino, faringe, etc.). Como resultado es el isotipo con el ratio más alto de producción, aunque su concentración sérica es menor que la de IgG. Un adulto de 70 kg. produce aproximadamente 4.5 g de IgA al día, 2.4 de IgG, y 0.6 de IgM (151).

## **IgD**

Junto con la IgM es la inmunoglobulina predominante en la superficie de los linfocitos B maduros, jugando un importante papel en la activación de estos. La IgD se encuentra en suero en bajas concentraciones, <10 mg/dL y no tiene papel efector en la defensa del huésped. Su peso molecular es de 170 kDa. y su semivida en suero son 3 días (151).

## **IgE**

Es la inmunoglobulina con menor concentración en el suero humano. En situaciones normales el valor superior de normalidad es de 250 µg/L, en enfermedades como la dermatitis atópica, su concentración puede aumentar hasta 100 veces. Su peso molecular es de 190 kDa. y su semivida en suero son 3 días, pero una vez unida a los mastocitos, la IgE persiste durante mucho tiempo, quizá durante toda la vida del mastocito (13). Juega un papel importante en la respuesta inmune frente a parásitos y en reacciones alérgicas (151).

## **Cinética de la producción de anticuerpos**

En el primer encuentro con un antígeno, el sistema inmunitario genera una respuesta primaria de anticuerpos que es detectable en 5-7 días. La respuesta de anticuerpos primaria consta de anticuerpos IgM, con una afinidad relativamente baja por el antígeno.

En los siguientes días, algunos linfocitos B productores de anticuerpos comienzan a sintetizar anticuerpos que tienen la misma especificidad antigénica, pero de un isotipo IgG, IgA o IgE. Para cambiar entre los isotipos, los linfocitos B deben recibir señales de los linfocitos T colaboradores activados que son típicamente específicos para el mismo antígeno que los linfocitos B. Bajo la influencia de los linfocitos T, algunos linfocitos B se convierten también en células memoria. En la exposición posterior al mismo antígeno, los linfocitos B de memoria se dividen rápidamente y comienzan a producir grandes cantidades de anticuerpos en tan sólo 1 o 2 días. La respuesta secundaria humoral se caracteriza por tanto por la producción de cantidades mayores de anticuerpos y forma más rápida que en la respuesta primaria, de hecho existen

Las respuestas secundarias son en gran medida de isotipo IgG, IgA o IgE, sólo se producirá IgM si clones nuevos de linfocitos B que emergen de la médula ósea se encuentran con el antígeno.

Por tanto, la presencia de anticuerpos IgM se puede considerar una indicación de una infección activa.

La afinidad de los anticuerpos en la respuesta secundaria es mucho mayor que en la respuesta primaria, de hecho existen test de laboratorio que miden la avidéz de los anticuerpos implicados en la respuesta y pueden situar cronológicamente la infección. Cuando se conoce con precisión el momento de exposición al antígeno, como en las vacunaciones, resulta fácil distinguir entre la respuesta primaria y secundaria. Sin embargo, en el caso de una infección respiratoria sin filiar en la que el período de incubación puede ser extremadamente variable y el antígeno persiste a lo largo de un intervalo prolongado, se hace más difícil la distinción entre respuesta primaria o secundaria.

En este trabajo se ha pretendido caracterizar el papel del sistema inmune en la fisiopatología de la enfermedad producida por el virus A/H1N1pdm09 y otros virus causantes de neumonía grave durante la temporada postpandémica, así como conocer mejor las características clínicas de los pacientes. Se ha evaluado el valor diagnóstico y pronóstico de ambos tipos de factores, clínicos e inmunológicos, lo cual podría contribuir a individualizar el tratamiento en cada paciente en un futuro próximo

*Hipótesis y objetivos*

---



## Hipótesis

---

La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) de etiología vírica es una patología infravalorada pese a producir casos mortales. La gravedad de esta patología depende no solo del agente etiológico sino también de factores propios del hospedador como la situación inmunológica o la existencia de patologías concomitantes. La situación inmunológica del huésped puede condicionar el tipo de virus causante de la NAC.

## Objetivos

---

1. Describir las características clínicas y demográficas de los pacientes con NAC gripal grave en la temporada postpandémica 2010-2011.
2. Analizar los factores relacionados con gravedad y mortalidad de estos pacientes, prestando especial atención a sus niveles de inmunoglobulinas y citoquinas.
3. Describir las características clínicas y demográficas de los pacientes con NAC vírica no gripal grave en la temporada postpandémica 2010-2011.
4. Analizar factores y caracteres diferenciadores entre estos pacientes y aquellos que sufren NAC gripal grave, prestando especial atención a niveles de inmunoglobulinas y citoquinas.



## *Material y métodos*

---



## Diseño del estudio

---

Se diseñó un estudio prospectivo, observacional y multicéntrico en el que se reclutaron pacientes con neumonía vírica ingresados en las UCIs de los hospitales participantes en el estudio entre noviembre de 2010 y febrero de 2011. Se recogieron datos demográficos, clínicos, analíticos y muestras biológicas de estos pacientes para estudiar la relación entre la infección vírica y los perfiles de diversos parámetros inmunológicos, así como para describir las características clínicas y demográficas de los pacientes.

Se estudió el valor de distintos parámetros inmunológicos para predecir la mortalidad por neumonía gripal grave mediante análisis de regresión y curvas de supervivencia.

Por último, se estudiaron las diferencias entre los pacientes que presentaban infección por el virus de la gripe y aquellos con infección por otros virus respiratorios, tanto a nivel de características clínicas y demográficas como de perfiles de mediadores inmunológicos

## Pacientes

### **Criterios de inclusión y exclusión:**

*Criterios de inclusión:* Pacientes mayores de edad ingresados en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs) con neumonía confirmada radiológicamente y diagnóstico microbiológico de virus de la gripe A/H1N1pdm09 u otros virus respiratorios no gripales desde noviembre de 2010 hasta febrero de 2011.

*Criterios de exclusión:* Pacientes en los que no se confirmó la presencia de virus mediante diagnóstico molecular. Pacientes en cuyo suero no fue posible la medición de niveles de inmunoglobulinas o citoquinas. Pacientes en los que no se recogió muestra de sangre en las primeras 24 horas. Pacientes en los que no se recibió ficha de datos demográficos completamente rellena. Pacientes que no firmaron el consentimiento informado. Pacientes menores de edad.

### **Población control**

Se incluyeron 15 controles sanos reclutados entre los trabajadores del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, de edad y sexo similares a los pacientes. Ninguno de los voluntarios tenían antecedentes clínicos relevantes ni presentaron signos de infección o condición inflamatoria alguna en el momento de la recogida de la muestra.

### **Comité de ética. Consentimiento informado**

La aprobación del protocolo del estudio, tanto en los aspectos científicos como éticos, se obtuvo del Comité Científico de Investigación Clínica de cada uno de los hospitales participantes. Además, todos los pacientes firmaron una hoja de consentimiento informado, a través de la cual aceptaban su participación en el estudio (Anexo 1).

### **Muestras**

Todas las muestras de los pacientes se recogieron durante las primeras 24 horas de ingreso en la UCI.

Se recogió una muestra de sangre en tubo de EDTA (Ácido etilendiamino tetraacético) de todos los pacientes para medición de niveles de citoquinas e inmunoglobulinas. Se recogió también un frotis nasofaríngeo. Ambas muestras se enviaron a la Unidad de Investigación en Infección e Inmunidad del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, la cual posteriormente remitió los frotis al Servicio de Microbiología del HCUV dónde se realizó el diagnóstico de virus respiratorios,

Tanto el suero como los frotis nasofaríngeos se conservaron congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis en la Unidad de Investigación en Infección e Inmunidad del Hospital Clínico Universitario de Valladolid o en el Servicio de Microbiología del HCUV.

Para una correcta recolección y conservación de estas muestras se instruyó a todos los hospitales participantes en un protocolo de recogida, codificación, etiquetado y almacenamiento común.

Además de estas muestras, que fueron enviadas a la unidad de investigación en infección e inmunidad del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, se recogieron otra serie de muestras que fueron analizadas en cada hospital participante y que no requirieron por tanto ser congeladas ni enviadas a Valladolid. Esas muestras fueron muestras de sangre para la realización de hemograma, pruebas bioquímicas básicas y gasometría. Las muestras fueron recogidas y analizadas según el protocolo de trabajo habitual de cada hospital.

Por último se recogieron diversas muestras (orina, hemocultivos, muestras respiratorias) para realizar análisis microbiológicos de bacterias y hongos que también se llevaron a cabo en cada hospital participante según sus protocolos de rutina de diagnóstico microbiológico de neumonías.

Los resultados derivados del análisis de estas muestras se recogieron en el anexo 2 que posteriormente fue enviado a unidad de investigación en infección e inmunidad del Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

Las muestras de sangre de los controles sanos se recogieron en un tubo de EDTA en el Departamento de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV). Posteriormente se analizaron de la misma manera que las muestras recogidas de los pacientes.

### **Recogida de datos clínicos y otros parámetros de laboratorio**

Se rellenó una ficha de recogida de datos clínicos para todos los pacientes que se facilitó a los integrantes del proyecto de cada uno de los hospitales participantes (Anexo 2). En esta ficha se recogieron datos demográficos (como edad o sexo), datos referentes a la hospitalización (ej.: fecha de ingreso), comorbilidades, etc., así como los ya mencionados resultados microbiológicos y de laboratorio.

Para permitir el análisis estadístico las comorbilidades registradas se agruparon en varias categorías (ej.: patología digestiva, patología cardiovascular, etc.)

La obesidad se definió como índice de masa corporal (IMC)  $\geq 30$  (158).

## Diagnóstico virológico

Además de la información microbiológica recogida en el anexo 2, en todos los pacientes se confirmó el diagnóstico virológico de virus respiratorios en el Servicio de Microbiología del HCUV, mediante el panel de diagnóstico de virus respiratorios xTAG Respiratory Viral Panel Fast (RVP FAST) basado en la tecnología Luminex. Los virus identificados como virus de la gripe A no subtipables en este panel, se analizaron por RT-PCR en tiempo real con el kit “RealTime ready Influenza A/H1N1 Detection Set” para confirmar que se trataba del nuevo virus pandémico.

La amplificación del genoma viral se llevó a cabo a partir de ácidos nucleicos extraídos de las muestras respiratorias enviadas por cada hospital participante.

El procedimiento de extracción del ARN viral es un paso crítico ya que de la cantidad y calidad del ARN obtenido en este paso dependerá la eficacia de la amplificación. Por ello se utilizó un extractor automático, que ofrece mayor rendimiento que la extracción manual, en concreto el extractor EasyMag (Biomerieux) (**Figura 10**), el cual mediante la utilización de partículas de sílice magnética permite la extracción tanto de ADN como de ARN de elevada pureza y puede ser utilizado en una amplia variedad de muestras (159). El protocolo de extracción utilizado fue el recomendado por el fabricante.



**Figura 10:** Plataforma de extracción de ácidos nucleicos.

---

**Panel de detección de virus respiratorios por PCR y fluorocitometría.**

El panel de detección de virus respiratorios RVP FAST incorpora en la plataforma Luminex la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (PCR-TI) multiplex junto con el sistema de clasificación por etiquetas (tags) universal de propiedad exclusiva de Luminex. El análisis incluye también controles internos de extracción y de procedimiento.

En cada muestra se amplifican 10 µl del extracto viral (ARN o ADN) en una única PCR-TI multiplex. Cada virus o control interno de la muestra da como resultado amplicones de PCR (que oscilan entre 58 y 206 pares de bases, sin incluir la etiqueta de 24 segmentos)

A continuación se añade una parte alícuota del producto de la PCR-TI a una reacción de hibridación/detección que contiene la matriz universal y el conjugado de estreptavidina/R-ficoeritrina. Cada población de microesferas de Luminex detecta una diana viral o control de análisis específico mediante una hibridación anti-tag/tag específica. Después de la incubación de los productos de PCR-TI con la mezcla de microesferas, el clitómetro de lectura ordena y lee las reacciones de hibridación/detección. Se genera una señal (de intensidad de fluorescencia media) para cada población de microesferas. Estos valores de fluorescencia se analizan para determinar la presencia o ausencia de objetivos virales y controles en cada muestra. Así en una única reacción multiplex se identifican todos los virus incluidos en el panel. El xTAG Data Analysis Software para RVP FAST (TDAS RVP FAST) analiza los datos para proporcionar un informe que resuma los virus presentes.

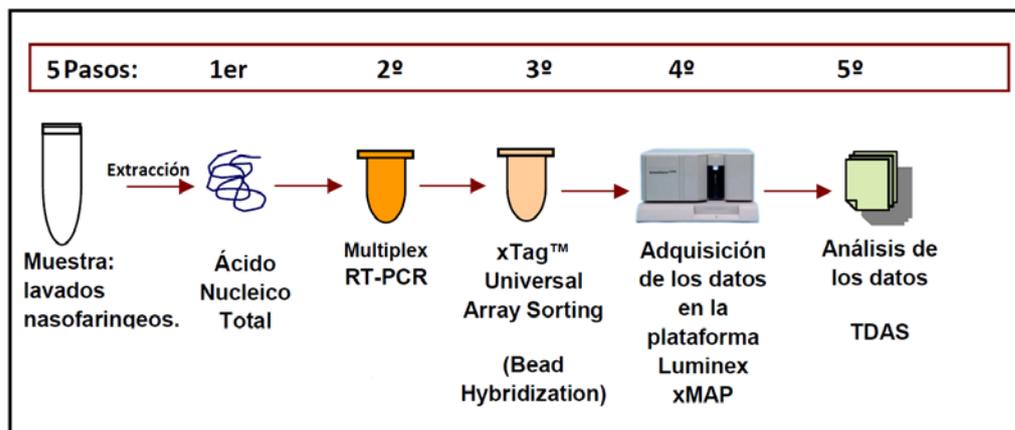
Los tipos y subtipos de virus detectados por este ensayo se describen en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** El subtipo H1 detectado corresponde al subtipo H1N1 estacional, es decir, el subtipo circulante previo al pandémico. El subtipo pandémico no está incluido en esta técnica, siendo identificado en este caso únicamente como gripe A sin subtipo.

Virus	Tipo/Subtipo
Gripe A	Genérico
Gripe A	H1
Gripe A	H3
Gripe B	Genérico
VRS	A
VRS	B
Coronavirus	229E
Coronavirus	OC43
Coronavirus	NL63
Coronavirus	HKU1
Parainfluenza	1
Parainfluenza	2
Parainfluenza	3
Parainfluenza	4
<b>Metapneumovirus humano</b>	
<b>Entero/Rhinovirus</b>	
<b>Adenovirus</b>	
<b>Bocavirus</b>	

**Tabla 4:** Virus respiratorios detectados por el método Luminex.

- **Protocolo de trabajo**

El ensayo Luminex consta de 5 pasos (**Figura 11**):



**Figura 11:** Esquema de los pasos del panel de detección de virus respiratorios

1º paso: Extracción de los ácidos nucleicos: Antes de realizar el proceso de extracción automática, añadir el control interno. La extracción se realiza en la plataforma EasyMag de Biomerieux siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante.

2º paso: RT-PCR múltiple: Preparación de la mastermix. En tubos aptos para PCR mezclar la master mix con el extracto obtenido en el primer paso. Colocar los tubos en el termociclador siguiendo las condiciones y cascadas o rampas de temperaturas especificadas por el fabricante (Tabla 5).

	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
<b>Pre calentamiento</b>	1	50	20:00
<b>Desnaturalización</b>	1	95	15:00
<b>Amplificación</b>	34	95	0:30
		59	0:30
		72	0:30
<b>Elongación</b>	1	72	2:00
<b>Terminación</b>		4	Mantenido

**Tabla 5:** Programa de temperaturas y tiempos del termociclador para el protocolo Luminex de virus respiratorios.

3<sup>er</sup> paso: Hibridación y detección con las micro-esferas: Vortear el reactivo que contiene la mezcla de esferas, y sonicar durante 10 segundos en una bañera de ultrasonidos para dispersar las microesferas. Repetir dos veces. Dispensar 20 µl de la mezcla en todos los pocillos de una placa de microtitulación, añadiendo 2 µl del producto de la RT-PCR en los pocillos correspondientes. Añadir la solución de estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) diluida en una bañera y utilizando una pipeta multicanal dispensar 75 µl de la solución en cada pocillo, homogeneizando la placa de reacción en un agitador de placas. Sellar la placa e introducir en el termociclador a 45°C durante 20 minutos.

4º paso: Lectura de datos: Tras la hibridación destapar la placa e introducir en el aparato de lectura el cual realizará la adquisición de datos y su posterior lectura (Figura 12).



Figura 12: Plataforma Luminex.

5º paso: Análisis de los datos: El software TDAS RVP analiza los datos proporcionando una lista de los virus detectados en cada muestra (Figura 13).

Lo...	Sample	POS Calls	Controls		Influenza a...	RSV		Notes and explanations
			Run Control	Internal C...	Influenza B	RSV A	RSV B	
A1	Sample 1		ABS	PRES	NEG	NEG	NEG	
B1	Sample 2		ABS	PRES	NEG	NEG	NEG	
C1	Sample 3	Influenza B	ABS	PRES	POS	NEG	NEG	
D1	Sample 4		ABS	PRES	NEG	NEG	NEG	
E1	Sample 5		ABS	PRES	NEG	NEG	NEG	
F1	Sample 6		ABS	PRES	NEG	NEG	NEG	
G1	Sample 7		ABS	PRES	NEG	NEG	NEG	
H1	Sample 8		ABS	PRES	NEG	NEG	NEG	
A2	Sample 9	RSV B	ABS	PRES	NEG	NEG	POS	
B2	Sample 10	RSV A	ABS	PRES	NEG	POS	NEG	
C2	Sample 11		ABS	PRES	NEG	NEG	NEG	

Target	Call	Signals (MFI)		Thresholds	
		Raw	Background	Positive	Negative
Run Control	ABS	42.0	59.0	300 / 1x	300 / 1x
Internal Co...	PRES	1100.5	62.0	300 / 1x	300 / 1x
Influenza A	POS	6096.0	73.5	300 / 1x	150 / 1x
H1	POS	3731.0	123.5	300 / 1x	150 / 1x
H3	NEG	91.5	61.0	300 / 1x	150 / 1x
Influenza B	NEG	43.5	55.5	300 / 1x	150 / 1x
RSV A	NEG	37.0	47.0	300 / 1x	150 / 1x
RSV B	NEG	41.0	72.0	300 / 1x	150 / 1x
Para 1	NEG	23.0	27.0	300 / 1x	150 / 1x
Para 2	NEG	59.0	52.5	300 / 1x	150 / 1x
Para 3	NEG	49.0	81.5	300 / 1x	150 / 1x
Rhinovirus	NEG	52.0	58.0	300 / 1x	150 / 1x
Metapneu...	NEG	61.5	18.5	300 / 1x	150 / 1x
Adenovirus	NEG	51.0	53.5	300 / 1x	150 / 1x

Figura 13: Software de análisis TDAS RVP.

### RT-PCR en tiempo real para diagnóstico específico de A/H1N1pdm09

Para confirmar que el subtipo gripal era el A/H1N1pdm09, todas las muestras positivas para gripe A no subtipables por Luminex se analizaron con el reactivo “RealTime ready Influenza A/H1N1 Detection Set” de Roche, específico para la detección del virus gripal A/H1N1pdm09.

La técnica consiste en una RT-PCR a tiempo real, en la que se usa una combinación de cebadores y sonda de hidrólisis específicas para la detección de la proteína de la matriz viral (M2) y otro juego de cebadores y sonda específicos para la hemaglutinina (H) del virus gripal pandémico (160). Las sondas en este ensayo están marcadas con FAM. La técnica incluye un control positivo para el gen de la M2 y otro para el gen de la H.

- **Protocolo de trabajo**

El protocolo utilizado se optimizó para su uso en el termociclador LightCycler 2.0 (**Figura 14**).



**Figura 14:** Termociclador a tiempo real LightCycler 2.0.

1º paso: Extracción de los ácidos nucleicos: La extracción se lleva a cabo en la plataforma EasyMag de Biomerieux siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante.

2º paso: RT-PCR: Preparar la mezcla de reacción (una para el gen de la proteína M2 y otra para el gen de la HA). Homogenizar y mantener en frío hasta su utilización. Dispensar 10 µl de cada una de las mezclas de reacción en todos los pocillos de la placa. Vortear y centrifugar los tubos que contienen el material genético extraído de las muestras respiratorias. Añadir 10 µl de cada muestra en el pocillo correspondiente, uno para el gen HA y otro para el M2. Añadir 10 µl de agua libre de nucleasas en dos pocillos extra como control negativo. Para confirmar la validez

del ensayo, añadir un control positivo para el gen M2 y otro para el gen HA, ambos diluidos en agua libre de nucleasas a una concentración final de 1:10. Sellar la placa, centrifugar para mezclar la muestra con la mezcla de reacción e introducir en el termociclador siguiendo el programa especificado en la Tabla 6.

Programa	Ciclos	Segmento	Tª	Tiempo
Transcripción reversa	1		95º	8:00
UDG	1		40º	10:00
			95º	5:00
Amplificación	45	Desnaturalización	95º	0:01
		Anillamiento	60º	0:20
		Elongación	72º	0:01
Refrigeración	1		40º	0:30

Tabla 6: Programa de temperaturas y tiempos del Termociclador RT-PCR (Roche).

3<sup>er</sup> paso: Lectura Interpretación de resultados: La lectura e interpretación se realizaron mediante el software proporcionado por el fabricante (Figura 15). Una muestra se consideró positiva, si lo era tanto para el gen que codifica la proteína M2 y para el gen HA siendo los controles de la reacción conformes (positivos y negativos).



Figura 15: Resultados y software de análisis del LightCycler 480 II.

## Perfiles de mediadores inmunológicos. Proteómica.

Las citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento se midieron usando el panel Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-plex Assay de Bio-Rad, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las inmunoglobulinas se midieron usando el panel Bio-Plex ProHuman Isotyping Panel de Bio-Rad, según las instrucciones del fabricante.

Estos paneles se basan en el uso de la citometría de flujo y permiten la medición cuantitativa de mediadores inmunes diferentes. El principio de este análisis es similar a un inmunoensayo tipo sándwich.

Los anticuerpos dirigidos contra mediadores inmunológicos diana están unidos covalentemente a microesferas magnéticas teñidas internamente. Las microesferas reaccionan con las biomoléculas diana presentes en la muestra. El principio es similar al de un microarray pero con la ventaja de utilizar sondas adheridas sobre partículas en suspensión en lugar de fijas sobre una superficie, con objeto de aumentar su sensibilidad.

Al igual que en el kit de diagnóstico de virus respiratorios, los datos de la reacción son adquiridos usando el sistema Luminex, el cual permite cuantificar la intensidad de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en la superficie de las microesferas.

Este aparato emite una radiación con una longitud de onda capaz de excitar las moléculas de fluorocromo contenidas en las microesferas. La intensidad de la fluorescencia emitida por éstas permite diferenciar el analito que se mide en cada caso. Otro láser excita las moléculas de ficoeritrina (PE) que se añaden al final del ensayo y mediante el sistema óptico de detección del Luminex se mide la intensidad de la reacción que tiene lugar en la superficie de las microesferas y el software del Luminex calcula automáticamente la concentración de cada mediador en la muestra problema, empleando una curva estándar derivada de una suspensión de mediador estándar, de concentración conocida y de la que se hacen diluciones seriadas. Para una adecuada adquisición de los datos, las microesferas están teñidas con una combinación de dos colorantes fluorescentes en proporciones conocidas de manera que cada microesfera tiene asignado un número (región de la microesfera) del 1 al 100 según el ratio de los dos colorantes fluorescentes.

- **Protocolo de trabajo**

Preparar los estándares realizando diluciones seriadas (1/4) de un estándar suministrado con el kit resultando 8 estándares que serán analizados por duplicado. Como control negativo utilizar diluyente del estándar.

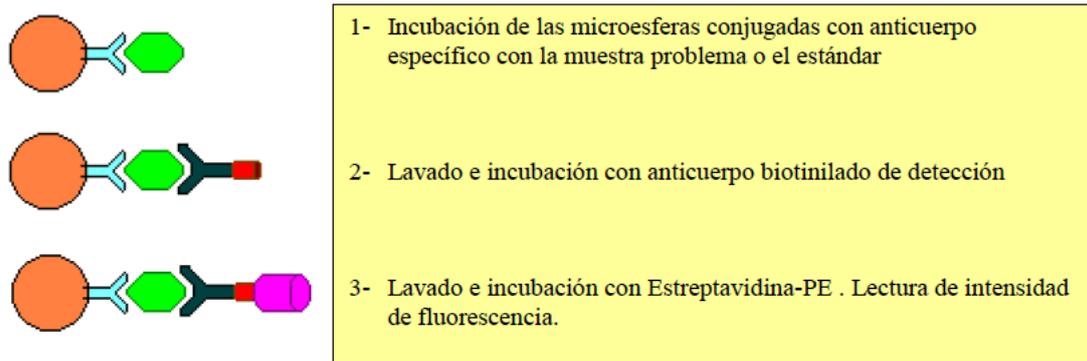
Preparar las muestras realizando diluciones 1/4 para el análisis de citoquinas y diluciones 1/10.000 para el análisis de inmunoglobulinas.

Humectar la placa con 150 µl del tampón y eliminar posteriormente el tampón mediante filtración por vacío.

Una vez preparada la placa añadir las microesferas. Estas microesferas incorporan el anticuerpo dirigido frente a los diferentes mediadores. Lavar los micropocillos, repetir y añadir los estándares, controles y muestras en su pocillo correspondiente (50 µl). Incubar la placa a temperatura ambiente y en agitación durante 30 minutos.

Tras la incubación, realizar 3 lavados y añadir 25 µl del anticuerpo de detección (marcado con biotina) a cada pocillo. Realizar una segunda incubación a temperatura ambiente y en agitación durante 30 minutos. Como resultado se formará un sándwich de anticuerpos alrededor del mediador.

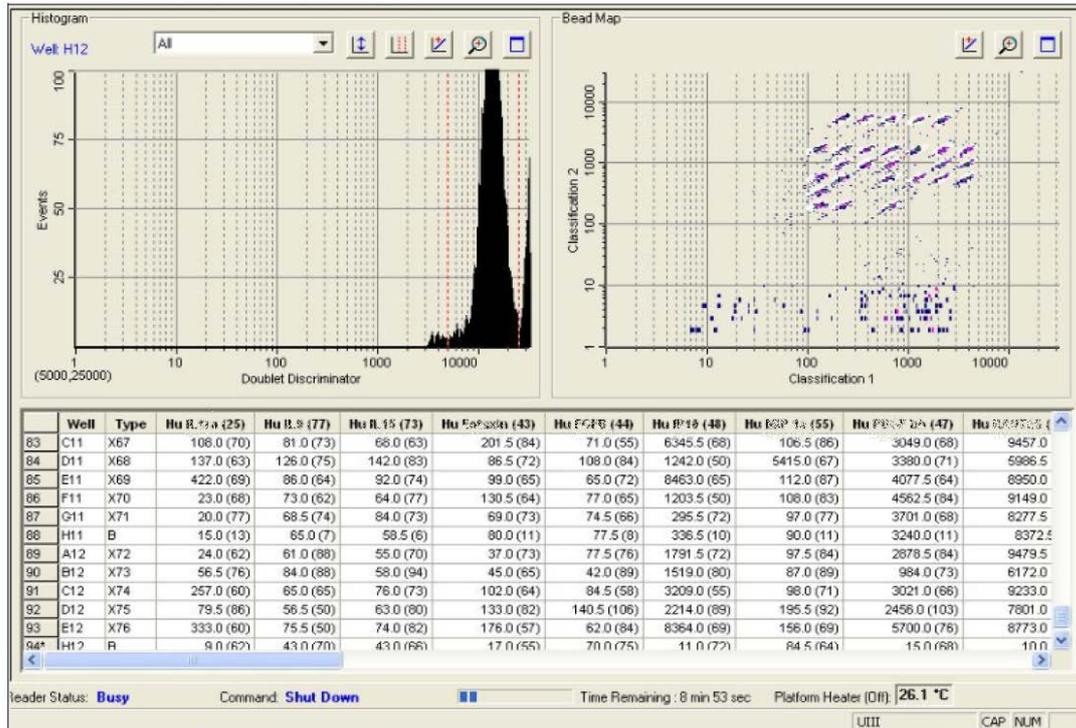
Pasado el tiempo de incubación realizar 3 lavados de la placa, adicionar la solución de estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) previamente diluida a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente en agitación durante 10 minutos. Durante esta incubación el SAPE se unirá al anticuerpo de detección biotinilado en la superficie de la microesfera (Figura 16).



**Figura 16:** Representación gráfica del método utilizado para la detección multiplex de mediadores inmunológicos.

Finalizada la incubación y previamente al proceso de lectura lavar la placa y mantener agitación a 1.100 rpm durante 30 segundos.

Introducir la placa en la plataforma Luminex, donde mediante el software suministrado por el fabricante, se realizará el análisis de los datos (**Figura 17**). Los valores del último estándar se considerarán como límites de detección para cada mediador, según recomendación del fabricante. Aquellos valores por debajo del nivel de detección serán equiparados al nivel de detección.



**Figura 17:** Programa donde se recogen en una tabla los valores de cada citoquina y en los gráficos las regiones en que se distribuyen las esferas así como la intensidad luminosa que emite la muestra.

## Análisis estadístico de los resultados.

El análisis estadístico de los datos se realizó usando la versión 20.0 del programa SPSS para Windows.

La descripción de los pacientes se realizó calculando la frecuencia absoluta (n) y la proporción (%) en el caso de las variables cualitativas. Las variables cuantitativas se expresaron como mediana y rango intercuartil.

La distribución por sexos de los pacientes con gripe se representó gráficamente usando un diagrama de barras realizado con el programa Microsoft Excel 2010.

La duración de la estancia hospitalaria de los pacientes con gripe se representó gráficamente en forma de diagrama de cajas usando el programa SPSS.

Para estimar diferencias entre grupos, se realizaron comparaciones utilizando el test del Chi-cuadrado en el caso de las variables categóricas. Las diferencias entre variables cualitativas

se evaluaron mediante el test de Mann-Whitney, ya que el test de Saphiro Wilk demostró ausencia de distribución normal. En todas las comparaciones entre grupos se asumió un nivel de significación estadística igual o menor de 0,05.

Los factores diferenciales entre pacientes con gripe u otros virus se representaron gráficamente utilizando diagramas de cajas (programa SPSS) o gráficos de sectores (programa Excel).

En el caso de los niveles de citoquinas, los niveles presentados por los pacientes se compararon con los niveles presentados por los controles sanos ya que no existen valores de normalidad para estos mediadores inmunológicos. Se realizó representación gráfica de estos niveles mediante diagramas de cajas utilizando el programa SPSS.

La asociación entre los niveles de citoquinas se calculó utilizando el coeficiente de correlación de Spearman-Karber, se consideraron significativas las correlaciones cuyo valor  $p$  fue igual o inferior a 0,05. Mediante el programa JColorGrid se representaron gráficamente las correlaciones significativas generando mapas de color.

El estudio de los niveles de inmunoglobulinas se realizó de la misma manera que para las citoquinas, con la única diferencia de que no se incluyeron comparaciones con el grupo de controles sanos ya que en el caso de las inmunoglobulinas sí que existen valores de normalidad.

La correlación entre citoquinas e inmunoglobulinas con el APACHE II se representó mediante diagramas de dispersión y se calculó la asociación utilizando el coeficiente de correlación de Spearman-Karber.

### **Modelos predictivos de mortalidad, curvas de supervivencia y AUROC.**

#### **Regresión de Cox**

Con el fin de evaluar el riesgo de muerte de los pacientes en función de los niveles plasmáticos de inmunoglobulinas y del tiempo, se realizó un modelo de regresión de Cox.

En el análisis de mortalidad solamente se incluyeron los fallecimientos producidos en los primeros 28 días tras el ingreso en UCI para evitar el estudio de muertes no vinculadas a la neumonía.

Los niveles de inmunoglobulinas medidos al ingreso se logaritizaron para discriminar la influencia de la ausencia de normalidad. Además se incluyeron en el análisis diversas variables demográficas, clínicas y analíticas de los pacientes.

Se realizó un primer análisis univariante en el que el nivel de significación se fijó en  $p < 0,1$  para seleccionar las variables que pudieran ser potenciales factores de confusión en el análisis multivariante.

Aquellas variables que resultaron significativas en el análisis univariante se volvieron a analizar mediante regresión multivariante de Cox utilizando el método Wald, considerando en este caso un nivel de significación estadística  $p \leq 0,05$ .

La probabilidad de muerte en función del tiempo se expresó mediante *Hazard Ratio* (HR) e intervalo de confianza al 95% (IC95%).

### **Curvas de supervivencia**

La proporción acumulada de supervivencia se representó mediante curvas de Kaplan Meier.

En este análisis, las inmunoglobulinas que resultaron relacionadas con mortalidad en la regresión de Cox se categorizaron como variables mediante el cálculo de deciles de los niveles de cada una de ellas.

Para estimar diferencias en el tiempo de supervivencia entre grupos según sus niveles de inmunoglobulinas al ingreso se realizó la prueba de logaritmo del rango (*logrank*). El último decil significativo ( $p \leq 0,05$ ) según esta prueba se estableció como punto de corte, representándose gráficamente las curvas de supervivencia para los grupos definidos en función de dicho punto de corte.

### **Área bajo la curva ROC**

Para evaluar la capacidad discriminativa como test diagnóstico de mortalidad que presentan la IgM y la IgG2 se calculó el área bajo la curva ROC para ambas.

Solamente se incluyeron en el análisis los fallecimientos producidos en los primeros 28 días tras el ingreso en UCI para evitar el estudio de muertes no vinculadas a la neumonía.

El área bajo la curva ROC se representó gráficamente utilizando el programa SPSS.



*Resultados*

---



## Pacientes

Se reclutaron 169 pacientes, 109 de los cuales no cumplieron los criterios establecidos. En la mayoría de los casos no se cumplió el criterio de confirmación de virus de la gripe A/H1N1 u otros virus. En 10 pacientes no se confirmó radiológicamente el diagnóstico de neumonía. En el suero de 16 pacientes no fue posible medir los niveles de inmunoglobulinas o citoquinas por muestra insuficiente o suero hemolizado. En seis pacientes no se recogió muestra para analítica en las primeras 24 horas o bien la hoja de recogida de datos clínicos y demográficos no estaba correctamente cumplimentada. Por tanto en el análisis final se incluyeron 60 pacientes que cumplían todos los criterios establecidos (**Figura 18**).



**Figura 18:** Pacientes reclutados al inicio, y causas de su exclusión.

Se dividió la población en dos grupos atendiendo al virus causante de la neumonía: el primer grupo lo formaron 40 pacientes con infección por virus de la gripe y el segundo grupo incluyó 20 pacientes con neumonía causada por otros virus.

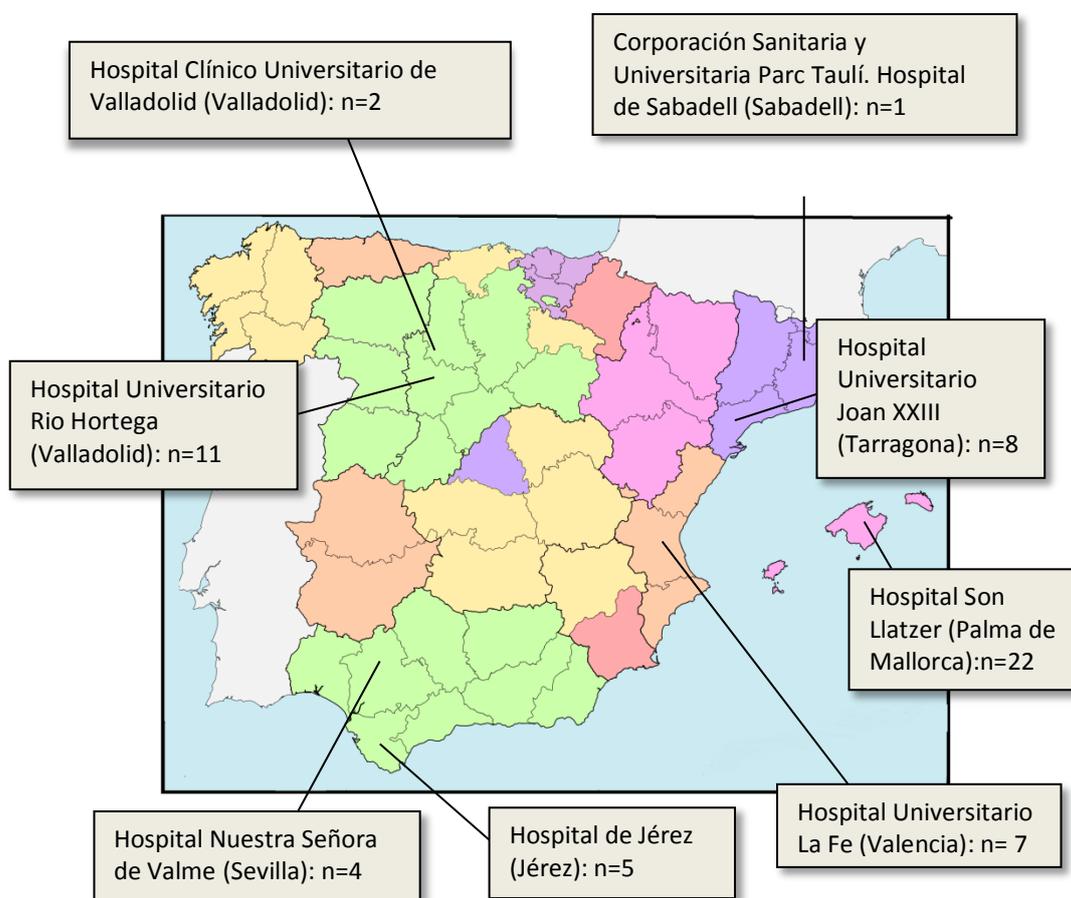
En base a los objetivos descritos con anterioridad se realizaron dos análisis:

**1º NAC gripal:** Descripción de las características de los pacientes y búsqueda de los factores asociados a mortalidad en la neumonía por Gripe.

**2º NAC vírica no gripal:** Descripción de las características de los pacientes y búsqueda de los factores diferenciales con pacientes con NAC por gripe.

En este análisis se excluyeron 2 pacientes del grupo Neumonía por gripe por presentar coinfección por gripe y otro virus respiratorio.

La procedencia de los pacientes se representa en la **Figura 19**.



**Figura 19:** Hospitales participantes y número de pacientes reclutados en cada uno de ellos.

---

## **Estudio de los factores de mortalidad asociados a la neumonía por gripe**

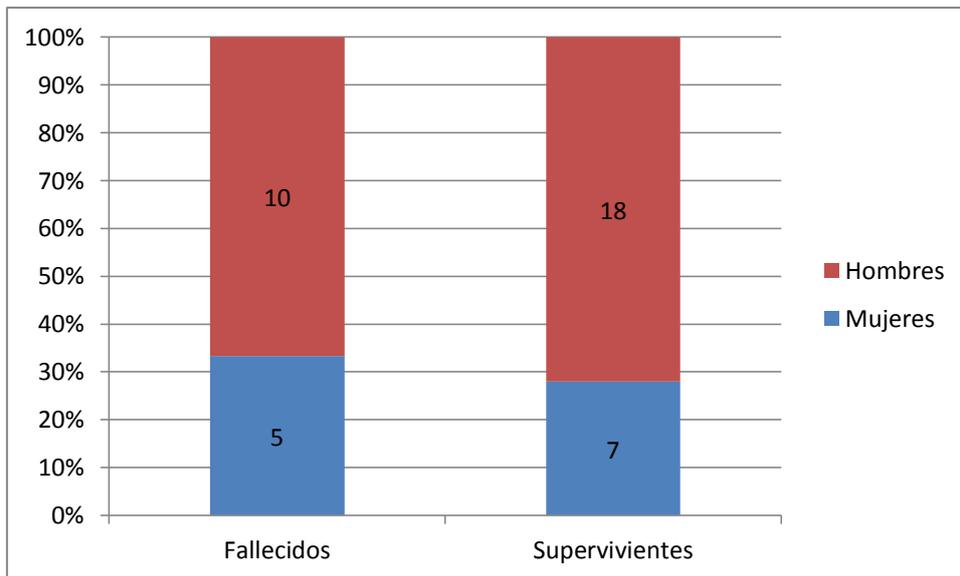
### **Características demográficas, clínicas y analíticas de la población:**

Se incluyeron 40 pacientes admitidos en UCI con diagnóstico de neumonía y con diagnóstico molecular de virus de la gripe A/H1N1pdm09. Para realizar comparaciones de los niveles de citoquinas se incluyeron 15 controles sanos reclutados entre los trabajadores del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, de edad y sexo similares a los pacientes.

De los 40 pacientes 15 (37,5%) fallecieron y 25 (62,5%) sobrevivieron. La mediana de edad de los pacientes fue 55,0 años con un rango intercuartil (RI) de 20. La mediana de edad de los supervivientes fue 52,0 años (RI: 27). La mediana de edad de los fallecidos fue superior: 58,0 años (RI: 9), aunque esta diferencia no era estadísticamente significativa.

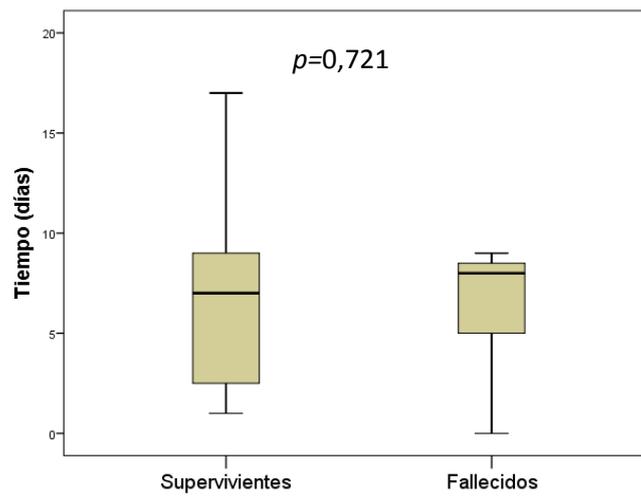
No se observaron diferencias en la distribución por sexos en los distintos grupos de pacientes (Prueba de Chi-cuadrado). El 67% de los pacientes fallecidos (n=10) fueron hombres y el 33% (n=5) mujeres. El 72% de los pacientes supervivientes fueron hombres (n=18) mientras que el 28% fueron mujeres (n=7) (

Figura 20).

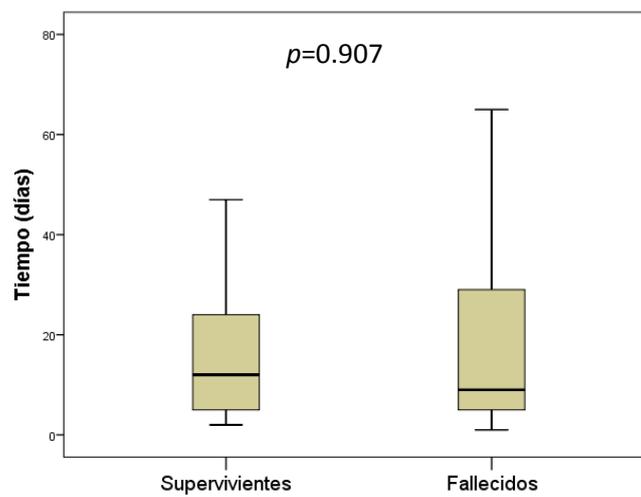


**Figura 20:** Distribución por sexo de los pacientes fallecidos y supervivientes.

Los supervivientes ingresaron en la UCI en los primeros siete días tras el inicio de los síntomas, rango intercuartil (RI): 7, mientras que dicho periodo fue de ocho días (RI: 3) en los fallecidos (**Figura 21**). El tiempo de ingreso en UCI fue de 12 días para los supervivientes (RI: 20) y de 9 días (RI: 24) para los fallecidos (**Figura 22**).



**Figura 21:** Días desde el inicio de los síntomas hasta el ingreso en UCI.



**Figura 22:** Duración del ingreso en UCI.

Características	Total (n=40)	Supervivientes (n=25)	Fallecidos (n=15)	Valor p
Edad (años)	55 [20]	52 [27]	58 [9]	n.s.
Sexo				n.s.
Femenino	12 (30)	7 (28)	5 (33)	
Masculino	28 (70)	18 (72)	10 (66)	
Comorbilidades	30 (75)	18 (72)	12 (80)	n.s.
Patología digestiva	3 (7)	2 (8)	1 (6)	n.s.
Patología cardiovascular	7 (17)	4 (16)	3 (20)	n.s.
Patología neurológica	3 (7)	3 (12)	0 (0)	n.s.
Patología renal	2 (5)	2 (8)	0 (0)	n.s.
Patología respiratoria	11 (27)	8 (32)	3 (20)	n.s.
Inmunosupresión	16 (40)	6 (24)	10 (66)	<b>0.008</b>
Diabetes	6 (15)	4 (16)	2 (13)	n.s.
Hipertensión	12 (30)	8 (32)	4 (26)	n.s.
Fumador	18 (45)	11 (44)	7 (46)	n.s.
Abuso alcohol	3 (7)	2 (8)	1 (6)	n.s.
Uso drogas i.v.	1 (2)	1 (4)	0 (0)	n.s.
Obesidad	8 (20)	5 (20)	3 (20)	n.s.
Infección bacteriana				
Al ingreso en UCI	10 (25)	5 (20)	5 (33)	n.s.
Durante la estancia en UCI	14 (35)	6 (24)	8 (53)	n.s.
VMI	29 (72)	14 (56)	15 (100)	<b>0.004</b>
VMNI	11 (27)	10 (40)	1 (6)	n.s.
APACHE II	16 [11]	13 [8]	21 [9]	<b>0.001</b>
Días hasta muerte	8 [24]	–	8 [24]	n.s.
PAFI	111 [81]	115 [139]	86 [71]	n.s.
Creatinina (mg/dl)	1.06 [1]	1.05 [0]	1.16 [6]	n.s.
AST (U/L)	54 [82]	60 [56]	50 [104]	n.s.
ALT (U/L)	38 [51]	34 [33]	41 [68]	n.s.
Leucocitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	8.3 [11.3]	10.9 [9.9]	3.9 [9.3]	<b>0.030</b>
Neutrófilos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	6.9 [9.7]	8.8 [8.7]	3.6 [8.4]	n.s.

**Tabla 7:** Características clínicas y analíticas de los pacientes: Las variables continuas se expresan como mediana [rango intercuartil] y las categóricas como n (%). n.s.= no significativo.

En la Tabla 7 se detallan los antecedentes personales y comorbilidades así como datos clínicos y bioquímicos de relevancia de los pacientes hospitalizados al momento del ingreso. Solo se encontraron diferencias significativas entre los fallecidos y los supervivientes respecto a la presencia de estado de inmunosupresión previo al ingreso, la necesidad de ventilación mecánica invasiva, el valor en la puntuación APACHE II y el nivel de leucocitos

La mayoría de los pacientes presentaban comorbilidades previas al ingreso, (72% de los supervivientes y 80% de los fallecidos). En el grupo de supervivientes las comorbilidades más frecuentes fueron la presencia de enfermedad respiratoria (32%) e hipertensión arterial (32%) mientras que en el grupo de fallecidos fueron la presencia de inmunosupresión (66%) e hipertensión arterial (26%).

El porcentaje de pacientes que había sido fumador en algún momento de su vida fue del 45% (n=18).

En el momento del ingreso en UCI presentaban coinfección bacteriana el 25% de los pacientes (n=10). Durante la estancia en UCI se diagnosticó la presencia de coinfección en cuatro pacientes más (n=14, 35%).

Las bacterias identificadas fueron: *H. influenzae* (n=1), *K. pneumoniae* + *A. baumannii* (n=1), *P. aeruginosa* (n=3), *S. aureus* (n=1), *S. hominis* (n=1), *S. marcescens* (n=1), *S. pneumoniae* (n=4), *S. pyogenes* + *S. warneri* + *P. aeruginosa* (n=1), *Staphylococcus* sp. (n=1).

Las causas de muerte fueron fallo respiratorio (n=9, 60%), fracaso multiorgánico (n=5, 33.3%), hemorragia cerebral (n=1, 6.6%).

Los niveles de leucocitos en el grupo de fallecidos se encuentran por debajo de los niveles considerados normales en adultos (leucopenia).

Los niveles de neutrófilos también están disminuidos en el grupo de fallecidos, si bien el nivel de significación en este caso (0.092) no se encuentra dentro del margen aceptado en este trabajo, sí que está dentro del límite ( $p < 0,1$ ) que se considera generalmente aceptable en análisis estadísticos, por lo que cabe reseñar esta diferencia.

Dado el alto porcentaje de pacientes inmunosuprimidos se realizó otro análisis para determinar si existían diferencias en los niveles de leucocitos entre inmunosuprimidos y no inmunosuprimidos. La mediana del valor de leucocitos en IMS fue de  $4,8 \times 10^3/\mu\text{L}$  con un rango intercuartil de  $16,1 \times 10^3/\mu\text{L}$ , en no IMS la mediana fue de  $8,5 \times 10^3/\mu\text{L}$  con un rango intercuartil de  $8,4 \times 10^3/\mu\text{L}$ , resultando las diferencias no estadísticamente significativas.

## Tratamiento

Todos los pacientes fallecidos (n=15) y el 88% de los supervivientes (n= 22) recibieron tratamiento antibiótico intravenoso durante su estancia en la UCI.

Todos los pacientes que presentaron coinfección bacteriana (n=14) recibieron tratamiento antibacteriano, también lo recibieron el 92% (n=22) de los pacientes en los que no se diagnosticó coinfección bacteriana. Los antibióticos más usados fueron los  $\beta$ -lactámicos, y dentro de estos los carbapenemes, seguidos de quinolonas (principalmente levofloxacino) y macrólidos (azitromicina).

El 43% de los pacientes recibieron tratamiento con esteroides (n=17) (Tabla 8). De ellos 9 estaban en el grupo de los supervivientes y 8 en el de los fallecidos (Tabla 9). No se encontraron diferencias significativas en cuanto al tratamiento con esteroides entre pacientes fallecidos y supervivientes.

Se estudió la relación entre el uso de esteroides y la coinfección bacteriana, no se encontró ninguna relación ni con la presencia de coinfección al ingreso en UCI ni durante la estancia en UCI ( $p= 0,726$  y  $p=0,517$  respectivamente)

Tratamiento con esteroides	n	%
Si	17	42,5
No	21	52,5
No registrado	2	5
Total	40	100

**Tabla 8:** Relación total pacientes que recibieron tratamiento con esteroides durante su estancia en UCI.

Esteroides	Supervivientes (n=25)		Fallecidos (n=15)	
	n	%	n	%
Si	9	36	8	53
No	14	56	7	47
No registrado	2	8	0	0

**Tabla 9:** Relación de pacientes supervivientes y fallecidos que recibieron tratamiento con esteroides durante su estancia en UCI.

Todos los pacientes, excepto uno del grupo de los fallecidos, recibieron tratamiento con oseltamivir (**Tabla 10**).

Pacientes	Oseltamivir		Total
	No	Si	
<b>Supervivientes</b>	0 (0%)	25 (100%)	25
<b>Fallecidos</b>	1 (6.6%)	14 (93.4%)	15
<b>Total</b>	1 (2,5%)	39 (97,5%)	40

**Tabla 10:** Relación de pacientes supervivientes y fallecidos que recibieron tratamiento con oseltamivir durante su estancia en UCI. Entre paréntesis se muestra el porcentaje respecto al total de la fila.

De los 39 pacientes que recibieron tratamiento con oseltamivir en la UCI, en todos ellos se registró la fecha de inicio de tratamiento en UCI, lamentablemente en muchos de estos pacientes no se recogió el tratamiento durante su estancia en planta previa al ingreso en UCI, de manera que fue imposible analizar si los pacientes iniciaron el tratamiento con oseltamivir en las primeras 48 horas desde el inicio de los síntomas.

Con los datos disponibles podemos analizar el retraso del tratamiento producido en la UCI: 36 pacientes recibieron tratamiento con oseltamivir en las primeras 48 desde el ingreso en UCI, en 5 de estos pacientes el tratamiento se había iniciado en planta antes de la admisión en la UCI, en 27 el tratamiento en UCI comenzó en el momento del ingreso y en 4 comenzó al día siguiente. En 3 de los pacientes el tratamiento se retrasó más de 48 horas desde el ingreso en la UCI (Tabla 11).

Días hasta inicio del tratamiento en UCI	n	%
Anterior ingreso UCI	5	12,5
0	27	67,5
1	4	10
3	1	2,5
4	1	2,5
6	1	2,5
No tratado	1	2,5
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100</b>

**Tabla 11:** Días desde ingreso en la UCI hasta el comienzo del tratamiento con oseltamivir.

Se recogió la dosis recibida en 31 pacientes, de los cuales a 17 se les administró una dosis de 150 mg/24h, a 10 se les administró una dosis de 300 mg/24h, y los restantes 4 se les administró una dosis de 75 mg/24h (Tabla 12).

Dosis oseltamivir	n	%
150 mg/24h	17	42,5
300 mg/ 24h	10	25
75 mg/24h	4	10
No registrado	8	20
No tratado	1	2,5

**Tabla 12:** Descripción de las dosis de oseltamivir recibidas por los pacientes durante la estancia en UCI.

La duración del tratamiento fue de 8 días de mediana, con un rango intercuartílico de 6 días.

## Perfiles de citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento en plasma

Se estudiaron 17 quimiocinas, citoquinas, factores de crecimiento y mediadores inmunológicos: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

Los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5 no fueron detectables en plasma.

Los niveles de IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF y MCP-1 fueron significativamente mayores en los pacientes comparado con los controles sanos.

Los niveles de IL-12, IL-13 e IL-17 fueron menores en los pacientes comparando con los controles sanos, pero hay que señalar que en el caso de la IL-13 y la IL-17 la diferencia no se puede considerar relevante a nivel fisiológico.

Citoquina	Pacientes	CS	Valor <i>p</i>
IL-4	0,6 [2,6]	2,0 [2,0]	n.s.
IL-6	117,2 [242,7]	2,0 [0,0]	<0,001
IL-7	2,6 [11,3]	2,0 [0,0]	n.s.
IL-8	36,5 [101,5]	2,0 [3,8]	<0,001
IL-10	1,7 [23,9]	2,0 [0,0]	n.s.
IL-12	2,2 [0,8]	24,0 [25,5]	<0,001
IL-13	2,0 [0,0]	3,0 [0,0]	<0,001
IL-17	1,3 [4,4]	2,0 [10,2]	0,007
G-CSF	68,9 [498,3]	5,0 [16,5]	<0,001
GM-CSF	5,7 [59,2]	0,0 [0,0]	<0,001
IFN- $\gamma$	81,4 [329,6]	166,0 [216,0]	n.s.
MCP-1	246,8 [566,3]	26,0 [29,5]	<0,001
MIP-1 $\beta$	83,8 [90,8]	63,5 [29,8]	n.s.
TNF- $\alpha$	5,3 [23,4]	7,0 [0,0]	n.s.

**Tabla 13:** Niveles de mediadores en pacientes y controles sanos (CS). Mediana expresada en pg/ml y [rango intercuartil]. Niveles de significación para comparaciones intergrupos  $p < 0,05$ ; n.s: no significativo.

Se compararon los niveles de estos mediadores inmunológicos entre los grupos de pacientes fallecidos y supervivientes, y el grupo de controles sanos. En la Tabla 14 se detalla la mediana y rango intercuartil de todos los grupos de pacientes para cada uno de los mediadores analizados, así como los niveles de significación para las comparaciones entre los distintos grupos.

Citoquina	S	F	CS	S vs F	S vs CS	F vs CS
IL-4	0,4 [2,3]	1,6 [5,6]	2,0 [2,0]	n.s.	n.s.	n.s.
IL-6	52,4 [151,2]	271,4 [1842,4]	2,0 [0,0]	0,001	<0,001	<0,001
IL-7	2,6 [6,6]	5,5 [12,9]	2,0 [0,0]	n.s.	n.s.	n.s.
IL-8	22,7 [62,5]	117,4 [541,7]	2,0 [3,8]	0,001	0.009	<0,001
IL-10	1,7 [7,9]	24,1 [50,9]	2,0 [0,0]	0,018	n.s.	0.027
IL-12	2,2 [0,4]	2,2 [11,0]	24,0 [25,5]	n.s.	<0,001	0.001
IL-13	2,0 [0,0]	2,0 [6,4]	3,0 [0,0]	n.s.	<0,001	0.027
IL-17	1,3 [1,7]	1,3 [29,3]	2,0 [10,2]	n.s.	0.002	n.s.
G-CSF	45,2 [101,0]	166,1 [9885,4]	5,0 [16,5]	0,01	0.003	<0,001
GM-CSF	0,4 [30,3]	30,7 [67,7]	0,0 [0,0]	n.s.	<0,001	<0,001
IFN- $\gamma$	44,5 [238,5]	217,9 [342,8]	166,0 [216,0]	n.s.	n.s.	n.s.
MCP-1	73,2 [349,1]	500,2 [1744,6]	26,0 [29,5]	0,002	0.035	<0,001
MIP-1 $\beta$	63,5 [75,5]	139,5 [240,2]	63,5 [29,8]	0,002	n.s.	0.001
TNF- $\alpha$	5,3 [10,3]	5,3 [53,8]	7,0 [0,0]	ns	n.s.	n.s.

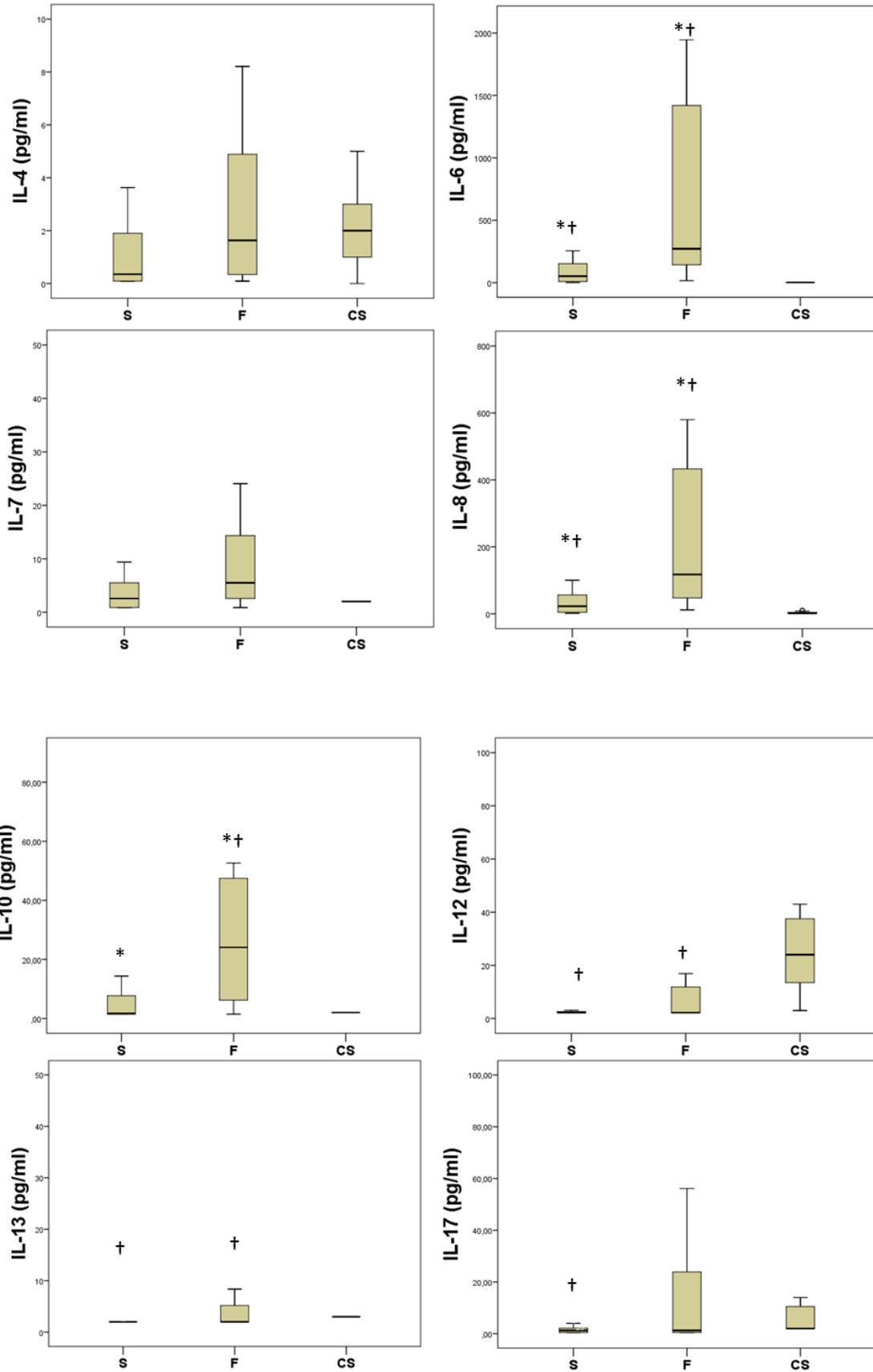
**Tabla 14:** Niveles de mediadores en los grupos de pacientes. S: supervivientes. F: fallecidos. CS: Controles sanos. Mediana y [rango intercuartil] expresados en pg/ml. Niveles de significación para comparaciones intergrupos  $p < 0,05$ ; n.s: no significativo.

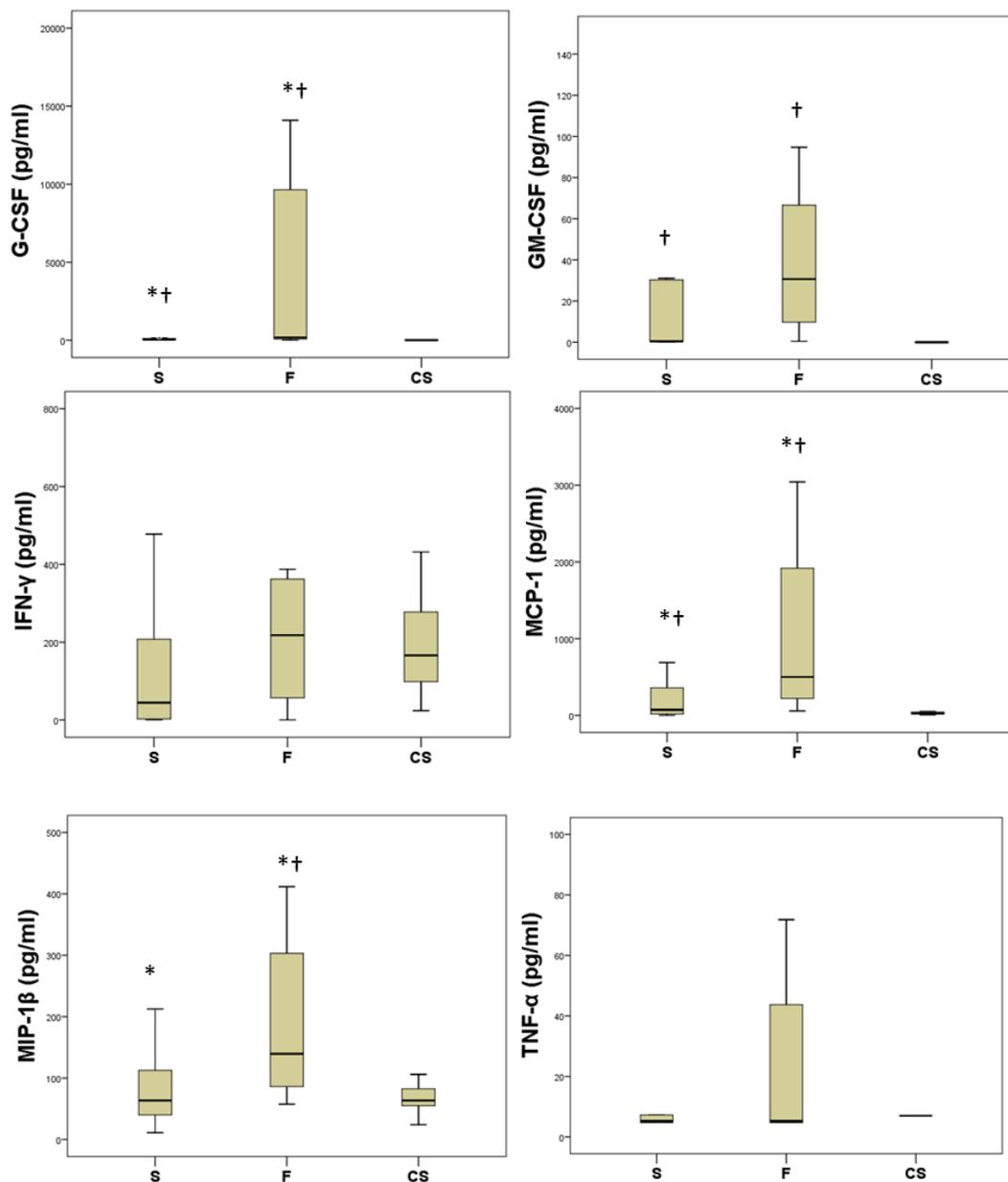
Los niveles de citoquinas fueron en general, más elevados en el grupo de pacientes fallecidos. Los niveles de IL-6, IL-8, G-CSF, MCP-1, se encontraban significativamente elevados en este grupo de fallecidos respecto a los supervivientes y los controles sanos. También se encontraban más elevadas en los pacientes supervivientes respecto a los controles sanos.

MIP-1  $\beta$  e IL-10 se encontraban significativamente más elevadas en los pacientes fallecidos comparando con los supervivientes y los controles sanos.

Para el resto de citoquinas, aunque estadísticamente se observaron algunas diferencias entre grupos, estas se refieren a unas concentraciones bajas que no son relevantes desde el punto de vista fisiológico.

En la Figura 23 se representan los niveles de los mediadores (mediana, rango intercuartil).





**Figura 23:** Representación gráfica de los niveles de citoquinas en pacientes supervivientes (S), fallecidos (F) y controles sanos (CS). †: Diferencias estadísticamente significativas frente a los controles sanos. \*: Diferencias estadísticamente significativas entre supervivientes y fallecidos.

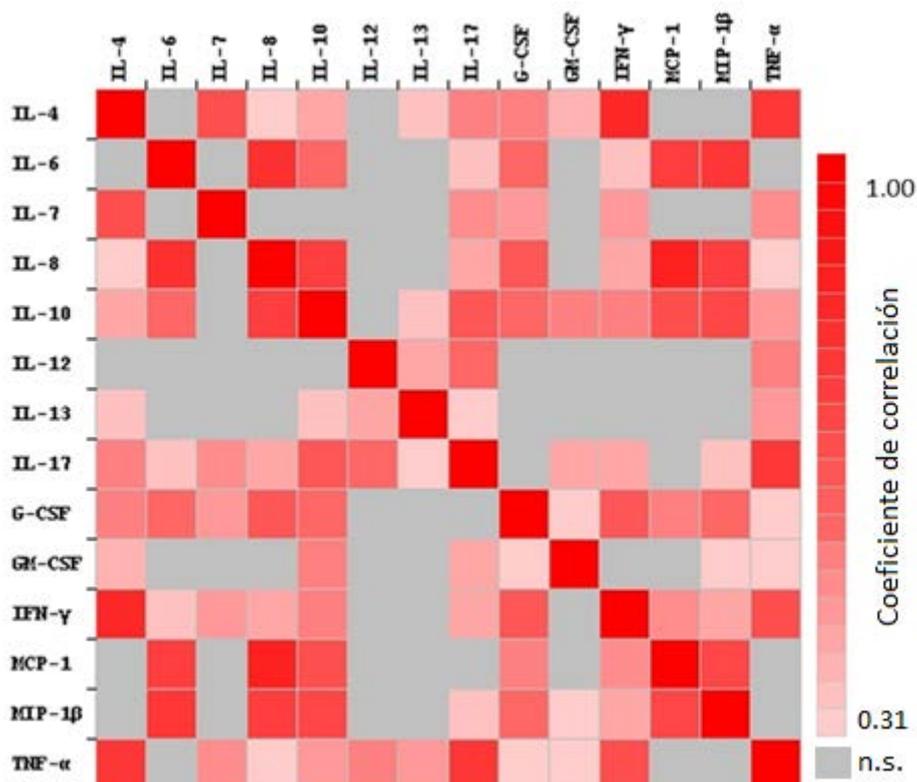
### Estudio de la producción coordinada de citoquinas.

Las citoquinas que mostraron mayor número de correlaciones significativas fueron IL-10, IL-17, G-CSF, IFN-γ y TNF-α. Todas las citoquinas mostraron correlaciones positivas con el resto excepto la IL-12, que correlacionó negativamente con IL-6, G-CSF y MIP-1β, aunque ninguna de estas correlaciones negativas fue estadísticamente significativa. En la **Tabla 15** se muestran los

niveles de significación estadística y en la **Figura 24** aquellas correlaciones que resultaron significativas. (Test Spearman,  $p < 0,05$ ).

	IL-4	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12	IL-13	IL-17	G-CSF	GM-CSF	IFN- $\gamma$	MCP-1	MIP-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
IL-4	.	0,134	<0,001	0,037	0,008	0,254	0,017	<0,001	0,001	0,015	<0,001	0,082	0,070	<0,001
IL-6	0,134	.	0,208	<0,001	<0,001	0,847	0,814	0,019	<0,001	0,283	0,016	<0,001	<0,001	0,171
IL-7	<0,001	0,208	.	0,162	0,155	0,146	0,365	0,001	0,004	0,161	0,003	0,601	0,121	0,001
IL-8	0,037	<0,001	0,162	.	<0,001	0,523	0,111	0,006	<0,001	0,179	0,004	<0,001	<0,001	0,033
IL-10	0,008	<0,001	0,155	<0,001	.	0,056	0,027	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002
IL-12	0,254	0,847	0,146	0,523	0,056	.	0,004	<0,001	0,978	0,087	0,625	0,911	0,746	<0,001
IL-13	0,017	0,814	0,365	0,111	0,027	0,004	.	0,048	0,164	0,233	0,084	0,188	0,475	0,003
IL-17	<0,001	0,019	0,001	0,006	<0,001	<0,001	0,048	.	0,058	0,004	0,007	0,064	0,017	<0,001
G-CSF	0,001	<0,001	0,004	<0,001	<0,001	0,978	0,164	0,058	.	0,038	<0,001	<0,001	<0,001	0,045
GM-CSF	0,015	0,283	0,161	0,179	<0,001	0,087	0,233	0,004	0,038	.	0,120	0,449	0,05	0,048
IFN- $\gamma$	<0,001	0,016	0,003	0,004	<0,001	0,625	0,084	0,007	<0,001	0,120	.	0,001	0,006	<0,001
MCP-1	0,082	<0,001	0,601	<0,001	<0,001	0,911	0,188	0,064	<0,001	0,449	0,001	.	<0,001	0,067
MIP-1 $\beta$	0,070	<0,001	0,121	<0,001	<0,001	0,746	0,475	0,017	<0,001	0,05	0,006	<0,001	.	0,168
TNF- $\alpha$	<0,001	0,171	0,001	0,033	0,002	<0,001	0,003	<0,001	0,045	0,048	<0,001	0,067	0,168	.

**Tabla 15:** Cuadro de correlación de niveles de significación estadística entre los valores de citoquinas.



**Figura 24:** Representación gráfica de los coeficientes de correlación entre los niveles de citoquinas. Se representan en color las correlaciones significativas ( $p < 0,005$ ), la barra de la derecha muestra la escala de color de los coeficientes de correlación. Los cuadros en gris representan correlaciones no significativas.

## Perfiles de Inmunoglobulinas en plasma

### Perfiles de inmunoglobulinas en pacientes supervivientes y fallecidos

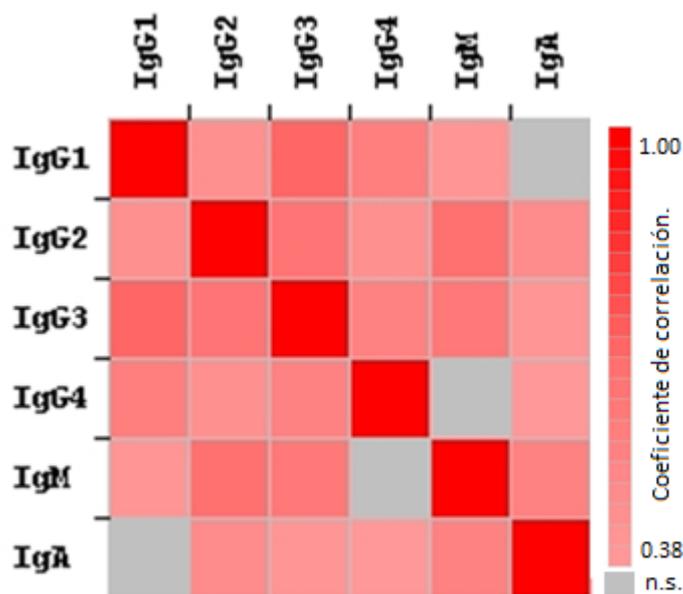
Se midieron cuatro isotipos de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE, y dentro de la IgG, sus 4 subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Los niveles de IgE no fueron detectables en plasma.

El grupo de pacientes fallecidos presentó menores niveles de todas las inmunoglobulinas aunque solo resultado estadísticamente significativa la diferencia en los niveles de IgM (U de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). El nivel de IgG2 estaba por debajo de los valores normales en ambos grupos (133-622 mg/dL), el nivel de IgM estaba por debajo de los valores normales en el grupo de pacientes fallecidos (60-220 mg/dL) (Tabla 16).

Niveles de inmunoglobulinas	Total (n=40)	Supervivientes (n=25)	Fallecidos (n=15)	Valor p
IgG1	836 [908]	856 [674]	816 [2057]	n.s.
IgG2	68 [119]	69 [85]	34 [150]	n.s.
IgG3	102 [173]	102 [202]	66 [172]	n.s.
IgG4	26 [80]	43 [91]	23 [51]	n.s.
IgM	66 [88]	91 [93]	50 [86]	0.049
IgA	134 [91]	135 [84]	130 [136]	n.s.

**Tabla 16:** Niveles de inmunoglobulinas (mediana y [rango intercuartil]), en mg/dL.

Se observó la existencia de una correlación positiva entre todas las inmunoglobulinas a excepción de IgA/IgG1, e IgM/IgG4 (Test de Spearman,  $p < 0,05$ ) (**Figura 25**).



**Figura 25:** Representación gráfica de los coeficientes de correlación entre los niveles de inmunoglobulinas. Se representan en color las correlaciones significativas ( $p < 0,005$ ), la barra de la derecha muestra la escala de color de los coeficientes de correlación. Los cuadros en gris representan correlaciones no significativas.

### Perfiles de inmunoglobulinas por subgrupos de pacientes.

Como se ha comentado previamente los pacientes fallecidos y supervivientes presentaron diferencias significativas a nivel de presencia de inmunosupresión, necesidad de ventilación mecánica invasiva, puntuación APACHE II y niveles de leucocitos (**Tabla 7**) por lo que se

analizaron los perfiles de inmunoglobulinas dividiendo a los pacientes en grupos según esas cuatro variables.

- Inmunosupresión

Los pacientes inmunosuprimidos presentaron niveles inferiores de todas las inmunoglobulinas. Los niveles de IgG2 estaban por debajo del valor considerado normal en adultos (133-622 mg/dL) en ambos grupos de pacientes, pero especialmente en el grupo de inmunosuprimidos. También la IgM y la IgA se encontraban debajo de la normalidad en los pacientes inmunosuprimidos (60-220 mg/dL y 117-420 mg/dL respectivamente) (Tabla 17).

	IS		No IS		Valor <i>p</i>
	Mediana	RI	Mediana	RI	
<b>IgG1</b>	601,6	2253,7	927,2	649,6	n.s.
<b>IgG2</b>	11,9	93,2	100,6	167,5	<0,001
<b>IgG3</b>	38,9	159,6	115,2	252,9	0,009
<b>IgG4</b>	10,1	25,7	46,9	122,1	n.s.
<b>IgM</b>	17,9	76,1	91,6	118,2	0,002
<b>IgA</b>	83,2	116,9	143,6	71,0	0,022

**Tabla 17:** Niveles de inmunoglobulinas (mg/dL) en pacientes inmunosuprimidos (IS) y no inmunosuprimidos (No IS). RI: Rango intercuartil.

- Ventilación mecánica invasiva

En relación a los niveles de inmunoglobulinas en los grupos de pacientes que requirieron o no ventilación mecánica invasiva los niveles no fueron estadísticamente diferentes para ninguna inmunoglobulina. Se encontraron niveles inferiores a los valores normales para la IgG2 en ambos grupos, y para la IgA en el grupo que no requirió ventilación mecánica invasiva.

	VMI		No VMI		Valor <i>p</i>
	Mediana	RI	Mediana	RI	
<b>IgG1</b>	795,5	871,7	979,9	1593,9	n.s.
<b>IgG2</b>	66,7	117,6	67,9	121,7	n.s.
<b>IgG3</b>	102,5	159,9	131,5	320,9	n.s.
<b>IgG4</b>	28,3	53,3	16,4	136,5	n.s.
<b>IgM</b>	66,0	85,6	76,8	156,9	n.s.
<b>IgA</b>	137,3	87,3	85,3	122,0	n.s.

**Tabla 18:** Niveles de inmunoglobulinas (mg/dL) en pacientes que requirieron ventilación mecánica invasiva (VMI) o no (No VMI). RI: Rango intercuartil.

- APACHE II

Para analizar las diferencias en los perfiles de inmunoglobulinas según la gravedad de los pacientes se dividieron estos en dos grupos, aquellos con valores de APACHE II al ingreso iguales o inferiores a 20 y aquellos con valores superiores.

Los pacientes menos graves (APACHE II  $\leq$  20), presentaron niveles superiores de todas las inmunoglobulinas, siendo la diferencia significativa para los niveles de IgG2 e IgM. Los niveles de IgG2 se encontraron por debajo de los niveles normales en adultos (133-622 mg/dL) en ambos grupos. En el caso de la IgM el grupo de pacientes más graves (APACHE II  $>$ 20) presentó también valores menores de los niveles normales (60-220 mg/dL), y esto ocurrió también en el caso de la IgA (VN 117-420 mg/dL) (**Tabla 19**).

	APACHE $\leq$ 20		APACHE $>$ 20		Valor <i>p</i>
	Mediana	RI	Mediana	RI	
<b>IgG1</b>	932,2	1086,2	709,5	1238,7	n.s.
<b>IgG2</b>	75,7	117,2	17,3	107,6	0,048
<b>IgG3</b>	115,2	240,5	65,6	156,1	n.s.
<b>IgG4</b>	41,1	108,9	10,6	51,1	n.s.
<b>IgM</b>	94,1	121,4	38,5	56,3	0,001
<b>IgA</b>	142,9	97,1	103,1	122,7	n.s.

**Tabla 19:** Niveles de inmunoglobulinas (mg/dL) en pacientes con puntuación APACHE II  $<$  20 y con nivel  $>$ 20. RI: Rango intercuartil.

- Leucocitos

Por último, se analizaron las diferencias en los niveles de inmunoglobulinas según los niveles de leucocitos presentados por los pacientes, para ello se usó como punto de corte el valor inferior de niveles de leucocitos considerado normal – 4.500/ $\mu$ l – dividiéndose a los pacientes en dos grupos, aquellos con niveles de leucocitos al ingreso superiores a dicho valor y aquellos con niveles de iguales o inferiores.

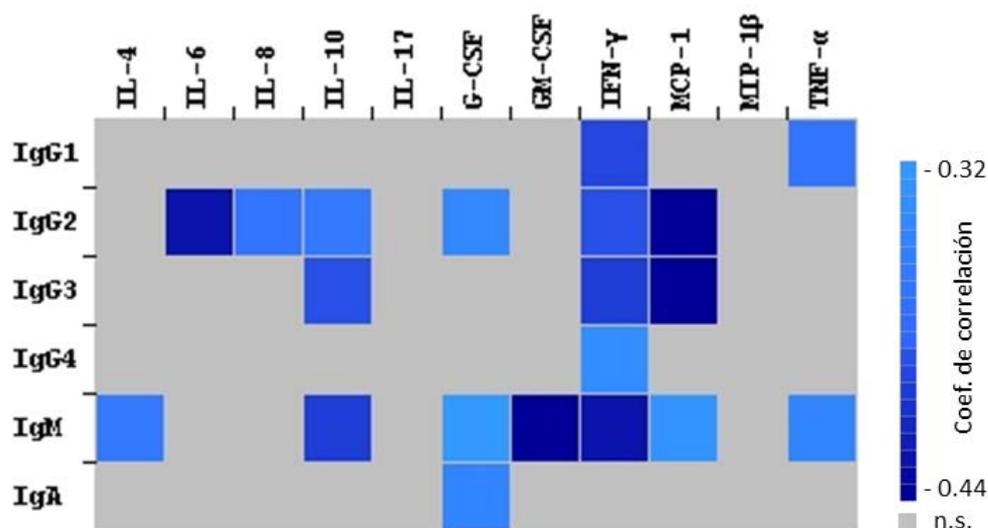
El grupo de pacientes con leucocitos superiores a 4.500/ $\mu$ l presentó niveles superiores de todas las inmunoglobulinas excepto la IgG1, siendo la diferencia significativa en el caso de la IgG2. Los niveles de IgG2 se encuentran en ambos grupos por debajo de los niveles normales en adultos (133-622 mg/dL), en el caso de IgM sus valores fueron inferiores a los normales (60-220 mg/dL) en el grupo de pacientes con niveles de leucocitos  $\leq$ 4.500/ $\mu$ l, esto ocurre también en el caso de la IgA (VN 117-420 mg/dL) (**Tabla 20**).

	Leucocitos $\leq$ 4.500/ $\mu$ l		Leucocitos $>$ 4.500/ $\mu$ l		Valor $p$
	Mediana	RI	Mediana	RI	
IgG1	872,0	2170,1	856,1	800,8	n.s.
IgG2	29,4	103,2	86,1	157,7	0.030
IgG3	74,5	193,2	106,4	228,0	n.s.
IgG4	24,7	41,7	41,1	128,2	n.s.
IgM	54,3	55,2	91,6	78,7	n.s.
IgA	85,5	114,3	143,0	77,9	n.s.

**Tabla 20:** Niveles de inmunoglobulinas (mg/dL) en pacientes según sus niveles de leucocitos al ingreso. RI: Rango intercuartil.

## Correlación entre los perfiles de Inmunoglobulinas y citoquinas en plasma

Se encontró una correlación negativa entre inmunoglobulinas y citoquinas. La IgM fue la inmunoglobulina que presentaba mayor número de correlaciones [coeficiente de correlación,  $\rho$ ] (IL-4 [-0.35, 0.024], IL-10 [-0.40, 0.010], G-CSF [-0.31, 0.050], GM-CSF [-0.44, 0.004], IFN- $\gamma$  [-0.43, 0.005], MCP-1 [-0.31, 0.047], TNF- $\alpha$  [-0.34, 0.032]); seguida por la IgG2 (IL-6 [-0.42, 0.006], IL-8 [-0.36, 0.022], IL-10 [-0,35, 0.026], G-CSF [-0.33, 0.033], IFN- $\gamma$  [-0.39, 0.014], MCP-1 [-0.44, 0.004]); IgG3 (IL-10 [-0.38, 0.014], IFN- $\gamma$  [-0.40, 0.010], MCP-1 [-0.44, 0.004]); IgG1 (IFN- $\gamma$  [-0.39, 0.012], TNF- $\alpha$  [-0.36, 0.021]); IgG4 (IFN- $\gamma$  [-0.33, 0,04]) e IgA (G-CSF [-0.34, 0.032]) (Figura 26).

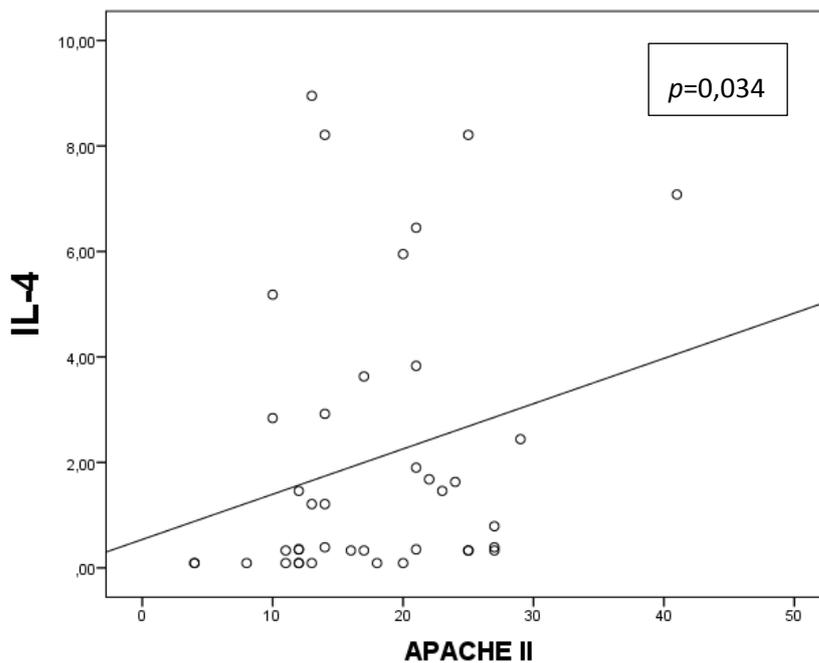


**Figura 26:** Coeficientes de correlación entre niveles de inmunoglobulinas y citoquinas. Se

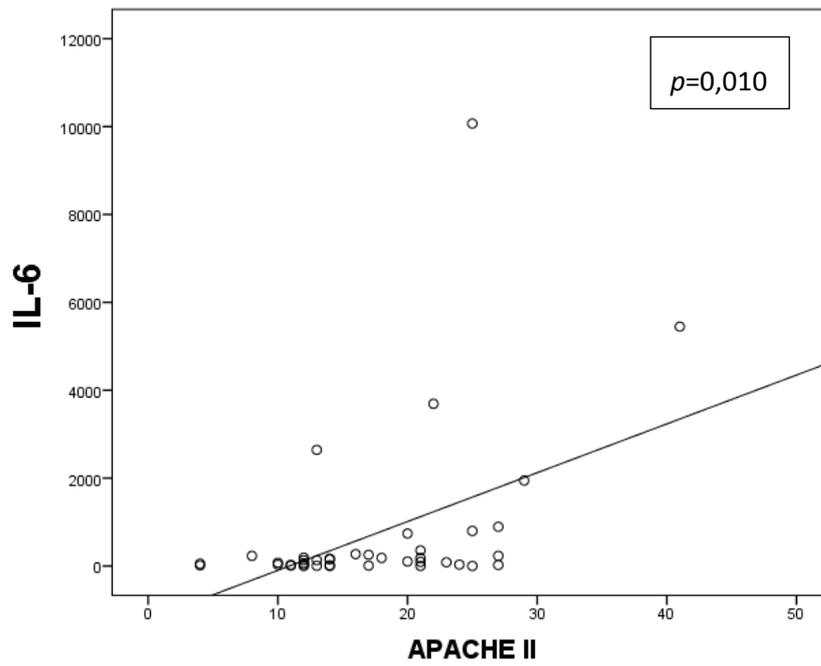
representan en color las correlaciones significativas ( $p < 0,005$ ), la barra de la derecha muestra la escala de color de los coeficientes de correlación. Los cuadros en gris representan correlaciones no significativas.

El estudio de citoquinas e inmunoglobulinas y su relación con la gravedad del paciente al ingreso mostró:

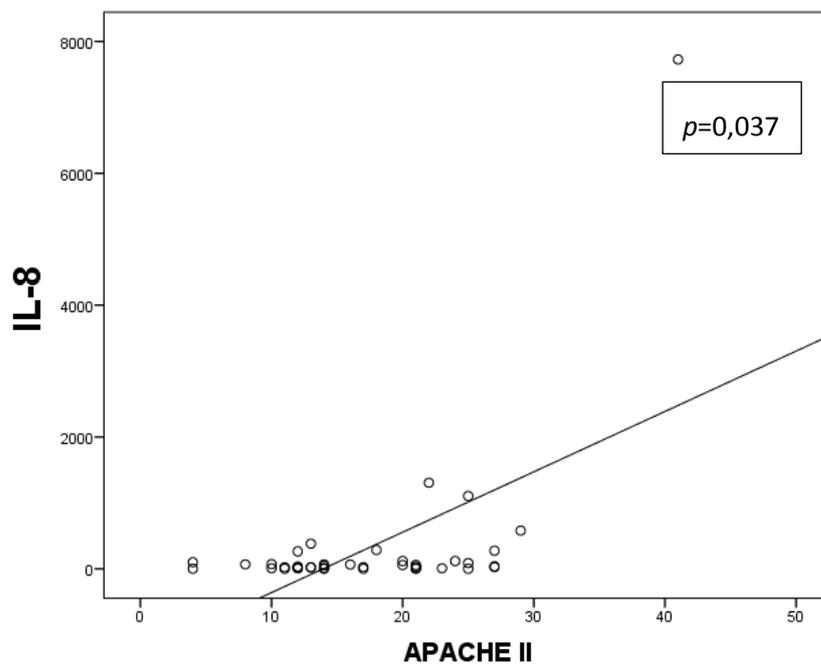
1. Correlación positiva entre APACHE II y citoquinas (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, GM-CSF, MIP-1 $\beta$ , y TNF- $\alpha$ ) (**Figura 27 a Figura 34**).
2. Correlación negativa entre APACHE II e IgM (**Figura 35**).



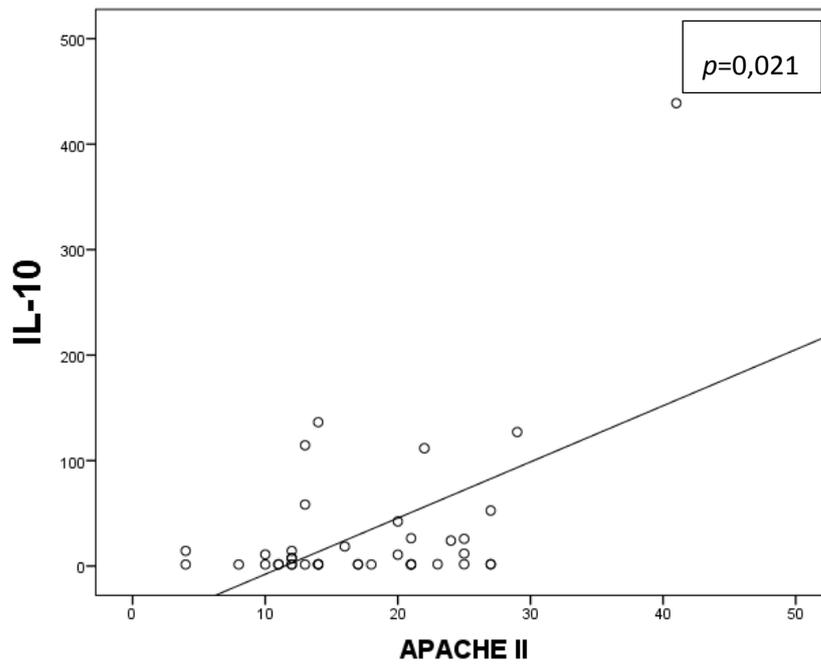
**Figura 27:** Representación gráfica de la correlación entre niveles de IL-4 y APACHE II.



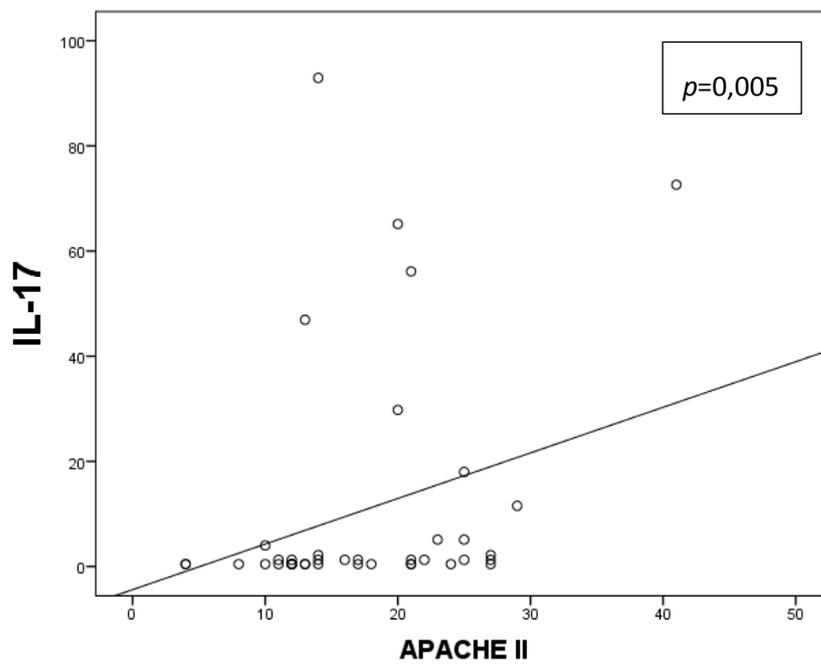
**Figura 28:** Representación gráfica de la correlación entre niveles de IL-6 y APACHE II.



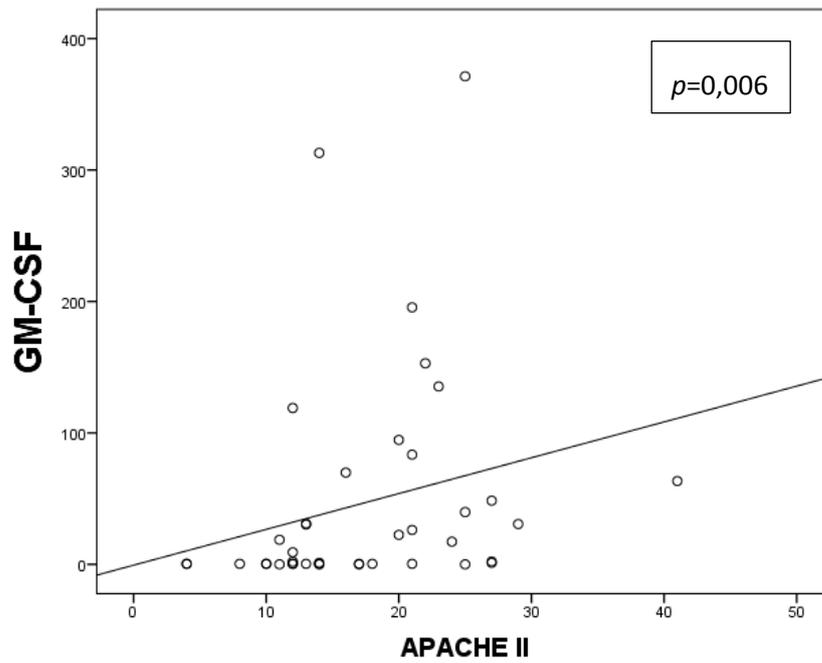
**Figura 29:** Representación gráfica de la correlación entre niveles de IL-8 y APACHE II.



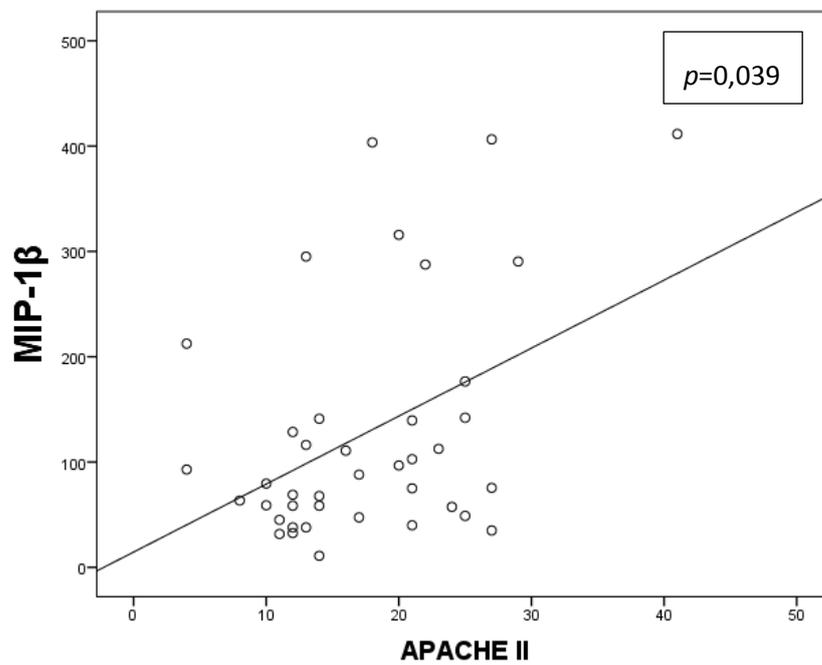
**Figura 30:** Representación gráfica de la correlación entre niveles de IL-10 y APACHE II.



**Figura 31:** Representación gráfica de la correlación entre niveles de IL-17 y APACHE II.



**Figura 32:** Representación gráfica de la correlación entre niveles de GM-CSF y APACHE II.



**Figura 33:** Representación gráfica de la correlación entre niveles de MIP-1 $\beta$  y APACHE II.

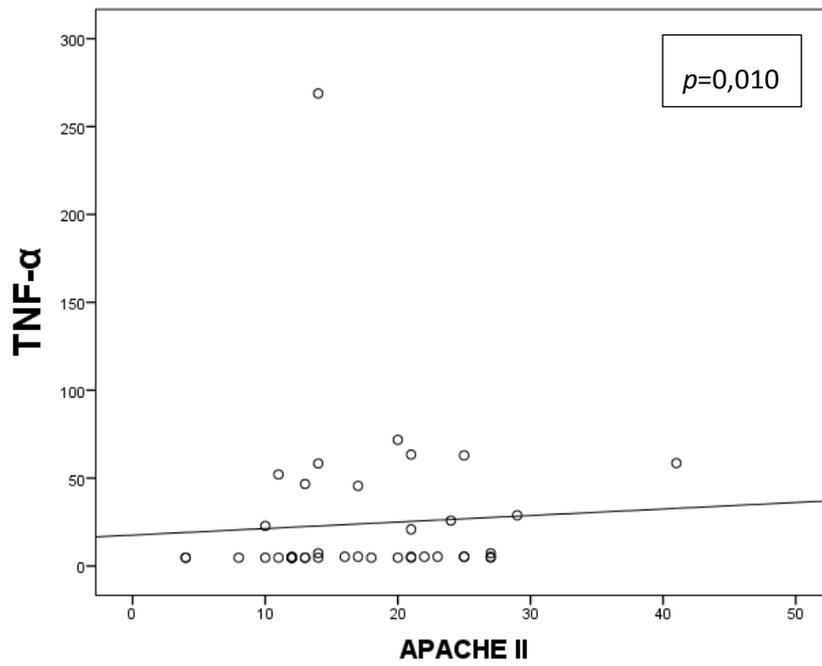


Figura 34: Representación gráfica de la correlación entre niveles de TNF- $\alpha$  y APACHE II.

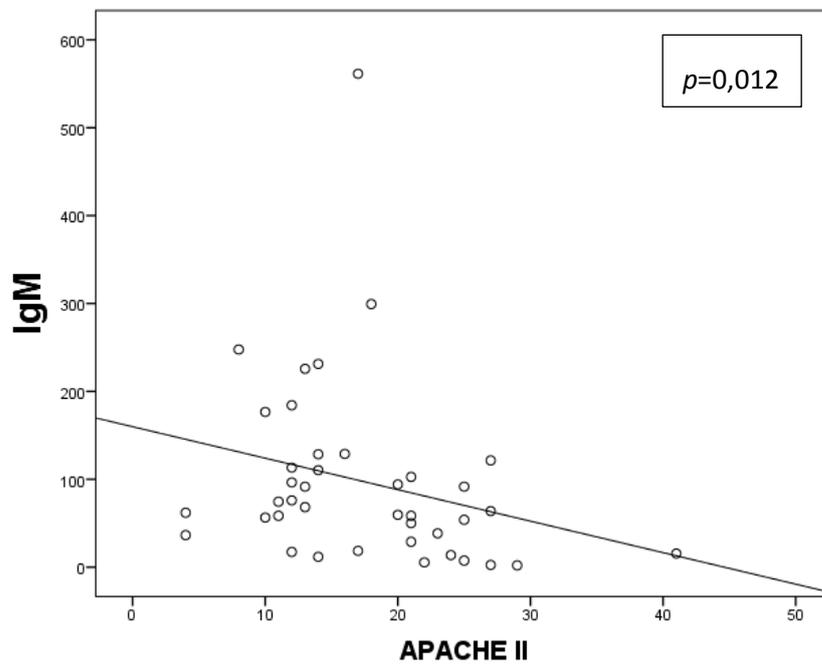


Figura 35: Representación gráfica de la correlación entre niveles de IgM y APACHE II.

---

## Análisis de mortalidad, supervivencia y AUROC.

### Regresión de Cox univariante.

Se realizó un análisis de mortalidad mediante regresión de Cox. La mortalidad se limitó a 28 días para excluir otras causas de mortalidad tardía no relacionadas con la neumonía.

Se analizaron las variables clínicas: [edad], [sexo], [obesidad], [diabetes], [hipertensión arterial], [inmunosupresión], [abuso de alcohol], [uso de drogas intravenosas], [fumador], [patología digestiva], [patología cardiovascular], [patología neurológica], [patología renal], [patología respiratoria], [infección bacteriana al ingreso en UCI], [infección bacteriana durante la estancia en UCI], así como las variables [VMI] (Ventilación mecánica invasiva), [VMNI] [Ventilación mecánica no invasiva] y [APACHE II] en el momento del ingreso en UCI. También se analizó la influencia del tratamiento recibido durante la estancia con [oseltamivir] o con [esteroides].

Solo se asociaron con mortalidad las variables inmunosupresión y APACHE II, mostrando ambas una relación positiva con la mortalidad. También se realizó dicho análisis para los niveles de inmunoglobulinas al ingreso. En el caso de las inmunoglobulinas los niveles se expresaron en logaritmo pues estas variables no seguían una distribución normal. Dentro de las inmunoglobulinas, tanto la IgG2 como la IgM mostraron una asociación con la mortalidad, pero en este caso asociación inversa (**Tabla 21**).

	HR [IC95%]	p
Edad	1,01 [0,975-1,046]	0,583
Sexo	1,194 [0,317-4,501]	0,794
Patología digestiva	1,146 [0,147-8,965]	0,897
Patología cardiovascular	2,013 [0,533-7,602]	0,302
Patología neurológica	0,043 [0-462,158]	0,507
Patología renal	0,045 [0-3494,486]	0,590
Patología respiratoria	0,562 [0,121-2,603]	0,462
Inmunosupresión	<b>9,112 [1,955-42,46]</b>	<b>0,005</b>
Diabetes	1,439 [0,31-6,67]	0,642
Hipertensión	0,482 [0,104-2,232]	0,350
Fumador	1,437 [0,438-4,714]	0,549
Abuso alcohol	1,018 [0,129-8,049]	0,986
Uso drogas i.v.	0,048 [0-333671,608]	0,705
Obesidad	0,719 [0,155-3,328]	0,673
<b>Infección bacteriana</b>		
Al ingreso en UCI	2,08 [0,608-7,123]	0,243
Durante la estancia	2,358 [0,719-7,733]	0,157
VMI	34,543 [0,138-8629,889]	0,209
VMNI	2,655 [0,776-9,082]	0,120
<b>Tratamiento en UCI</b>		
Oseltamivir	20,997 [0- >10 <sup>6</sup> ]	0,705
Esteroides	2,373 [0,694-8,111]	0,168
APACHE II	<b>1,16 [1,068-1,261]</b>	<b>&lt;0,001</b>
AST (U/L)	1 [0,999-1,002]	0,639
ALT (U/L)	1,001 [0,998-1,004]	0,400
Leucocitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	1 [1-1]	0,157
Neutrofilos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	1 [1-1]	0,474
IgG1	0,707 [0,363-1,377]	0,309
IgG2	<b>0,493 [0,3-0,81]</b>	<b>0,005</b>
IgG3	0,519 [0,179-1,507]	0,228
IgG4	0,777 [0,416-1,451]	0,429
IgM	<b>0,155 [0,057-0,427]</b>	<b>&lt;0,001</b>
IgA	0,704 [0,417-1,19]	0,190

Tabla 21: Regresión de Cox Univariante. HR: Hazard ratio. IC: Intervalo de confianza.

### Regresión de Cox multivariante

A continuación se realizó un análisis de regresión de Cox multivariante por el método *wald* incluyendo las 4 variables que resultaron significativas en el análisis univariante. El resultado mostró que APACHE II e IgM son las dos variables que mejor pronostican mortalidad (**Tabla 22**).

	HR	IC 95%		Valor <i>p</i>
		Inferior	Superior	
APACHE II	1,123	0,013	1,23	0,013
IgM (lg)	0,275	0,017	0,793	0,017

**Tabla 22:** Regresión de Cox multivariante. HR: Hazard ratio. IC: Intervalo de confianza.

### Análisis de supervivencia

Para complementar el análisis de la mortalidad se realizó un análisis de supervivencia de Kaplan Meier para las dos inmunoglobulinas que mostraron relación inversa con la mortalidad en el análisis univariante de Cox, la IgG2 y la IgM, con el objetivo de encontrar la concentración mínima de estas moléculas que mostraba un efecto protector en los pacientes.

Se calcularon todos los deciles de ambas inmunoglobulinas y se realizó el análisis de Kaplan Meier hasta encontrar el primer decil que mostraba diferencias significativas entre ambos grupos. En el caso de la IgG2, ese nivel fue de 59 mg/dl, que coincidía con el percentil 40 (**Figura 36**).

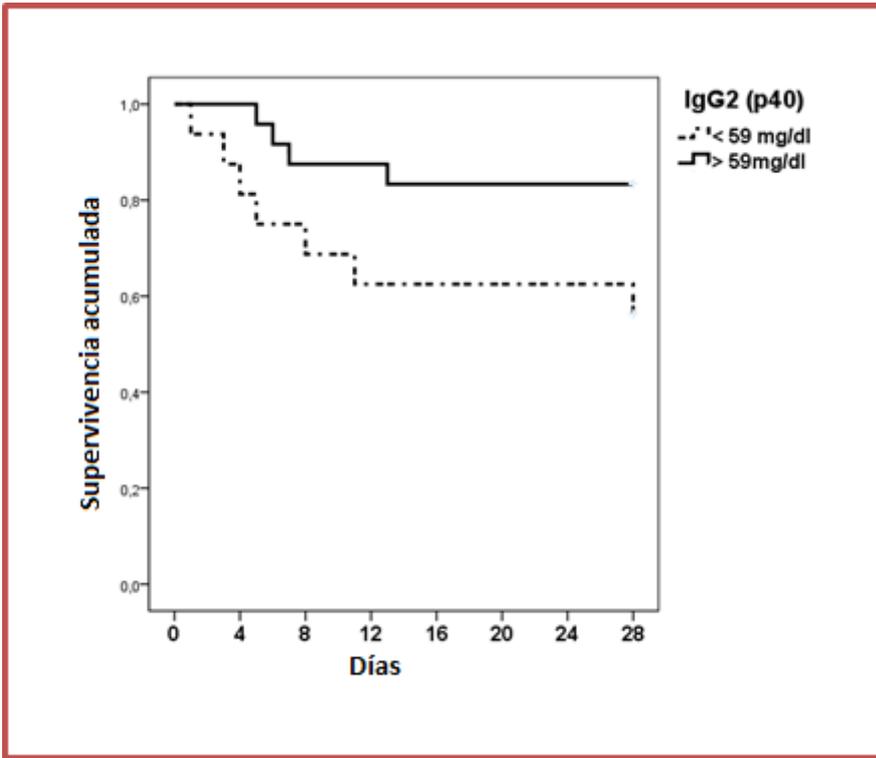


Figura 36: Curva de supervivencia de Kaplan Meier para la IgG2.

Para la IgM el nivel fue de 59 mg/dl (percentil 40) (Figura 37).

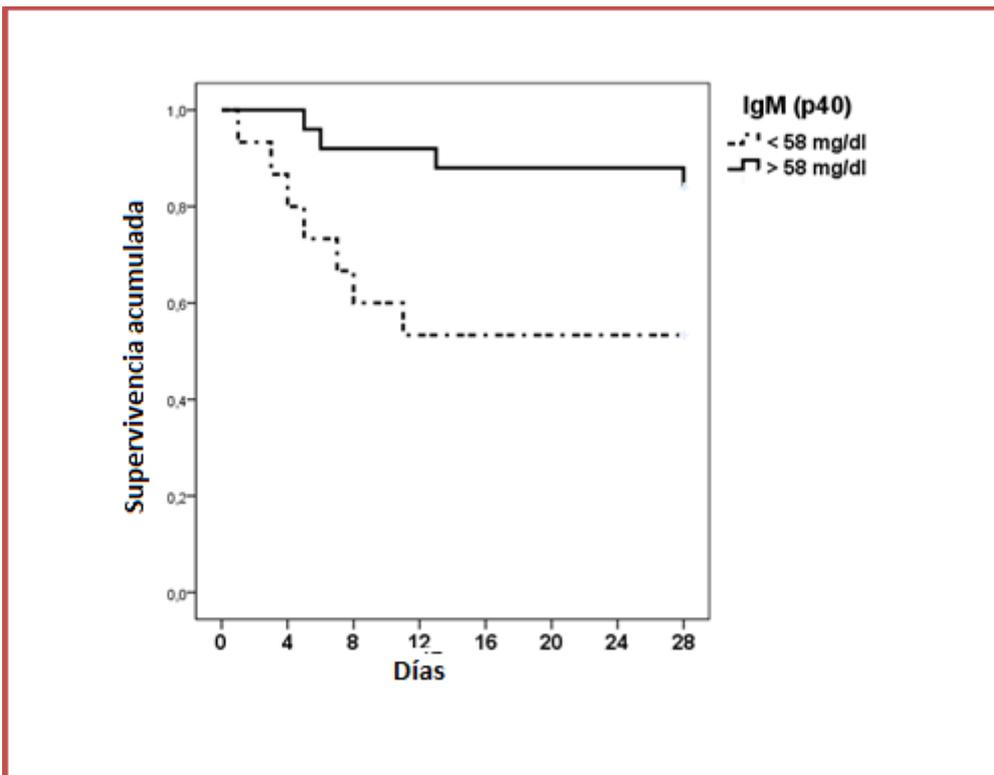
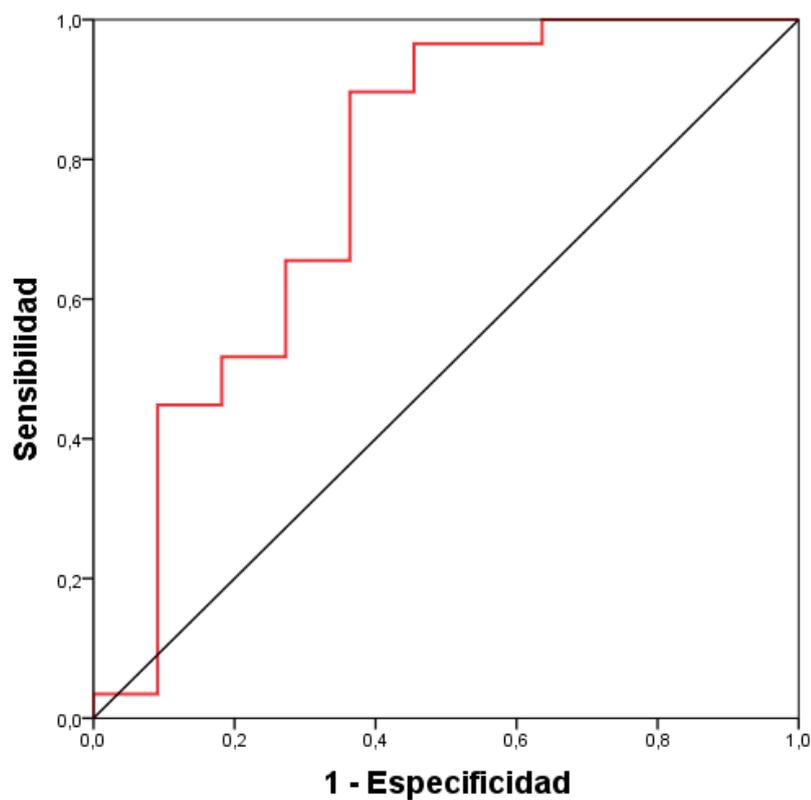


Figura 37: Curva de supervivencia de Kaplan Meier para la IgM.

### Área bajo la curva ROC.

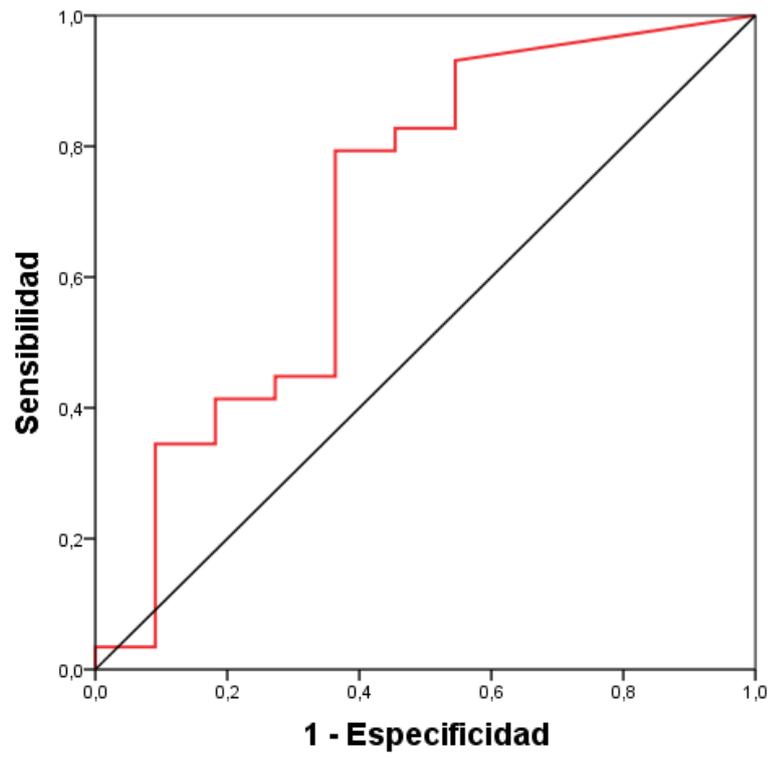
Para evaluar la capacidad discriminativa como test diagnóstico de mortalidad que presentan la IgM y la IgG2 se calculó el área bajo la curva ROC para ambas. La mortalidad se limitó a 28 días para excluir causas de mortalidad no relacionadas con la neumonía.

El área bajo la curva para la IgM fue 0,77 con un intervalo de confianza 95% de 0.58-0.96 (valor  $p=0.009$ ) (**Figura 38**).



**Figura 38:** Representación gráfica de AUROC para niveles de IgM.

En el caso de la IgG2 el área bajo la curva fue de 0,69 con un intervalo de confianza 95% de 0.49-0.90 (valor  $p=0.054$ ) (**Figura 39**), mostrando que los niveles de IgG2 a pesar de influir en el tiempo de supervivencia, como mostraba la curva de Kaplan Meier, serían subóptimos como test diagnóstico de mortalidad.



**Figura 39:** Representación gráfica de AUROC para niveles de IgG2.

## Estudio de los factores diferenciales entre neumonía por gripe o por otros virus

### Busqueda de factores diferenciales entre gripe y otros virus

Se estudiaron 20 pacientes admitidos en UCI con diagnóstico molecular de neumonía de etiología vírica no gripal. Para la búsqueda de factores diferenciales con neumonía grave gripal estos se compararon con 38 pacientes admitidos en UCI con diagnóstico de neumonía de etiología vírica gripal. Para realizar comparaciones de los niveles de citoquinas se incluyeron 15 controles sanos reclutados entre los trabajadores del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, de edad y sexo similares a los pacientes.

El grupo de pacientes con infección por virus respiratorios distintos al gripal se componía de 20 pacientes. La distribución de virus en este grupo se muestra en la **Tabla 23**.

Tipo de virus	N	Subtipo (N)
Entero/rinovirus	7	
Metapneumovirus	6	
VRS	5	
		VRS A (2)
		VRS B (2)
		VRS no subtipado (1)
Coronavirus NL63	1	
Herpesvirus	1	
Total	20	

**Tabla 23:** Relación de virus no gripales diagnosticados.

El primer paso fue analizar las características de los pacientes con NAC grave por otros virus, tanto clínicas, comorbilidades, necesidad de ventilación, parámetros de laboratorio, etc., las cuales se muestran en la **Tabla 24**.

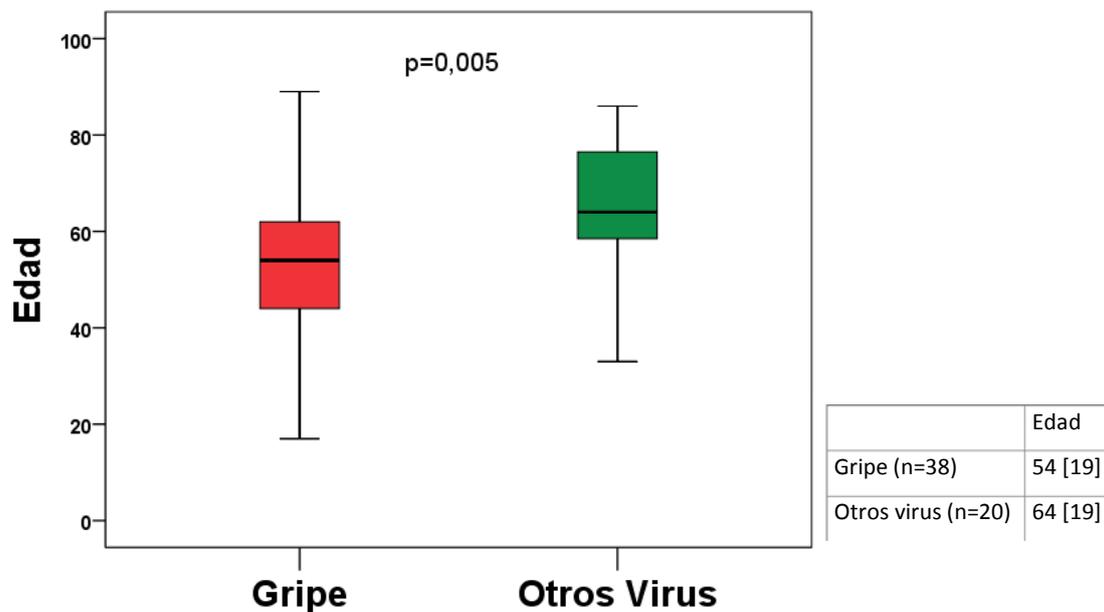
Características de los pacientes	
Edad	64 [19]
Sexo	
Femenino	9 (45)
Masculino	11 (55)
Comorbilidades	18 (90)
Patología digestiva	5 (25)
Patología cardiovascular	8 (40)
Patología neurológica	1 (5)
Patología renal	1 (5)
Patología respiratoria	11 (55)
Inmunosupresión	5 (25)
Diabetes	4 (20)
Hipertensión	12 (60)
Fumador	9 (45)
Abuso alcohol	1 (5)
Uso drogas i.v.	0 (0)
Obesidad	1 (5)
Infección bacteriana al ingreso	3 (15)
Infección bacteriana durante ingreso	5 (25)
VMI	10 (50)
VMNI	7 (35)
APACHE II	18 [10]
Tto antibiótico en UCI	20 (100)
Tto esteroides en UCI	11 (55)
Oseltamivir	7 (35)
Fallecidos	3 (15)
Creatinina (mg/dl)	1,16 [1]
AST (U/L)	32 [29]
ALT (U/L)	24 [18]
Leucocitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	17,3 [10,8]
Neutrófilos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	15,7 [9,7]

**Tabla 24:** Características clínicas y analíticas de los pacientes: Las variables continuas se expresan como mediana [rango intercuartil] y las categóricas como n (%).

De los 20 pacientes con infección por otros virus recibieron tratamiento con oseltamivir 7 pacientes: 5 infectados por metapneumovirus, 1 por Entero/rinovirus y 1 por VRS.

Una vez determinadas las características de los pacientes se procedió a la búsqueda de diferencias con un grupo de pacientes con infección por gripe.

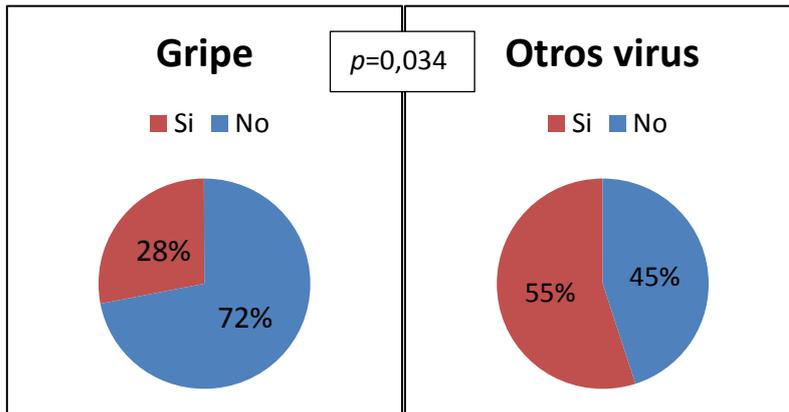
La primera diferencia hallada fue la edad. Los pacientes infectados por otros virus eran significativamente mayores que los infectados por gripe (**Figura 40**).



**Figura 40:** Izda.: Representación gráfica de la edad de pacientes infectados por gripe u otros virus. Dcha.: Edad expresada en mediana [rango intercuartil].

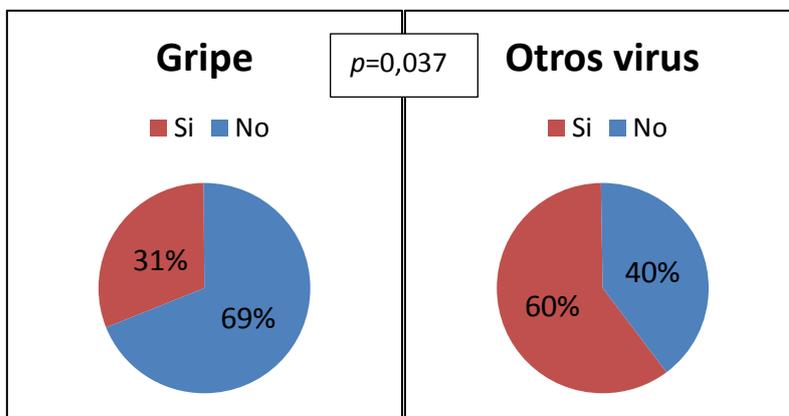
El estudio de las comorbilidades reveló diferencias a nivel de patología respiratoria e hipertensión arterial, ambas más frecuentes en los pacientes infectados por otros virus (**Figura 41** y **Figura 42**). Los pacientes con infección gripal requirieron más frecuentemente ventilación mecánica invasiva ( 76% vs. 50%,  $p= 0,047$ )(**Figura 43**). Los valores de laboratorio analizados fueron similares para ambos grupos.

Patología respiratoria:



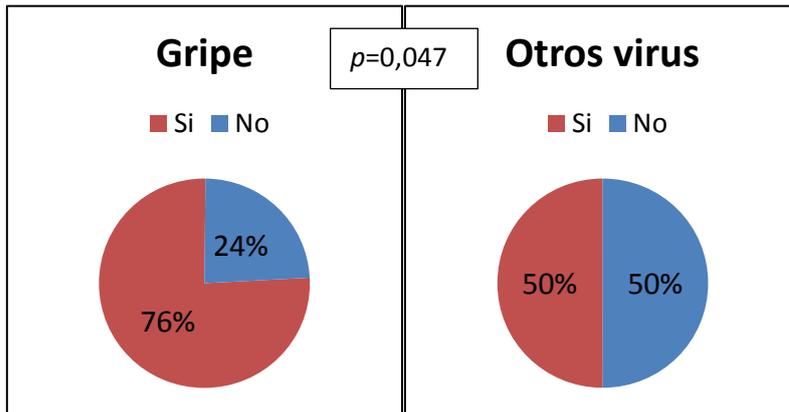
**Figura 41:** Representación gráfica del porcentaje de pacientes que sufrían patología respiratoria.

Hipertensión:



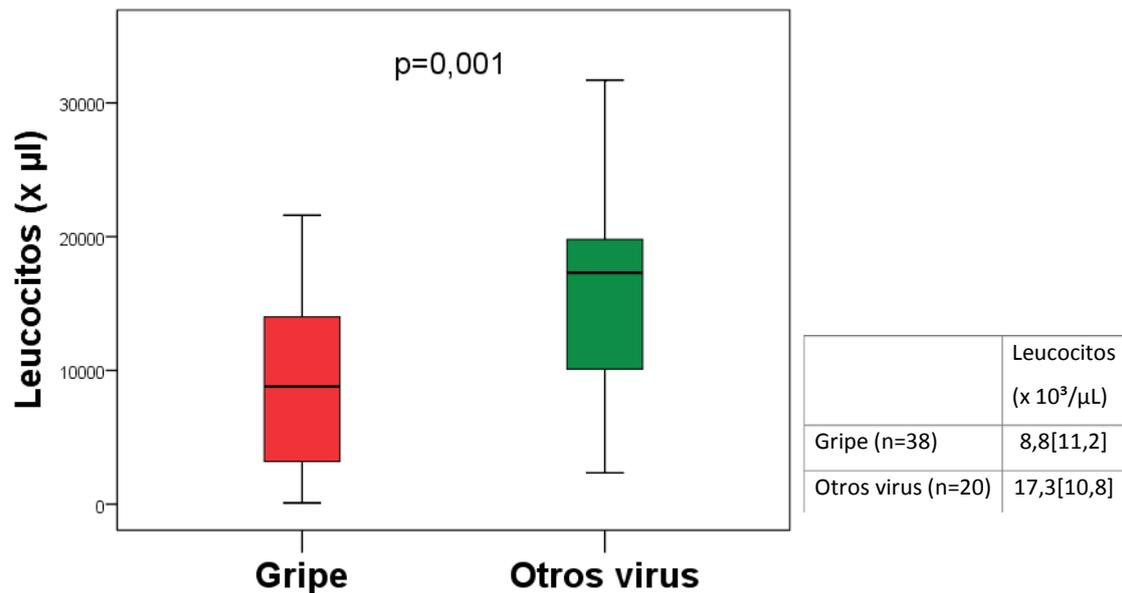
**Figura 42:** Representación gráfica del porcentaje de pacientes con hipertensión.

Ventilación mecánica invasiva:

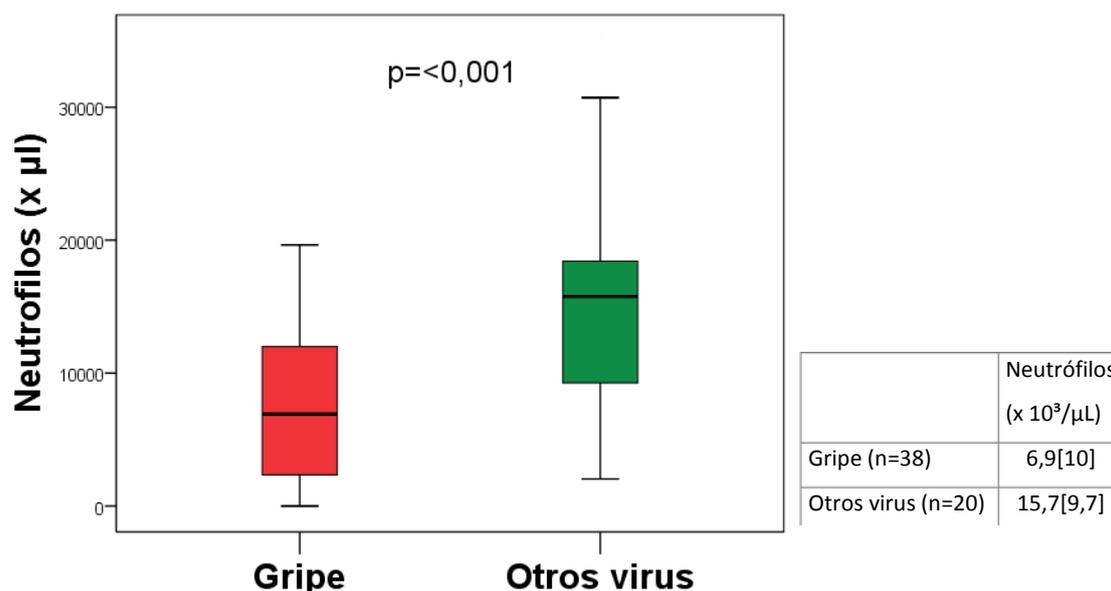


**Figura 43:** Representación gráfica del porcentaje de pacientes que requirieron VMI durante la estancia en UCI.

El estudio de la fórmula blanca reveló niveles de leucocitos y neutrofilos significativamente superiores en los pacientes con infección por otros virus (**Figura 44** y **Figura 45**).



**Figura 44:** Izda.: Representación gráfica de los niveles de leucocitos en pacientes infectados por gripe u otros virus. Dcha.: Niveles de leucocitos expresados en mediana [rango intercuartil].



**Figura 45:** Izda.: Representación gráfica de los niveles de neutrófilos en pacientes infectados por gripe u otros virus. Dcha.: Niveles de leucocitos expresados en mediana [rango intercuartil].

## Perfiles de citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento en plasma

Se compararon los niveles de distintos mediadores inmunológicos entre los grupos de pacientes infectados por gripe, otros virus y el grupo de controles sanos. En la **Tabla 25** se detalla la mediana y rango intercuartil de todos los grupos de pacientes para cada uno de los mediadores analizados, así como los niveles de significación para las comparaciones inter-grupos.

Los pacientes infectados por otros virus presentaron niveles MCP-1 y MIP-1 $\beta$  inferiores a los pacientes infectados por gripe. No se encontraron más diferencias entre estos dos grupos de pacientes (en la tabla se observan diferencias estadísticas en los niveles de IL-12 pero esta diferencia no es relevante desde el punto de vista fisiológico).

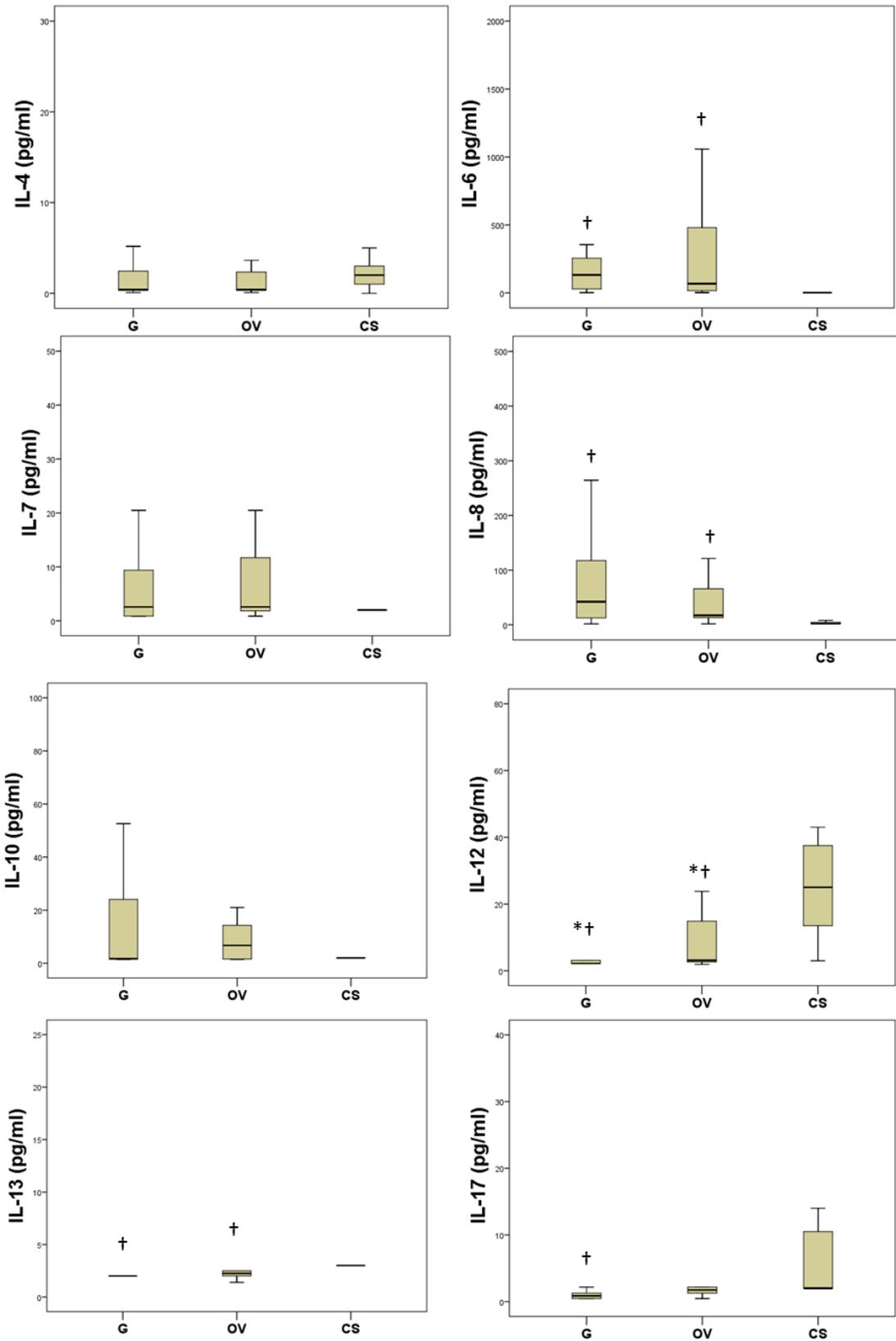
En cuanto a la comparación entre pacientes infectados por otros virus y controles sanos los pacientes presentaron niveles superiores de IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF y MCP-1. Mientras que los niveles de IL-12 e INF- $\gamma$  fueron inferiores a los de los controles sanos.

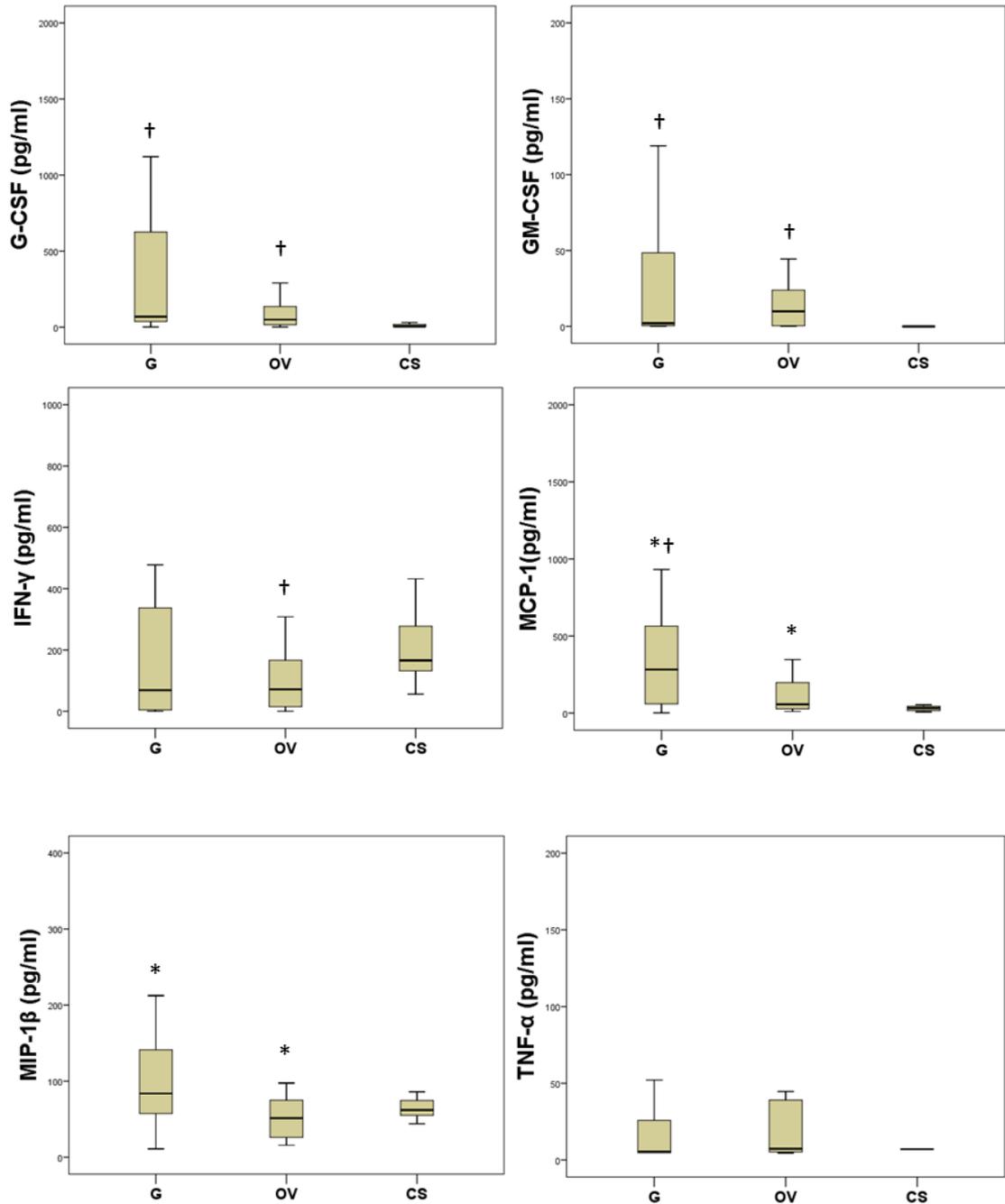
Las diferencias entre grupos para los niveles de IL-13 e IL-17 pese a ser estadísticamente significativos no presentan relevancia fisiológica.

	Gripe	OV	CS	Gripe vs OV	Gripe vs CS	OV vs CS
<b>IL-4</b>	0,4 [2,2]	0,4 [2,0]	2,0 [2,0]	n.s.	n.s.	n.s.
<b>IL-6</b>	132,0 [232,0]	67,6 [517,4]	2,0 [0,0]	n.s.	<0.001	<0.001
<b>IL-7</b>	2,6 [9,4]	2,6 [9,9]	2,0 [0,0]	n.s.	n.s.	n.s.
<b>IL-8</b>	42,2 [105,3]	17,2 [70,2]	2,0 [3,8]	n.s.	<0.001	<0.001
<b>IL-10</b>	1,7 [23,0]	6,7 [13,6]	2,0 [0,0]	n.s.	n.s.	n.s.
<b>IL-12</b>	2,2 [0,9]	3,1 [12,5]	24,0 [25,5]	0.015	<0.001	0.016
<b>IL-13</b>	2,0 [0,0]	2,2 [0,5]	3,0 [0,0]	n.s.	<0.001	<0.001
<b>IL-17</b>	1,3 [3,8]	1,7 [0,9]	2,0 [10,2]	n.s.	0,005	n.s.
<b>G-CSF</b>	68,9 [592,6]	50,1 [126,1]	5,0 [16,5]	n.s.	<0.001	0.001
<b>GM-CSF</b>	2,1 [53,4]	9,9 [23,5]	0,0 [0,0]	n.s.	<0.001	<0.001
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	69,0 [332,9]	71,8 [178,4]	166,0 [216,0]	n.s.	n.s.	0.021
<b>MCP-1</b>	282,6 [521,0]	56,7 [203,1]	26,0 [29,5]	0.021	<0.001	0.042
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	83,8 [86,1]	51,4 [49,8]	63,5 [29,8]	0.007	n.s.	n.s.
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	5,3 [21,9]	7,3 [34,4]	7,0 [0,0]	n.s.	n.s.	n.s.

**Tabla 25:** Niveles de mediadores en los grupos de pacientes. OV: otros virus. CS: Controles sanos. Mediana expresada en pg/ml y [rango intercuartil]. Niveles de significación para comparaciones intergrupos  $p < 0,05$ ; n.s: no significativo.

En la **Figura 46** se representan los niveles de los mediadores (mediana, rango intercuartil).





**Figura 46:** Representación de los niveles de citoquinas en pacientes infectados por virus de la gripe (G), otros virus (OV) y controles sanos (CS). †: Diferencias estadísticamente significativas frente a los controles sanos. \*: Diferencias estadísticamente significativas entre gripe y otros virus.

### **Estudio de la producción coordinada de citoquinas en pacientes con otros virus.**

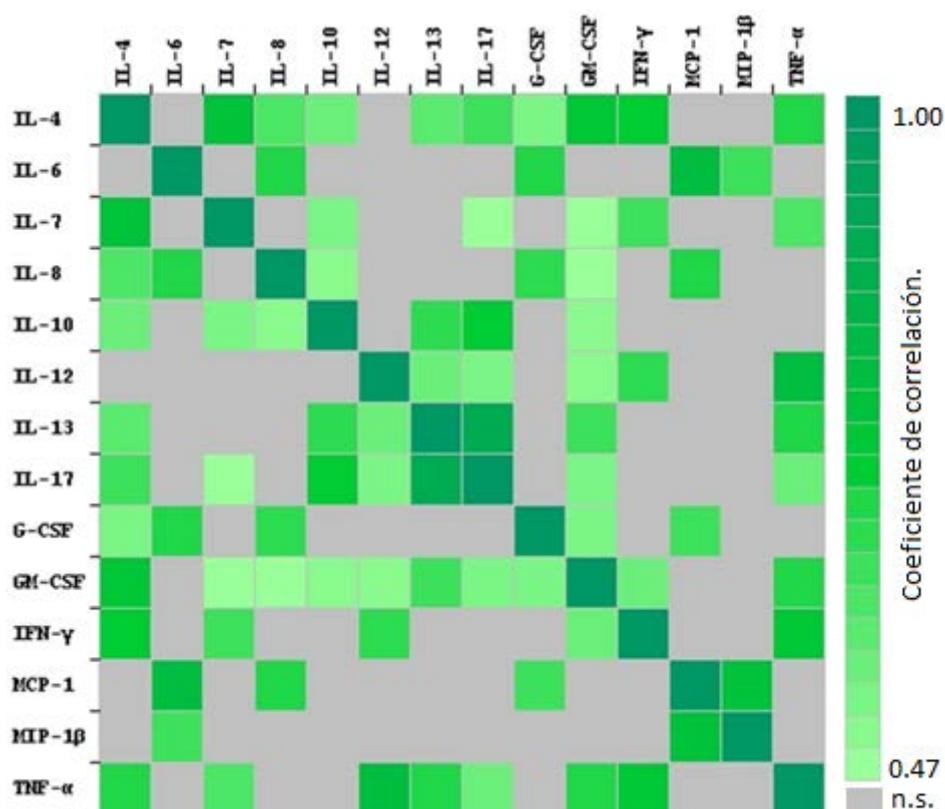
En la **Tabla 26** se muestran los niveles de significación estadística de las correlaciones entre citoquinas.

Los niveles de la mayoría de las citoquinas correlacionaron de forma positiva entre ellas, con la excepción de IL-12, que correlacionó negativamente con: IL-6, IL-8, G-CSF, MCP-1 y MIP-1 $\beta$ ; y MIP-1 $\beta$  que correlacionó negativamente TNF- $\alpha$ , aunque ninguna de estas correlaciones negativas resultó significativa.

Las correlaciones significativas se muestran en la **Figura 47**, todas son de signo positivo. (Test Spearman,  $p < 0,05$ ). Las citoquinas que mostraron un mayor número correlaciones fueron la IL-4 y la GM-CSF.

	IL-4	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12	IL-13	IL-17	G-CSF	GM-CSF	IFN- $\gamma$	MCP-1	MIP-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
IL-4	.	0,061	<0,001	0,004	0,010	0,085	0,008	0,003	0,015	<0,001	<0,001	0,054	0,259	0,001
IL-6	0,061	.	0,975	0,001	0,094	0,654	0,401	0,218	0,001	0,062	0,486	<0,001	0,002	0,745
IL-7	<0,001	0,975	.	0,065	0,015	0,066	0,051	0,033	0,209	0,037	0,002	0,451	0,756	0,004
IL-8	0,004	0,001	0,065	.	0,022	0,721	0,465	0,136	0,001	0,039	0,266	0,001	0,060	0,467
IL-10	0,010	0,094	0,015	0,022	.	0,268	0,002	<0,001	0,177	0,026	0,421	0,544	0,672	0,057
IL-12	0,085	0,654	0,066	0,721	0,268	.	0,009	0,015	0,893	0,027	0,001	0,749	0,389	<0,001
IL-13	0,008	0,401	0,051	0,465	0,002	0,009	.	<0,001	0,534	0,003	0,228	0,696	0,948	0,001
IL-17	0,003	0,218	0,033	0,136	<0,001	0,015	<0,001	.	0,531	0,014	0,219	0,473	0,753	0,009
G-CSF	0,015	0,001	0,209	0,001	0,177	0,893	0,534	0,531	.	0,019	0,229	0,003	0,115	0,457
GM-CSF	<0,001	0,062	0,037	0,039	0,026	0,027	0,003	0,014	0,019	.	0,012	0,116	0,774	0,001
IFN- $\gamma$	<0,001	0,486	0,002	0,266	0,421	0,001	0,228	0,219	0,229	0,012	.	0,204	0,563	<0,001
MCP-1	0,054	<0,001	0,451	0,001	0,544	0,749	0,696	0,473	0,003	0,116	0,204	.	<0,001	0,774
MIP-1 $\beta$	0,259	0,002	0,756	0,060	0,672	0,389	0,948	0,753	0,115	0,774	0,563	<0,001	.	0,784
TNF- $\alpha$	0,001	0,745	0,004	0,467	0,057	<0,001	0,001	0,009	0,457	0,001	<0,001	0,774	0,784	.

**Tabla 26:** Cuadro de correlación de niveles de significación entre los valores de citoquinas.



**Figura 47:** Representación gráfica de los coeficientes de correlación entre los niveles de citoquinas. Se representan en color las correlaciones significativas ( $p < 0,005$ ), la barra de la derecha muestra la escala de color de los coeficientes de correlación. Los cuadros en gris representan correlaciones no significativas.

## Perfiles de Inmunoglobulinas en plasma

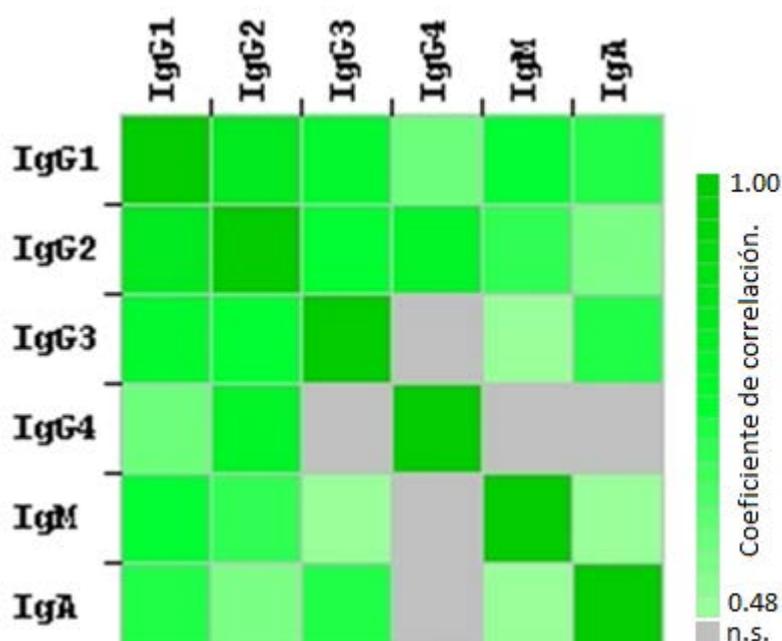
Se midieron 4 isotipos de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE, y dentro de la IgG, sus 4 subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Los niveles de IgE no fueron detectables en plasma.

Los niveles de inmunoglobulinas fueron superiores en el grupo de pacientes infectados por otros virus, excepto para la IgG1, pero la diferencia entre grupos solo fue significativa en el caso de la IgA (U de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). Los niveles de IgG2 estaban por debajo de los valores normales en ambos grupos (VN 133-622 mg/dL) (Tabla 27).

Niveles de inmunoglobulinas	Total (n=58)	Gripe (n=38)	Otros virus (n=20)	Valor <i>p</i>
IgG1	787,0 [869,2]	807,8 [964,8]	734,5 [880,8]	n.s.
IgG2	68,0 [127,2]	64,8 [118,1]	89,0 [131,0]	n.s.
IgG3	111,3 [154,6]	102,5 [165]	120,6 [154,3]	n.s.
IgG4	29,5 [71,5]	26,3 [74,5]	33,8 [76,3]	n.s.
IgM	71,4 [73,1]	66,0 [80,7]	79,4 [58,6]	n.s.
IgA	145,3 [125,2]	133,9 [98,8]	212,1 [308,9]	0,008

**Tabla 27:** Niveles de inmunoglobulinas (en mg/dL) en pacientes con infección por gripe u otros virus.

Se estudió la correlación entre niveles de inmunoglobulinas observándose correlación positiva entre todas ellas (Test de Spearman,  $p < 0,05$ ), excepto entre IgG4 con IgG3, IgM e IgA (**Figura 48**).



**Figura 48:** Representación gráfica de los coeficientes de correlación entre los niveles de inmunoglobulinas en pacientes infectados por otros virus. La barra de la derecha representa los coeficientes de correlación en colores. Los cuadros en gris representan correlaciones no significativas.

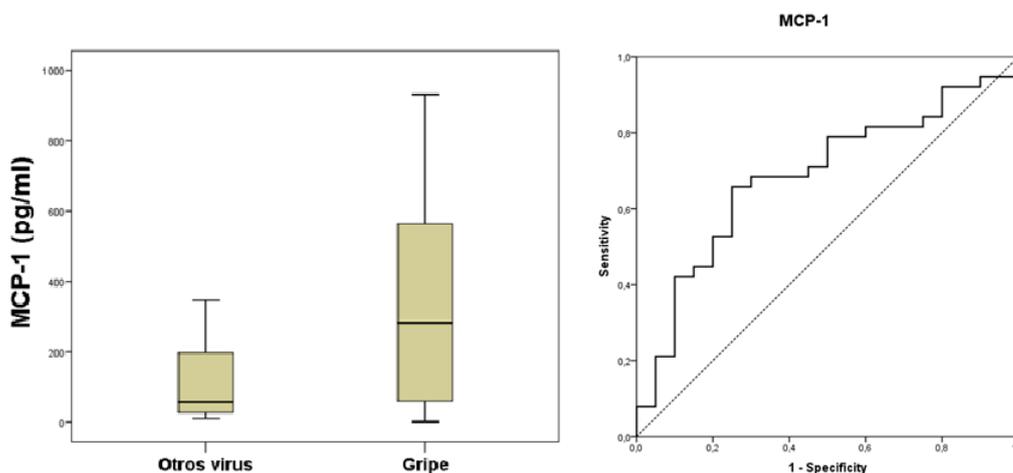
## Factores diferenciales entre gripe y otros virus

Se realizó una búsqueda de mediadores inmunológicos que permitieran distinguir entre pacientes infectados por gripe y pacientes infectados por otros virus. Con ese objetivo se calculó el área bajo la curva de los mediadores que presentaban diferencias entre ambos grupos: MCP-1, MIP-1 $\beta$  e IgA.

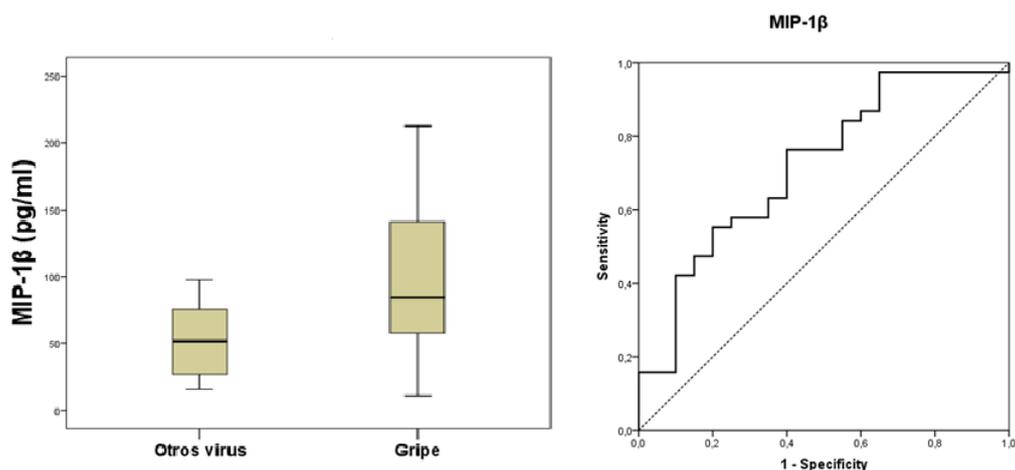
El área bajo la curva fue de 0.68 ( $p = 0.021$ ) para la MCP-1 (Tabla 28 y Figura 49), 0.71 ( $p = 0.007$ ) para MIP-1 $\beta$  (Tabla 28 y Figura 50) y 0.71 ( $p = 0.008$ ) para la IgA (Tabla 28 y Figura 51). En el caso de MCP-1 y MIP-1 $\beta$  se ha utilizado la curva AUROC predictora de diagnóstico de gripe, y en el caso de la IgA la curva AUROC predictora de diagnóstico de otros virus.

Mediador	Area	IC 95%	Valor $p$
<b>MCP-1</b>	0,686	0,544 - 0,827	0,021
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	0,718	0,579 - 0,858	0,007
<b>IgA</b>	0,714	0,565 - 0,864	0,008

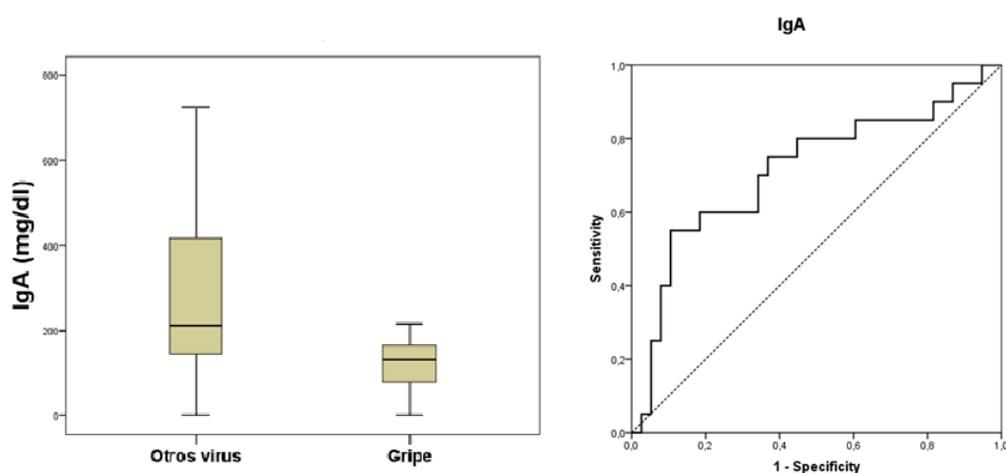
**Tabla 28:** Área bajo la curva ROC para MCP-1, MIP-1 $\beta$  e IgA. (IC: Intervalo de confianza)



**Figura 49:** A la izquierda representación gráfica de los niveles de MCP-1 en pacientes según agente etiológico. A la derecha representación gráfica de la curva ROC de diagnóstico de gripe para MCP-1.



**Figura 50:** A la izquierda representación gráfica de los niveles de MIP-1 $\beta$  en pacientes según agente etiológico. A la derecha representación gráfica de la curva ROC de diagnóstico de gripe para MIP-1 $\beta$ .



**Figura 51:** A la izquierda representación gráfica de los niveles de IgA en pacientes según agente etiológico. A la derecha representación gráfica de la curva ROC de diagnóstico de otros virus para IgA.

De los tres mediadores analizados, MCP-1 mostró el menor valor de área bajo la curva, por lo que sería el peor predictor de etiología gripal. MIP-1 $\beta$  e IgA mostraron un área bajo la curva similar, alcanzando en este caso un valor que puede considerarse adecuado para su uso como predictores de etiología gripal o no gripal en la neumonía grave.



*Discusión*

---



---

## Discusión

---

La NAC es una de las enfermedades más prevalentes en adultos afectando a 5-20 personas por 1.000 habitantes año, de las cuales el 20 al 40% requirieron ingreso hospitalario (77). Es la enfermedad infecciosa con mayor tasa de mortalidad en ancianos en países desarrollados (18). Desde que se comenzaron a usar técnicas de biología molecular en el diagnóstico microbiológico, la etiología vírica ha cobrado más peso en esta entidad, llegando al 30% de los diagnósticos (161) y aumentando el abanico de virus de importancia en esta patología, que históricamente se reducía básicamente a la gripe.

En España la NAC que requiere hospitalización supone un coste de más de 100 millones de euros anuales (162). Los costes de la estancia hospitalaria son significativamente superiores en los pacientes graves (163,164).

La gravedad de la neumonía depende del agente patógeno y también de factores del huésped, y muy especialmente del estado inmunológico de éste. El presente trabajo trata de aumentar nuestros conocimientos acerca de los factores del huésped, tanto clínicos como inmunológicos, que influyen en la gravedad y mortalidad de esta enfermedad, con objeto de buscar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de estos pacientes.

El uso de la monitorización inmunológica se está planteando en otras patologías graves como la sepsis, como una herramienta que permita prevenir la enfermedad, guiar el tratamiento, y en consecuencia disminuir la morbilidad y la mortalidad asociadas a la misma (165).

Como se ha mencionado previamente la etiología vírica, no solo se restringe al virus gripal. El campo de neumonías producidas por otros virus distintos a éste adolece de falta de información. En este trabajo se ha estudiado también la NAC causada por otros virus, buscando características exclusivas en estos pacientes, así como factores diferenciales entre ambas etiologías (gripe y otros virus) que permitan un mejor abordaje clínico.

## Estudio de las características demográficas, clínicas y analíticas

### Datos demográficos

Una de las características más llamativas observadas en los pacientes con gripe en este trabajo, es que los pacientes graves infectados por el virus A/H1N1pdm09 en la temporada postpandémica presentaron mayor edad media que los pacientes graves infectados por dicho virus durante la temporada pandémica 2009/2010 (166,167). Otras series han objetivado este aumento en la edad de los pacientes infectados por gripe durante la temporada postpandémica en Grecia (168), Inglaterra(169), China (170), Holanda (171) o Taiwan (172), lo que acerca el patrón de edad de la temporada postpandémica al observado en las epidemias gripales estacionales. Este fenómeno que sucede tras una pandemia se denomina estacionalización del virus de la gripe y ha sido descrito en el subtipo H3 en relación con la mortalidad (173).

Existen series en las cuales la edad aparece como un factor de riesgo en cuanto a la mortalidad por neumonía vírica ya sea por gripe (174) u otros virus (175), sin embargo no hemos observado este efecto en nuestra cohorte posiblemente debido a que la edad media de los pacientes era elevada en todos ellos.

Aunque la edad no fue un factor diferencial en cuanto a la mortalidad, sí que se observaron diferencias en cuanto al tipo de virus causante de la infección. Los pacientes infectados por el virus pandémico fueron más jóvenes que los pacientes con infección por otros virus, siendo una de las pocas características diferenciales observadas entre estos dos grupos de pacientes. Chan *et al.* compararon un grupo de pacientes hospitalizados por gripe y otro por otros virus, aunque no calcularon la edad media, el porcentaje de pacientes mayores de 60 años fue el doble en el grupo de pacientes con otros virus (176), lo cual está de acuerdo con nuestros datos.

En cuanto a la distribución por sexo de la población estudiada, el porcentaje de varones y mujeres afectados fue similar, lo que concuerda con el patrón habitual de la infección causada por el virus gripal (171,177–179) y por otros virus (180). El sexo no aparece como un factor de riesgo diferencial para la mortalidad en nuestro estudio coincidiendo con lo publicado por otros autores (174), ni para la infección con virus distintos al gripal. Podemos por tanto

concluir a partir de los resultados demográficos de este trabajo que en la temporada postpandémica 2010-2011, la edad media de los pacientes con neumonía gripal grave se elevó respecto a la temporada pandémica de, acercándose a la del patrón estacional de gripe, aunque fue inferior a la edad media de los pacientes con neumonía grave por otros virus.

### **Factores de riesgo**

El porcentaje de pacientes con patologías médicas previas incluyendo: patología renal, respiratoria, digestiva, cardiovascular, neurológica, autoinmune, hematológica, así como presencia de diabetes, hipertensión arterial, o inmunosupresión, fue elevado tanto en los pacientes con infección por gripe como en los pacientes con infección por otros virus. Este alto porcentaje de comorbilidades coincide con lo publicado en numerosas series clínicas (161,181,166,182–185).

La comorbilidad más frecuente entre los pacientes fallecidos por gripe fue la presencia de inmunosupresión. Esta condición no mostró ser una variable independientemente asociada con la mortalidad en nuestro análisis, pero otros autores sí que han encontrado esta relación (186). Además aunque la inmunosupresión no se mostró directamente asociada con la mortalidad, sí que se observó esta relación de manera indirecta, en forma de niveles disminuidos de IgM.

Una de las principales poblaciones de riesgo descrita durante la temporada pandémica fue la de pacientes obesos, los cuales presentaban mayor riesgo de complicaciones graves (179,185,187,188). También durante la postpandemia se describió un alto porcentaje de pacientes obesos entre los que sufrieron neumonía gripal (170,189). En nuestro estudio la obesidad no aparece como factor asociado a mayor mortalidad por gripe, aunque la proporción de pacientes obesos de este estudio está por encima de la proporción española de adultos con obesidad, la cual se sitúa en el 13.6% (190).

Es muy llamativo el hecho de que todos los pacientes fallecidos con gripe requirieron ventilación mecánica invasiva (VMI), probablemente debido a la elevada gravedad que presentaban al ingreso. Sin embargo la frecuencia de pacientes con VMI entre los supervivientes con gripe fue similar a la observada en los pacientes infectados por otros virus.

Otros estudios muestran ratios elevados de ventilación mecánica durante la temporada pandémica (167,181) y postpandémica (52,168).

Posiblemente debido al elevado porcentaje de pacientes que requirieron VMI (incluyendo el total de los pacientes fallecidos por gripe), el análisis de mortalidad no reveló que la VMI jugara un papel como variable relacionada con el fallecimiento de los pacientes.

La herramienta utilizada para medir la gravedad de los pacientes al ingreso fue el APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*), que valora condiciones del paciente tales como temperatura, presión arterial media, frecuencia respiratoria y diversos valores analíticos como iones o hematocrito. Así una mayor puntuación se asocia con mayor mortalidad (191). Los pacientes fallecidos por gripe en este trabajo presentaron de media una puntuación APACHE II mayor de 20, el cual según la bibliografía predice más de un 40% de mortalidad (191). Los pacientes supervivientes presentaron una puntuación significativamente más baja, que acorde con la bibliografía predice una mortalidad alrededor del 15% (191). Previamente, en diversos estudios realizados durante la pandemia de 2009, el APACHE II demostró ser un buen predictor de mortalidad en esta patología (181,192,193).

Además de usar el APACHE II como predictor de mortalidad, en esta tesis se analizó si existirían diferencias en el APACHE II según el agente etiológico, dado que los pacientes con NAC gripal presentaron una mortalidad muy superior a los pacientes con NAC por otros virus. Desafortunadamente no se observaron diferencias, por lo que aunque el APACHE II sea un gran predictor de mortalidad no es un parámetro de utilidad en la discriminación del agente etiológico causante de la neumonía.

Se observó que los pacientes con infección por otros virus mostraron mayor prevalencia de enfermedad respiratoria previa que los pacientes con gripe, así como de hipertensión arterial. La hipertensión ha sido descrita como una de las comorbilidades más frecuentes en pacientes con neumonía gripal (194) y como un factor asociado a mortalidad durante la temporada pandémica (174,195).

Los pacientes con infección por otros virus presentaban mayor porcentaje de comorbilidades y como se ha mencionado previamente, mayor edad que los pacientes con infección por gripe, lo que sugiere que los virus respiratorios distintos al gripal requieren unas condiciones específicas en el hospedador para producir NAC grave, en forma de un estado basal más

deteriorado. En ausencia de comorbilidades es poco habitual que la infección por estos virus lleve a enfermedad grave. Este patrón se ha observado por otros autores en infección grave por rinovirus (196) y metapneumovirus humano (104). En conclusión, los pacientes con neumonía vírica grave en la temporada postpandémica presentaron una elevada frecuencia de comorbilidades, siendo ésta superior entre los infectados por virus no gripales. Entre los fallecidos por gripe la inmunosupresión fue la comorbilidad más frecuente.

## Tratamiento

El uso de oseltamivir antes de la pandemia de 2009 era prácticamente anecdótico (197). Durante la pandemia su uso se generalizó en la UCI administrándose la gran mayoría o incluso todos los pacientes (198,199).

Esta tendencia continuó durante la postpandemia como se puede apreciar en el hecho de que de los 40 pacientes con gripe estudiados en esta tesis, 39 de ellos recibieron tratamiento antiviral. Este elevado porcentaje de pacientes tratados se ha descrito también por otros autores durante la temporada postpandémica en España (52,189).

El tratamiento administrado en las primeras 48 horas desde el inicio de los síntomas ha demostrado reducir la duración temporal de la sintomatología, el desarrollo de complicaciones como neumonía (18), la gravedad (185) y la mortalidad (200). Un estudio multicéntrico con pacientes ingresados en la UCI por gripe A/H1N1pdm09 reveló que el único factor independiente relacionado un aumento de la supervivencia fue el hecho de recibir tratamiento antiviral con oseltamivir dentro de las primeras 48 horas desde el inicio de los síntomas (166). Otros estudios confirman este dato y describen mayor mortalidad asociada al retraso en el tratamiento antiviral (179).

Desafortunadamente, en este trabajo no se registró el tratamiento que recibieron los pacientes en planta por lo que no se ha podido estudiar si el tratamiento comenzó en las primeras 48 horas desde el inicio de los síntomas. No obstante al haber recibido prácticamente todos los pacientes oseltamivir, el tratamiento con este antiviral no fue un factor de confusión en la regresión de Cox univariante.

Sobre las dosis de oseltamivir administradas, la pauta más frecuente recibida por los pacientes fue la de 150 mg/día, coincidiendo con la dosis estándar de oseltamivir recomendada por la

OMS (201). Una cuarta parte de los pacientes recibió una dosis de 300 mg/día, pauta que se considera apropiada en el tratamiento de algunos pacientes graves (201). En cuanto a la duración del tratamiento, la pauta estándar son cinco días pero se puede alargar dependiendo de la respuesta clínica del paciente (201). En los pacientes estudiados en esta tesis la duración media fue de 8 días, con lo que se concluye que en general la dosis, duración y momento de instauración del tratamiento con oseltamivir en la UCI fueron correctos.

El uso de esteroides en el tratamiento de la NAC vírica es controvertido. Su eficacia varía dependiendo del virus causante de la neumonía, por ejemplo está establecida su ineficacia en el tratamiento de infecciones causadas por el VRS (18). Durante la temporada pandémica, hasta un tercio de los pacientes con NAC gripal grave recibieron tratamiento con esteroides (202). Durante la temporada postpandémica el porcentaje fue incluso superior, llegando hasta el 48% (189). Pero su uso en gripe no está recomendado ya que se ha asociado a excreción viral prolongada, no ha demostrado reducir la mortalidad en neumonía por virus pandémico (203–205) ni disminución en la mortalidad en infecciones por el virus aviar A/H5N1 (206).

Algunos estudios han documentado un aumento en el riesgo de coinfecciones bacterianas asociado al tratamiento con esteroides (207,208), pero en este trabajo no se ha encontrado relación. Así como tampoco se ha encontrado relación entre el tratamiento con esteroides y la mortalidad de los pacientes infectados por gripe.

Todos los pacientes estudiados recibieron tratamiento antibiótico antibacteriano durante su estancia en la UCI, pese a que solo se confirmó infección bacteriana en aproximadamente una cuarta parte de los mismos. Es habitual encontrar altos porcentajes de tratamiento con antibióticos en la neumonía gripal (171). Hasta donde se ha revisado no existe ninguna referencia respecto al uso de tratamiento antibiótico empírico en infección por virus distintos al gripal, pero a raíz de los resultados hallados en esta tesis es razonable inferir que el porcentaje de tratamiento con antibióticos en neumonía por virus diferentes al gripal también sea elevado.

El tratamiento antibiótico empírico se realizó con betalactámicos más azitromicina o quinolonas, coincidiendo con la pauta recomendada por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) para los pacientes ingresados en UCI (209).

### **Co-infecciones bacterianas**

La presencia de coinfecciones fue frecuente, tanto entre los pacientes infectados por gripe como entre los infectados por otros virus. Aproximadamente un tercio de los pacientes presentaron infección bacteriana en algún momento durante su ingreso en UCI. Las coinfecciones son muy frecuentes en la NAC en niños, alcanzando porcentajes de hasta el 45%, este porcentaje es mucho menor en adultos (18). La frecuencia de coinfecciones descrita en pacientes con infección por virus A/H1N1pdm09 varía ampliamente según los estudios, oscilando entre porcentajes bajos como el 7% (185) hasta porcentajes del 28% (198,210), similares estos últimos a los hallados en este trabajo en el grupo de pacientes con gripe.

Algunos estudios postulan la hipótesis de que en las pandemias de gripe la coinfección bacteriana es la principal causa de muerte (211). Durante la temporada pandémica del 2009 varios estudios relacionaron la presencia de coinfección bacteriana con la gravedad (185,198) aunque en otros estudios, al igual que en el presente, no se observó este efecto (212).

### **Parámetros de laboratorio de bioquímica**

Durante la temporada pandémica se encontró una asociación entre la elevación de determinados parámetros de laboratorio y mortalidad, como por ejemplo LDH (213–215), ALT (214), AST (177,199). No se ha encontrado esta asociación en los pacientes con gripe analizados, ni para la AST, la ALT o la creatinina.

En la temporada postpandémica se describieron niveles elevados de ALT y AST en pacientes hospitalizados (216). En el presente trabajo solamente los niveles de AST se encontraban ligeramente por encima de los valores normales en los pacientes con gripe.

### **Leucocitos**

Estudios recientes han demostrado que algoritmos diagnósticos simples que incluyen entre otras variables el recuento leucocitario, resultan útiles a la hora de establecer la etiología gripal (217,218). Dada la rapidez y el bajo coste que supone la realización del hemograma, se ha considerado interesante el estudio de los valores obtenidos en el hemograma en los pacientes con neumonía.

Los niveles de leucocitos fueron significativamente menores en los pacientes infectados por gripe que en los infectados por otros virus. Varios autores han encontrado esta relación entre niveles bajos de leucocitos e infección por el virus pandémico (176,215,219,220)

Dentro del grupo de pacientes con gripe presentaron niveles significativamente inferiores de leucocitos los pacientes fallecidos, encontrándose el valor medio en este grupo en el rango de leucopenia, aunque no se ha encontrado en este trabajo relación entre los niveles de leucocitos y la mortalidad al igual que han descrito otros autores como Reyes *et al.* (215). También los niveles de neutrófilos fueron inferiores en los pacientes fallecidos respecto a los pacientes que sobrevivieron.

Respecto a las diferencias en los niveles de leucocitos en pacientes con gripe según el paciente estuviese inmunosuprimido o no, se observó que los pacientes no inmunosuprimidos mostraban niveles que prácticamente doblaban a los niveles presentados por los pacientes inmunosuprimidos, aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa. Futuros estudios con mayor número de pacientes deberán confirmar si dicha diferencia podría tener repercusiones fisiopatológicas en el control del virus.

Los niveles deficitarios de células del sistema inmune en suero pueden deberse a dos causas, bien a un déficit en la expansión clonal de dichas células o bien a un reclutamiento de estas hacia el pulmón provocando la disminución de los niveles en sangre. La primera situación supone un defecto en el sistema inmune la cual conlleva que éste sea incapaz de luchar contra el virus. La segunda, sobrerclutamiento en el pulmón, puede parecer *a priori* beneficiosa ya que los neutrófilos son necesarios para limitar la replicación viral, pero un exceso de los mismos contribuye a una mayor inflamación en el pulmón (146,147).

A pesar de no haberse podido demostrar todavía una relación entre los niveles de leucocitos o neutrófilos con la mortalidad, este es un campo de estudio en el que análisis más exhaustivos o que incluyan mayor número de pacientes aportarían una información sumamente interesante en cuanto al papel del sistema inmune en las neumonías graves. Por tanto, los pacientes no presentaron diferencias significativas en lo concerniente al tipo de tratamiento recibido, la frecuencia de coinfecciones bacterianas, o en los parámetros bioquímicos. Sin embargo, los niveles de leucocitos fueron inferiores en los pacientes con gripe, especialmente en los fallecidos.

## **Mortalidad**

Las causas de mortalidad más frecuentes en los pacientes con gripe A/H1N1pdm09 incluidas en este trabajo fueron el fallo respiratorio y el fracaso multiorgánico. Ambas han sido descritas como las principales causas de mortalidad en la infección por este virus (184,185,216,221,222). Varias series describen porcentajes de mortalidad por gripe A/H1N1pdm09 cercanos al 40%, similares al encontrado en esta tesis (52,189).

La elevada mortalidad por gripe en la población estudiada coincide con el dato descrito por otros autores en la temporada postpandémica referido a un aumento de la mortalidad respecto a la temporada pandémica (49,172,216). Esta elevación podría deberse además de a la mayor frecuencia de comorbilidades en los pacientes a un retraso en la instauración del tratamiento antiviral respecto a la temporada pandémica (52). La mortalidad entre los pacientes con neumonía por otros virus fue menor que entre los infectados por gripe, por lo que podemos concluir que la NAC grave causada por el virus de la gripe A/H1N1pdm09 cursa con mayor mortalidad que la causada por otros virus, aunque la gravedad al ingreso fuera similar.

## **Estudio de los perfiles de citoquinas en respuesta a la neumonía vírica**

La elevación de diversas citoquinas (IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, MIP-1 $\beta$  o G-CSF entre otras) se describió como una respuesta característica del paciente con enfermedad grave causada por infección por gripe en el contexto de la temporada pandémica (187,221,223,224). Esta capacidad del virus de la gripe para inducir la producción de citoquinas ya se había documentado en cepas de gripe aviar A/H5N1 (225). También se ha descrito hipercitoquinemia en otros virus distintos al gripal como el VRS (226).

La hipercitoquinemia observada en nuestros pacientes recuerda a otras patologías graves que cursan también con dicha característica, como es el caso de la sepsis (227), en la que la activación del sistema inmune innato produce una liberación excesiva de citoquinas, que participan en la disfunción endotelial observada en esta patología, lo que invita a una reflexión acerca de un posible nexo de unión al menos inmunopatológica entre ambas patologías.

Si bien las citoquinas juegan un papel importante en la defensa antiviral, la hipercitoquinemia persistente puede causar daño inflamatorio en los tejidos y ser uno de los motivos que provocan el fracaso respiratorio observado en estos pacientes (187). En general, como describen Deng y Standiford, los niveles plasmáticos de citoquinas inflamatorias (como la IL-6 o la IL-8 entre otras) correlacionan con la gravedad de la neumonía (228). La liberación excesiva de citoquinas también se asocia a otros efectos deletéreos como hipotensión, hipoperfusión de órganos vitales o acidosis (229).

Los pacientes con gripe incluidos en este estudio presentaban niveles elevados frente a los controles sanos de una serie de quimiocinas relacionadas con la defensa antiviral: IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$  (230). Además estas tres citoquinas estaban significativamente más elevadas en los pacientes fallecidos que en los supervivientes. Estas moléculas quimiotácticas movilizan linfocitos T, monocitos, macrófagos y neutrófilos hacia el foco de infección (231), pero el exceso de estas células defensivas en el pulmón contribuye a aumentar el daño producido por la inflamación en los tejidos infectados (187).

El G-CSF es la principal citoquina encargada de controlar el desarrollo y la función de los neutrófilos (232), actúa tanto a nivel local, reclutando y activando neutrófilos en el pulmón infectado, como a nivel sistémico, estimulando la producción de nuevos neutrófilos (233). Los neutrófilos liberan sustancias citotóxicas, quimiocinas y mediadores inflamatorios en respuesta a las infecciones. El G-CSF podría mediar la excesiva migración y reclutamiento de los neutrófilos a los pulmones, contribuyendo así a la mala situación respiratoria en estos pacientes. En este estudio se observa que el G-CSF está elevado en los pacientes con gripe, y dentro de éstos está significativamente más elevado en los fallecidos. Nuestro grupo así como otros autores también corroboraron esta elevación de G-CSF en la enfermedad grave producida por la gripe durante la temporada pandémica (221,234). Los resultados de este trabajo muestran que también en la neumonía causada por virus distintos al gripal se produce una elevación en los niveles de esta citoquina.

La inmunidad Th17 es importante en la defensa frente a bacterias y virus, pero también se relaciona con la patogénesis de enfermedades autoinmunes y alérgicas, como el lupus eritematoso sistémico y el asma (187). Estudios previos de nuestro grupo de investigación encontraron una elevación de citoquinas relacionadas con la respuesta Th17 (IL-9, IL-17, IL-6) en la infección por virus pandémico (223). En esta temporada postpandémica solo se ha encontrado elevación en los niveles de IL-6, tanto en los pacientes con gripe como en los

pacientes con otros virus. Los niveles de IL-17 por el contrario no mostraron estar elevados respecto al control sano ni entre los pacientes con infección por gripe ni entre los pacientes con infección por otros virus.

En modelos en ratones se ha visto que la IL-10 inhibe el desarrollo de la respuesta Th17 (235), si bien es cierto que entre los pacientes fallecidos por gripe la IL-10 se encontraba ligeramente elevada, el estudio de la producción coordinada de citoquinas muestra una correlación positiva entre IL-10 e IL-17 lo que descarta un efecto inhibitor por parte de la IL-10 en este caso.

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica implicada en diversas facetas de la respuesta inmune, con un importante rol en la inflamación. Esta citoquina es la principal mediadora de la respuesta de fase aguda y la fiebre. En el pulmón promueve un estado inflamatorio y sus niveles correlacionan con la gravedad y la mortalidad del síndrome de dificultad respiratoria aguda. Se encuentra implicada en varios estados inflamatorios patogénicos, en la sepsis niveles elevados de IL-6 correlacionan con gravedad y mortalidad, también esta aumentada en la gripe por virus aviar A/H5N1 y en el SARS (236).

En el caso del virus A/H1N1pdm09 existe un amplio consenso acerca del papel de la IL-6 como biomarcador de infección grave tanto en humanos como en ratones. Niveles sistémicos elevados de IL-6 se asocian con ingreso en UCI y con desenlace fatal (236). En ratones, la infección por gripe A/H1N1pdm09 desencadena enfermedad grave y un aumento de los niveles de IL-6 (187). Además, tanto en estudios con animales como clínicos, los análisis de expresión génica muestran una fuerte asociación entre esta citoquina y la respuesta inflamatoria (187). Así mismo, los pacientes con infección por otros virus estudiados en esta tesis también mostraron niveles de IL-6 elevados frente a los controles sanos.

Los casos graves de gripe pandémica manifiestan elevación de la citoquina inmunomoduladora IL-10 (187). En este estudio se observó una elevación de IL-10 entre los pacientes fallecidos por gripe pandémica. Este aumento podría interpretarse como un intento de prevenir el daño inflamatorio producido por la liberación prolongada de citoquinas, siendo entonces beneficioso para el paciente, pero también se puede interpretar como un mecanismo viral de evasión de la respuesta inmune, presentando en este caso un daño para el paciente (228). Apoyando esta última hipótesis estudios en ratones han demostrado que el déficit de IL-10 es un factor protector en la infección por gripe (221). En ancianos se ha asociado la producción elevada de IL-10 con una peor respuesta inmune a la vacuna de la gripe (221). El

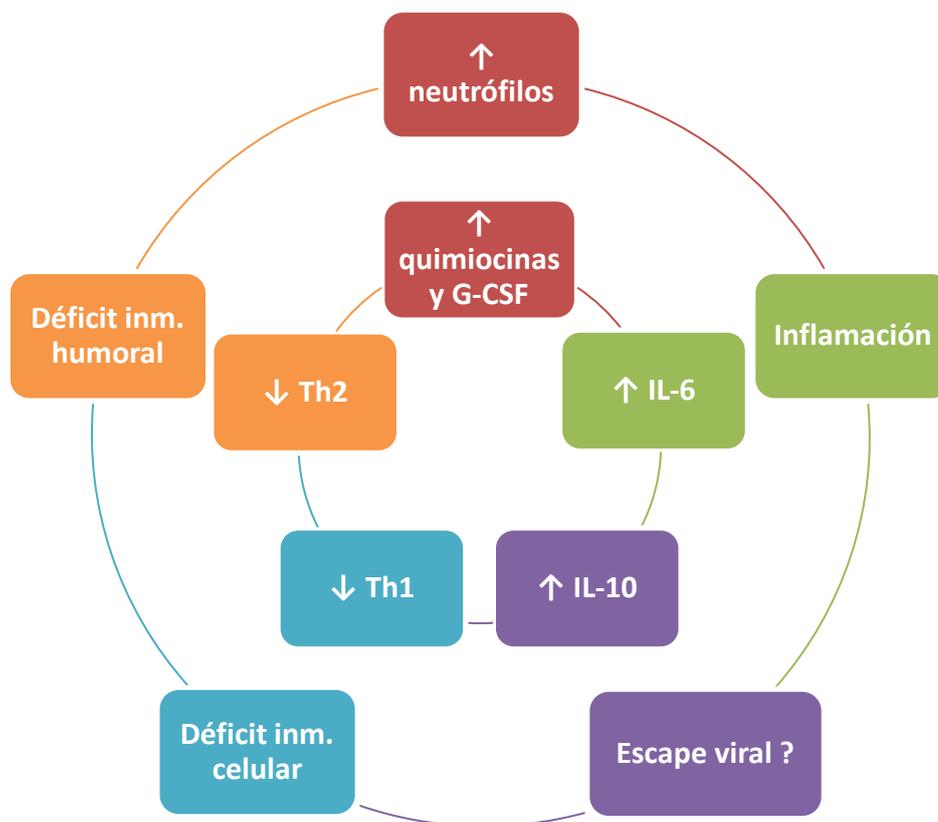
esclarecimiento del papel de la IL-10 es de gran interés ya que se podrían plantear alternativas terapéuticas actuando sobre esta citoquina con el objetivo de aumentar o reducir sus niveles en casos graves de neumonía.

Las citoquinas Th1 estudiadas (IL-1, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) mostraban niveles tan bajos que en el caso de IL-1 e IL-2 ni siquiera fueron detectables, y el resto se encontraban más elevadas en los controles sanos que en los pacientes. La inmunidad Th1 juega un papel importante frente a microorganismos intracelulares como los virus, y es posiblemente necesaria para eliminar el virus pandémico (187). Dado que nos encontramos con un grupo de pacientes graves, cabe preguntarse si uno de los factores relacionados con la gravedad ha podido ser una deficiente respuesta Th1.

La respuesta Th2 se encarga de la producción de anticuerpos y la defensa frente a parásitos (13). Las citoquinas Th2 estudiadas han sido la IL-4, IL-5 e IL-13, presentando todas ellas niveles bajos o incluso indetectables (IL-5). La ausencia de citoquinas Th2 podría jugar un papel en el déficit observado en algunas subclases de inmunoglobulinas analizadas.

En el caso particular de la IL-13, pese a que el test de Mann-Whitney arroja diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con gripe o con otros virus frente a los controles sanos, hay que señalar que los niveles son tan bajos que no se puede considerar que esta diferencia estadística tenga repercusión biológica.

En conclusión, los pacientes con NAC gripal grave mostraron una elevación de citoquinas relacionadas con inflamación y de la citoquina inmunomoduladora IL-10, a la par que un déficit en la producción de citoquinas relacionadas con las respuestas Th1 y Th2 (**Figura 52**).



**Figura 52:** Respuesta citoquímica en NAC gripal grave. (↑: aumento. ↓: disminución. )

Los pacientes con infección por otros virus, presentaron niveles disminuidos de IL-8, MCP-1 y MIP-1 $\beta$  respecto a los pacientes con gripe (aunque en el caso de IL-8 la diferencia no era estadísticamente significativa), poniendo de manifiesto que se genera una respuesta inmune diferente según el agente etiológico infectante. Aparentemente en el caso de infección por virus distintos al gripal la menor secreción de moléculas quimiotácticas probablemente implique un menor reclutamiento de células inmunes hacia el pulmón, quizá siendo este uno de los mecanismos que explican la menor gravedad de los pacientes con infección por virus distintos al gripal, junto a la diferente patogenicidad del agente etiológico.

Concluimos por tanto que los pacientes con neumonía por virus no gripales presentaron niveles inferiores de MCP 1 y MIP-1 $\beta$  en plasma respecto a los pacientes con neumonía gripal, por lo tanto los niveles de estas moléculas podrían ser útiles en casos de sospecha de etiología vírica no gripal. Además la elevación de los niveles de IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF y MCP-1 $\beta$  en plasma es una respuesta preservada en la infección vírica grave.

## Estudio de los niveles de inmunoglobulinas endógenas en la neumonía vírica

Una adecuada producción de inmunoglobulinas es esencial en la lucha frente a la infección gripal (237). Uno de los factores más importantes necesarios para la neutralización viral *in vivo* es alcanzar una concentración mínima de inmunoglobulinas en suero (237).

Los resultados de este trabajo mostraron una asociación entre infección por virus respiratorios, tanto gripe como otros virus, y niveles deficitarios de inmunoglobulinas, pero no permitieron determinar si este déficit fue causado por dichos virus o si existía previamente a la infección.

A favor del primer supuesto se ha demostrado en ratones que el virus de la gripe A produce depleción de linfocitos B, por lo que se postula que la infección por éste sea causa suficiente para producir hipogammaglobulinemia transitoria. Además se ha descrito disminución en los niveles de inmunoglobulinas durante la infección gripal en ausencia de inmunosupresión, recuperándose valores normales de inmunoglobulinas una vez superada la infección (238).

Pero también existen evidencias que apoyan el segundo supuesto, en los resultados obtenidos en este estudio se observó que el déficit de inmunoglobulinas fue especialmente marcado en el grupo de pacientes infectados por gripe y fallecidos, dentro de los cuales cabe recordar que se encontraba un elevado porcentaje de pacientes inmunosuprimidos.

Sería de gran interés establecer si la infección por el virus de la gripe se ve favorecida en estos pacientes inmunosuprimidos. En caso de confirmarse esta teoría, la medición de niveles de inmunoglobulinas podría ser una herramienta en la búsqueda de pacientes en riesgo de padecer enfermedad complicada por virus de la gripe, ya que en ocasiones (p.ej. atención de pacientes en urgencias) no es fácil establecer el estado inmune del paciente por no disponer de todos los datos de su historia clínica.

## IgM

Los pacientes incluidos en este estudio presentaban niveles de IgM en el límite inferior de la normalidad. La IgM es crucial para el aclaramiento viral durante la infección primaria por virus de la gripe A en ratones. Durante la fase de respuesta inmune adaptativa (<5 días), la IgM contribuye al aclaramiento viral de manera mucho más intensa que la IgG (239). Usando ratones modificados genéticamente para producir únicamente IgM y no IgG, se ha demostrado que la IgM por sí sola es capaz de proteger a ratones inoculados con dosis letales de gripe (240).

El análisis de la mortalidad de nuestro grupo de pacientes muestra el papel protector de la IgM en pacientes infectados por gripe. En efecto, los pacientes infectados por gripe fallecidos presentaron niveles medios de IgM inferiores a los valores normales. En humanos infectados por el virus de la gripe pandémico se ha observado que los pacientes con niveles más elevados de IgM aclaran el virus más rápidamente que los pacientes con niveles más bajos (241). Además, la producción correcta de IgM específica frente al virus en la fase temprana de la infección por virus pandémico predice una adecuada respuesta inmune específica (241,242) ya que la IgM favorece la expansión clonal temprana de linfocitos B, aunque el mecanismo preciso de activación del linfocito B todavía se desconoce (242,243).

La IgM natural, dada su estructura flexible, puede unirse a patógenos que nunca antes han estado en contacto con el hospedador, por tanto presenta un papel protector frente a la gripe incluso antes del primer contacto con el virus (135). En ratones hasta el 10% de la IgM natural puede unirse al virus gripal (244). La IgM natural producida por los linfocitos B1 se encuentra en cantidades significativas en las vías aéreas y posee capacidad para neutralizar al virus. La inactivación viral por IgM natural es un potente mecanismo inmune, y en ausencia de esta inmunoglobulina la supervivencia en ratones a la infección por el virus de la gripe se ve comprometida (135).

Las inmunoglobulinas naturales no están dirigidas únicamente contra el virus gripal, su amplio abanico de acción permite que presenten un efecto protector frente a las coinfecciones bacterianas que se pueden producir durante las neumonías víricas (135,157).

Además la IgM posee un papel fundamental en la eliminación de epítipo específicos de la oxidación, y en consecuencia, presenta un papel protector frente a las consecuencias del estrés oxidativo que se produce en el contexto de las enfermedades graves (245)

En definitiva, aunque es conocido el papel primordial de la IgM en la defensa frente a las infecciones, este estudio demuestra por primera vez su papel como factor protector frente a mortalidad en la NAC gripal, su capacidad como herramienta diagnóstica y el posible uso de IgM como nueva vía terapéutica en pacientes graves.

### **IgG2**

En este estudio, el grupo de pacientes con gripe mostró niveles de IgG2 por debajo de la normalidad. Al estudiar los niveles de esta inmunoglobulina por subgrupos según la presencia o no de inmunosupresión se observó que, pese a que ambos grupos de pacientes presentaron niveles por debajo de los valores normales, el déficit era claramente más acusado en los pacientes inmunosuprimidos.

En varios estudios de cohortes de pacientes con neumonía grave durante la temporada pandémica se han descrito niveles bajos de IgG2 (224,246–248). Algunos autores postulan que la disminución en los niveles de esta inmunoglobulina podría deberse a la interacción entre el virus A/H1N1pdm09 y los linfocitos B, aunque para alcanzar la disminución que se observa en los niveles de IgG2 en suero esta interacción debería ser muy potente (246).

Otra teoría que pretende explicar la relación entre neumonía gripal grave y déficit de IgG2 postula que no es el virus el que produce una disminución en los niveles, sino que los pacientes que presentan niveles de IgG2 disminuidos previamente a la infección son más proclives a la enfermedad grave. Esta teoría se ha propuesto en referencia a pacientes embarazadas, postulándose que el déficit de IgG2 que se produce de forma fisiológica durante el embarazo podría ser una de las causas por las que las embarazadas son población de riesgo para padecer enfermedad grave por el virus H1H1pdm09 (246).

## IgA

La única inmunoglobulina que presentó diferencias en sus niveles entre pacientes con infección por virus de la gripe y pacientes con infección por otros virus fue la IgA, cuyos niveles fueron inferiores en los pacientes con gripe.

El papel de la IgA en la defensa frente al virus de la gripe ha sido estudiado por Renegar *et al.* en ratones obteniendo varios hallazgos interesantes. En primer lugar han demostrado que la administración pasiva de IgA en ratones protege contra la infección por el virus de la gripe (249), también han descubierto que la inmunidad nasal de los ratones disminuye si se neutraliza la IgA, pero no si se neutralizan la IgM o la IgG (250). Su conclusión final sugiere que la IgA es la principal protectora frente a este virus en las vías respiratorias superiores (251).

Un estudio en un modelo de infección por virus de la gripe A en ratones (252), mostró que el aumento en la producción del factor activador de célula B perteneciente a la familia TNF (BAFF), el cual promueve el cambio de clase hacia IgA en los linfocitos B, mejoraba la capacidad de neutralizar el virus.

El papel de la IgA en la infección por virus respiratorios distintos al gripal ha sido poco estudiado por lo que los resultados de este estudio no se pueden comparar con otros. Dado que los pacientes infectados por otros virus presentaban niveles de IgA superiores a los pacientes con gripe y aun así su situación era de gravedad es posible que en la defensa frente a estos virus la IgA tenga un papel menos importante que en el caso de la gripe, aunque se necesitan estudios adicionales para obtener una conclusiones definitivas en este sentido.

Se puede concluir que los pacientes fallecidos por gripe presentaron menores niveles de todos los isotipos de inmunoglobulinas que los supervivientes, encontrándose la IgM y la IgG2 por debajo de los límites considerados normales. Los pacientes con neumonía por virus no gripales presentaron niveles superiores de IgA en plasma respecto a los pacientes con neumonía gripal.

## **Correlación entre niveles de citoquinas, inmunoglobulinas y gravedad**

Los pacientes infectados por gripe presentaron al ingreso niveles de inmunoglobulinas y citoquinas que correlacionaban inversamente entre ellas. En general los niveles de citoquinas elevados correlacionaban con niveles disminuidos de inmunoglobulinas, siendo la IgM y la IgG2 las inmunoglobulinas que mostraron mayor número de correlaciones.

Ya en la temporada pandémica, nuestro grupo de investigación describió que la hipercitoquinemia se relacionaba con una disfunción de la respuesta adaptativa, aunque en ese trabajo no se midieron los niveles de inmunoglobulinas (184), los resultados de esta tesis apoyan esa relación mostrando una relación inversa entre los niveles de citoquinas e inmunoglobulinas.

También durante la temporada pandémica se describió una asociación entre niveles disminuidos de IgG2 y elevación en los niveles de citoquinas (224).

Además en este trabajo se ha analizado la correlación entre los niveles de citoquinas e inmunoglobulinas y la gravedad de los pacientes, medida ésta por la puntuación APACHE II que presentaron los mismos al ingreso, encontrándose que los niveles de diversas citoquinas (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, GM-CSF, MIP-1 $\beta$ , y TNF- $\alpha$ ) correlacionaron de manera directa con la gravedad, mientras que en el caso de la IgM dicha correlación era de signo inverso.

La relación de los niveles de citoquinas con la gravedad de la neumonía por virus gripal ha sido ampliamente documentada, y se ha discutido en apartados previos de esta discusión. En lo referente a las inmunoglobulinas, aunque algunos estudios han mostrado niveles disminuidos de IgG2 en pacientes graves (246), en la búsqueda bibliográfica realizada no se ha encontrado ningún estudio en el que los niveles de IgM muestren correlación con la gravedad, posiblemente debido a que a pesar de que se han analizado numerosas cohortes de pacientes con neumonía por el virus A/H1N1pdm09, en pocos de esos estudios se analizaban los niveles de inmunoglobulinas.

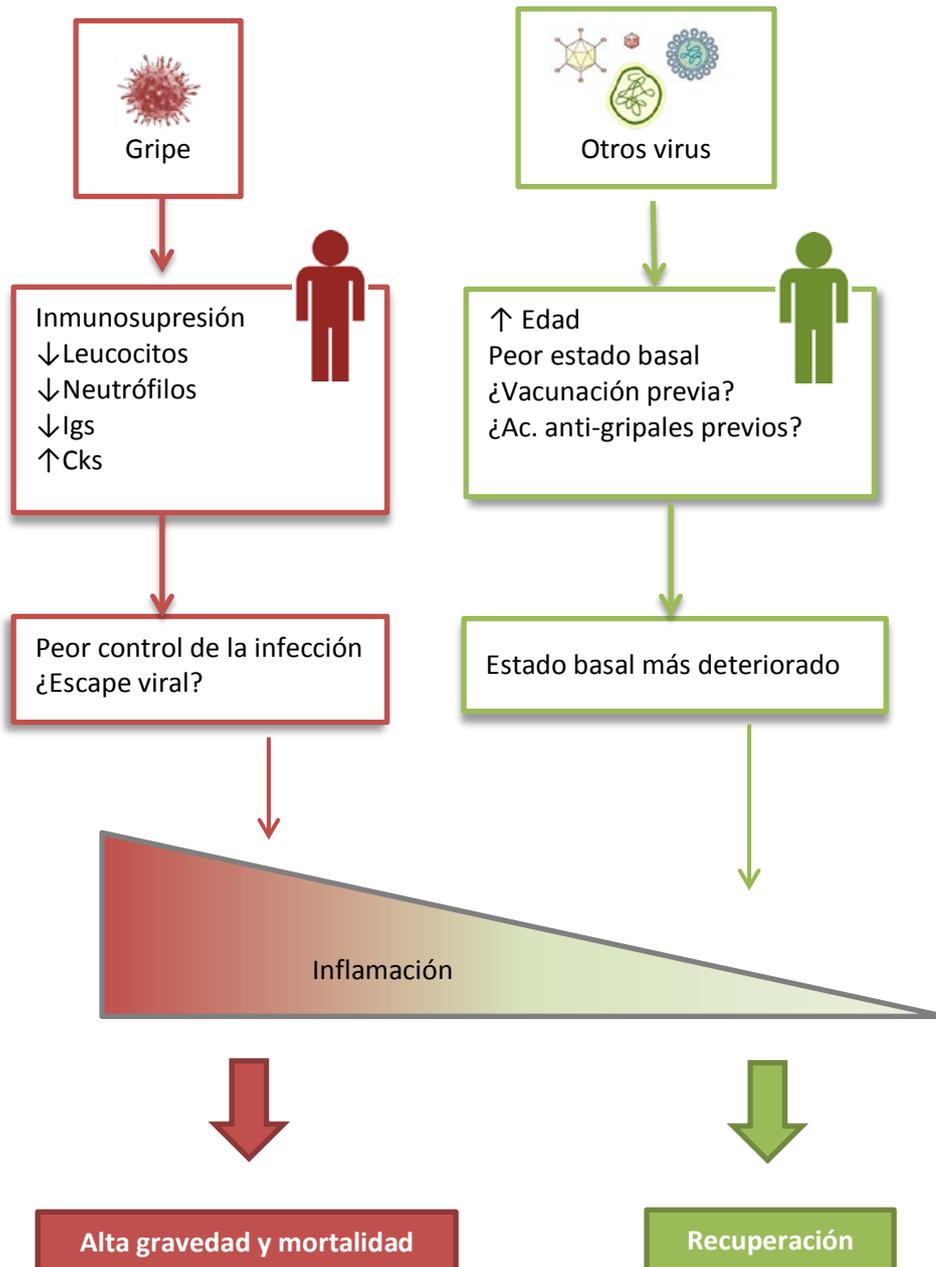
La relación entre la respuesta innata y la adaptativa, medida en este caso por los niveles de citoquinas e inmunoglobulinas respectivamente, y en concreto el aumento de la respuesta

innata frente a una respuesta adaptativa insuficiente puede ser una de las causas principales de la elevada gravedad y mortalidad observada en los pacientes tanto en este trabajo como en el resto de los realizados durante las temporadas pandémica y postpandémica.

El estudio a fondo de esta disfunción inmune podría permitir nuevos abordajes terapéuticos en el futuro, que estuvieran dirigidos no solo a destruir o inhibir al virus, sino también a regular la respuesta inmune del paciente frente a la infección.

En conclusión la correlación inversa entre niveles plasmáticos de citoquinas e inmunoglobulinas puede indicar que las inmunoglobulinas juegan un papel en el control de la inflamación, hipótesis reforzada por la correlación inversa existente entre niveles de IgM y gravedad.

## Modelo de inmunopatogénesis



**Figura 53:** Modelo de inmunopatogénesis de neumonías víricas graves durante la temporada 2010-2011.

El patrón de la neumonía vírica grave durante la temporada postpandémica nos muestra una huella conservada en esta infección (niveles aumentados de IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, MCP-1) que puede dividirse en dos modelos según el tipo de paciente y agente etiológico causante de la neumonía: de una parte pacientes más jóvenes pero inmunosuprimidos que presentan bajos niveles de leucocitos, bajos niveles de inmunoglobulinas y sobreexpresión de la inmunidad

innata en forma de aumento en los niveles de citoquinas inflamatorias, que resultaron infectados por el virus gripal. De otra parte pacientes que presentan una respuesta inmune adecuada, pero de mayor edad y con mayor frecuencia de comorbilidades, que resultaron infectados por virus distintos al gripal.

La infección por gripe se ve facilitada en pacientes que no cuentan con mecanismos de respuesta inmune adaptativa adecuados, pese a que estos no se encuentren en una edad muy avanzada. Es decir, el virus selecciona a una población susceptible que no es capaz de desarrollar una respuesta inmune adecuada para defenderse de este. El hospedador al no presentar una respuesta adaptativa adecuada, sobreexpresa moléculas de la inmunidad innata, las citoquinas. Especialmente aquellas relacionadas con la inflamación y el aumento del reclutamiento de neutrófilos hacia el pulmón como quimiocinas, IL-6 o G-CSF.

Este fallo en la respuesta inmune adaptativa se corresponde con mayor gravedad, observándose de manera muy clara en la presente tesis una relación directa entre los niveles de citoquinas y el APACHE II, al contrario de lo que sucede en el caso de las inmunoglobulinas. Los pacientes de nuestro estudio con niveles bajos de inmunoglobulinas presentaron mayor gravedad que conllevó a una mayor mortalidad

La asociación entre déficit del sistema inmune y neumonía gripal grave ya fue postulada por nuestro grupo de investigación al analizarse los datos de la temporada 2009-2010, encontrándose un aumento en los niveles de diversas citoquinas en los pacientes infectados por el virus gripal (184,187,223), hipótesis reforzada por el hallazgo de una asociación directa entre la hipercitoquinemia y el nivel de excreción de virus (253).

El presente trabajo va un paso más allá en el estudio de la respuesta inmune de los pacientes, incluyendo moléculas relacionadas con la respuesta inmune adaptativa, las inmunoglobulinas y otorga especial importancia en la defensa frente al virus gripal a las inmunoglobulinas IgM e IgG2. Además se pone de manifiesto la importancia de la medición no solo de IgG, sino también de sus subclases, ya que una medición de niveles de IgG total no hubiera permitido encontrar el déficit de IgG2 que presentaron estos pacientes.

Por otra parte la infección por otros virus distintos al gripal que resulta en neumonía grave es más frecuente en pacientes de edad avanzada y con presencia de comorbilidades, como por ejemplo patología respiratoria, lo que sugiere que en la infección por virus distintos al gripal se

requieren unas condiciones previas en el hospedador que están relacionadas con condiciones fisiopatológicas, o bien con condiciones relacionadas con la senescencia.

Al igual que ocurrió durante la temporada pandémica, la población de edad más avanzada se vio menos afectada por el virus gripal pandémico, a lo que pudo contribuir bien el porcentaje más elevado de vacunación que habitualmente se encuentra en este grupo de edad (216,254) o bien la existencia de anticuerpos con reactividad cruzada con el virus pandémico en población nacida antes de 1950 por exposición a virus antigénicamente relacionados con el virus pandémico (255).

### **Modelos predictivos de mortalidad en pacientes con infección por gripe**

Durante la pandemia del 2009 se utilizaron parámetros clínicos o bioquímicos para establecer modelos que permitieran predecir la mortalidad de los pacientes con infección gripal (154). Sin embargo no se realizaron modelos predictivos que analizaran la relación existente entre los niveles de inmunoglobulinas y el desenlace clínico de los pacientes. En este sentido, y por primera vez en la literatura, en esta tesis se ha identificado a la IgM como un marcador temprano de mortalidad en el paciente crítico utilizando modelos de regresión múltiple, por lo que podemos concluir que los niveles séricos disminuidos de IgM en plasma al ingreso se asocian con mayor riesgo de mortalidad en la neumonía gripal grave.

Además de los niveles de IgM también los niveles de IgG2 han mostrado capacidad para predecir supervivencia en pacientes con infección por el virus pandémico en nuestro estudio. La medición de niveles de inmunoglobulinas en pacientes con neumonía grave puede ser una importante herramienta que permita discriminar entre pacientes con alto y bajo riesgo de mortalidad. Además podría abrir una vía terapéutica consistente en conseguir niveles adecuados de inmunoglobulinas en los pacientes que presenten un déficit de éstas mediante la administración de preparados intravenosos de inmunoglobulinas polivalentes, o incluso de sueros hiperinmunes en los casos de neumonía con diagnóstico del agente etiológico (terapias de reemplazo).

En conclusión, niveles plasmáticos de IgM e IgG2 menores de 58 mg/dl y 59 mg/dl respectivamente, al ingreso, se asocian con un menor tiempo de supervivencia y podrían ser

útiles como puntos de corte en el diseño de terapias de reemplazo con inmunoglobulinas exógenas.

Otras variables, como la presencia de diversas comorbilidades, se han asociado a mortalidad por gripe A/H1N1pdm09. Las comorbilidades asociadas a la mortalidad por gripe ya sea estacional o pandémica son muy variadas y difieren según la cohorte estudiada. En el metaanálisis de Mertz *et al.* (174) se puede encontrar una amplia descripción de las comorbilidades encontradas en más de 200 estudios. Las patologías crónicas como la inmunosupresión, enfermedad cardiovascular, pulmonar, neurológica, etc. se asocian con mayor mortalidad.

Mertz *et al.* ponen de manifiesto en su revisión que las diferencias en cuanto a los hallazgos en los distintos trabajos, probablemente obedecen a una falta de significación estadística por insuficiente tamaño muestral (174). En el presente estudio además del tamaño muestral, posiblemente también la elevada frecuencia de comorbilidades que presentan los pacientes, tanto los fallecidos como los supervivientes, ha hecho imposible encontrar características diferenciales entre ambos grupos.

De todas las comorbilidades analizadas en este trabajo, ninguna mostró finalmente ser un factor de riesgo de mortalidad. Ahora bien, una de ellas, la inmunosupresión previa, pese a no confirmarse como factor de riesgo en el análisis multivariante, sí que muestra relación con la mortalidad en el análisis univariante. Si bien en este estudio no se ha encontrado relación, los pacientes inmunosuprimidos son un grupo de riesgo reconocido a la hora de padecer neumonías víricas, aunque la incidencia y el desenlace clínico varían según la intensidad y la duración de la inmunosupresión (9,129).

Los parámetros de laboratorio analizados (AST, ALT, etc.) han sido identificados como factores de riesgo por algunos autores (214) pero en este trabajo han presentado niveles similares en los pacientes fallecidos y supervivientes no asociándose a mayor mortalidad.

Estos resultados apoyan por tanto un papel protector de ambas inmunoglobulinas (IgG2 e IgM) en la neumonía gripal en la temporada postpandémica.

## Biomarcadores

La búsqueda de biomarcadores fiables es especialmente importante en el caso del diagnóstico de neumonía, dado que es frecuente no conseguir identificar el agente etiológico. Además de citoquinas e inmunoglobulinas, también se ha estudiado el uso como biomarcadores de la proteína C reactiva, el recuento leucocitario o la procalcitonina (256).

Para ser útil en la práctica clínica de rutina, un biomarcador debe proveer información adicional y cumplir al menos una de las siguientes características: permitir establecer un diagnóstico rápido y fiable, ser un indicador del pronóstico, permitir seleccionar a los pacientes en función de una intervención específica, reflejar la eficacia o ineficacia de una intervención, advertir precozmente de la progresión de la enfermedad, no mostrar fenómeno de “agotamiento”, es decir, permanecer elevado si la infección se prolonga o elevarse de nuevo en sucesivas infecciones. En lo referente a los ensayos clínicos un biomarcador debe ser útil a la hora de seleccionar los pacientes a incluir en el ensayo (257).

Actualmente se consideran biomarcadores de inflamación el TNF- $\alpha$  y el lactato. Otros como la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y la IL-10 se postulan como nuevos biomarcadores de presencia/ausencia de inflamación (257). A la vista de los resultados de esta tesis podría ser de interés estudiar el uso de los niveles de inmunoglobulinas, especialmente de IgM e IgG2, como biomarcadores en la neumonía vírica.

Por otra parte, la medición de parámetros tales como inmunoglobulinas y citoquinas debe servir para valorar el estado inmunitario de los pacientes con neumonía grave. Los pacientes que pese a no presentar causas obvias de inmunosupresión muestren niveles inadecuados de estos mediadores inmunológicos deberían considerarse de mayor riesgo y recibir un enfoque terapéutico temprano encaminado a reducir la mortalidad en este grupo de riesgo.

Recientes estudios en pacientes con sepsis apoyan este planteamiento y plantean usar la inmunomonitorización como una pieza clave en la toma de decisiones en pacientes ingresados en unidades de críticos, que permita personalizar el tratamiento e implementar medidas profilácticas precoces tales como el uso de inmunoglobulinas intravenosas en los pacientes que lo requieran (165).

## Nuevos enfoques terapéuticos en el tratamiento de la NAC gripal grave

Dada la relación encontrada entre los niveles disminuidos de IgM y la mortalidad en pacientes con infección por virus gripal sería interesante un enfoque terapéutico en pacientes con NAC grave por gripe consistente en la administración de inmunoglobulinas intravenosas (IVIG). Los preparados de inmunoglobulinas intravenosas se preparan usando una mezcla (*pool*) de suero de más de 1.000 donantes, la especificidad de las inmunoglobulinas incluidas varían en cada lote ya que depende de la exposición a patógenos de los donantes. Los distintos preparados existentes en el mercado varían en cuanto a la concentración de cada una de las clases y subclases de inmunoglobulinas incluidas pero en su mayoría contienen principalmente IgG (más de 95%) (258) y dentro de ésta el contenido es mayoritariamente IgG1, (259) subclase que se encontraba dentro de los VN en nuestros pacientes.

El uso de IVIG se ha estudiado en gripe, aunque no el preparado que está enriquecido en IgM, encontrando niveles significativos de anticuerpos específicos frente a la gripe en estas preparaciones, lo que sugiere un potencial papel terapéutico en el tratamiento de gripe grave (260).

Solo un preparado de inmunoglobulina intravenosa de los comercializados está enriquecido en IgM, el Pentaglobin que contiene un 76% de IgG, un 12% de IgM y un 12% de IgA (261). El tratamiento con este fármaco ha demostrado su eficacia en enfermedades inflamatorias en modelos experimentales (137).

Una de las patologías en las que se ha estudiado más extensamente el uso de inmunoglobulinas es en la sepsis. Mientras que en algunos ensayos no se observa beneficio (262), otros estudios (263,264) y metaanálisis (265) sí que describen una reducción de la mortalidad en pacientes con sepsis tratados con este fármaco, aunque se recomienda realizar ensayos clínicos que con mayor número de pacientes (266).

Curiosamente en ninguno de los trabajos mencionados (262–265) se ha realizado una selección de los pacientes según sus niveles de inmunoglobulinas. Los futuros ensayos clínicos sobre uso terapéutico de inmunoglobulinas intravenosas en general, y de las enriquecidas en IgM en particular deberían realizar un análisis previo de los niveles de estas moléculas en los

pacientes, de manera que reciban la intervención únicamente los pacientes que la necesiten. No realizar esta selección previa constituye un sesgo que dificulta encontrar los posibles efectos beneficiosos de este enfoque terapéutico y puede explicar porque distintas cohortes muestran resultados discrepantes.

Aunque el uso de inmunoglobulinas enriquecidas en IgM está siendo estudiado en sepsis, hasta el momento no existen estudios sobre su uso en neumonía. La realización de ensayos clínicos acerca de esta intervención aportaría una valiosa información, tanto en pacientes graves, dado el papel que muestran estos mediadores en relación con la mortalidad y la gravedad de estos pacientes, como en pacientes ancianos, que son los que concentran la mayor parte de mortalidad en las epidemias gripales anuales.

Además de los preparados de IVIG, también se puede realizar una terapia con sueros hiperinmunes. Dos ensayos clínicos que incluían pacientes graves infectados por el virus A/H1N1pdm09, mostraron que el tratamiento de la infección con plasma obtenido de pacientes convalecientes reducía la carga viral en el tracto respiratorio, el nivel de citoquinas en sangre y la mortalidad, mostrando un efecto protector del suero hiperinmune en el tratamiento de la infección (267,268). Este tratamiento también ha mostrado su efectividad en el tratamiento de la gripe por virus A/H5N1 y en la gripe de 1918 (260).

También la hemoperfusión y la plasmaféresis han sido ensayadas como tratamiento en casos graves. En un paciente tratado con hemoperfusión se redujeron los niveles de mediadores inflamatorios en plasma, mejorando la oxigenación (187). La plasmaféresis se ha usado también como estrategia para reducir la hipercitoquinemia producida por virus pandémico, mostrando buenos resultados en casos graves que no respondían a la terapia convencional (260).

Dada la correlación inversa encontrada en esta tesis entre inmunoglobulinas y citoquinas, se puede plantear una alternativa al tratamiento habitual que incluya el uso de fármacos inmunomoduladores en combinación con antivirales. Estos fármacos reducen los niveles de mediadores inflamatorios y abren la puerta al estudio de nuevas estrategias terapéuticas para tratar la inflamación que se produce tras la infección causada por el virus pandémico (187). Por ejemplo las estatinas o los macrólidos han sido propuestas como fármaco inmunomoduladores potencialmente útiles en infecciones por gripe y otros virus respiratorios (260).

Los enfoques terapéuticos basados en terapias inmunomoduladoras son de gran interés en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, y más si cabe en las producidas por virus debido al escaso arsenal de fármacos antivirales disponibles. Aunque en el caso de la gripe el oseltamivir muestra buenos resultados, la posibilidad de resistencias a este fármaco hace imprescindible abordar nuevas alternativas de tratamiento.

La medición de los niveles de inmunoglobulinas y otros mediadores inmunológicos debe empezar a considerarse una rutina tanto para seleccionar a los pacientes a incluir en ensayos clínicos con IVIG, sueros hiperinmunes o fármacos inmunomoduladores, como para seleccionar a los pacientes que requieren un seguimiento más estrecho en UCI en razón a una deficiente respuesta inmune, evitando sesgos en los ensayos clínicos y favoreciendo el tratamiento personalizado en la UCI.

En resumen, los resultados de nuestro trabajo demuestran el importante papel de las inmunoglobulinas endógenas en la neumonía de etiología viral, aportan datos pioneros en algunas de ellas, confirmando asociaciones clínicas relevantes, abriendo nuevas vías para la anticipación diagnóstica y el tratamiento precoz de esta patología respiratoria.



*Conclusiones*

---



## Conclusiones

---

1. En la temporada postpandémica 2010-2101, la edad media de los pacientes con neumonía gripal grave se elevó respecto a la temporada pandémica de 2009-2010, acercándose a la del patrón estacional de gripe, aunque fue inferior a la edad media de los pacientes con neumonía grave por otros virus.
2. Los pacientes con neumonía vírica grave en la temporada postpandémica presentaron una elevada frecuencia de comorbilidades, siendo ésta superior entre los infectados por virus no gripales. Entre los fallecidos por gripe la inmunosupresión fue la comorbilidad más frecuente.
3. Los pacientes no presentaron diferencias significativas en lo concerniente al tipo de tratamiento recibido, la frecuencia de coinfecciones bacterianas, o en los parámetros bioquímicos. Sin embargo, los niveles de leucocitos fueron inferiores en los pacientes con gripe, especialmente en los fallecidos.
4. La neumonía grave causada por el virus de la gripe A/H1N1pdm09 cursó con mayor mortalidad que la causada por otros virus, aunque la gravedad al ingreso fue similar.
5. Los pacientes con neumonía gripal grave presentaban elevación en los niveles de diversas citoquinas pro y anti-inflamatorias en plasma siendo esta elevación más acusada en los pacientes que fallecieron.
6. La elevación de los niveles de IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF y MCP-1 $\beta$  en plasma es una respuesta preservada en la infección vírica grave.
7. Los pacientes fallecidos por gripe presentaron menores niveles de todos los isotipos de inmunoglobulinas que los supervivientes, encontrándose la IgM y la IgG2 por debajo de los límites considerados normales.

- 8.** Los pacientes con neumonía por virus no gripales presentaron niveles inferiores de MCP-1 y MIP-1 $\beta$  y superiores de IgA en plasma respecto a los pacientes con neumonía gripal, por lo tanto los niveles de estas moléculas podrían ser útiles para identificar casos de sospecha de etiología vírica no gripal.
  
- 9.** La correlación inversa entre niveles plasmáticos de citoquinas e inmunoglobulinas puede indicar que las inmunoglobulinas juegan un papel en el control de la inflamación, hipótesis reforzada por la correlación inversa existente entre niveles de IgM y gravedad.
  
- 10.** El modelo predictivo de mortalidad en neumonía gripal muestra que los niveles bajos de IgM al ingreso se asocian con mayor riesgo de mortalidad.
  
- 11.** En los pacientes con infección gripal grave niveles plasmáticos de IgM e IgG2 menores de 58 mg/dl y 59 mg/dl respectivamente, se asocian con un menor tiempo de supervivencia y podrían ser puntos de corte útiles para el diseño de terapias de reemplazo con inmunoglobulinas exógenas.
  
- 12.** Los resultados de esta tesis apoyan por tanto un papel protector de las inmunoglobulinas IgG2 e IgM en la neumonía gripal.

*Rendimiento científico*

---



## Artículos internacionales

---

**Título:** IgM levels in plasma predict outcome in severe pandemic influenza.

Mar Justel, Lorenzo Socias, Raquel Almansa, Paula Ramírez, María C. Gallegos, Victoria Fernández, Monica Gordon, David Andaluz-Ojeda, Leonor Nogales, Silvia Rojo, Jordi Vallés, Angel Estella, Ana Loza, Cristóbal León, Cristina Lopez-Mestanza, Jesús Blanco, Jose Ángel Berezo, Sara Rosich, Catia Cillóniz, Antoni Torres, Raúl Ortiz de Lejarazu, Ignacio Martin-Loeches, Jesus F. Bermejo-Martin.

Revista: Journal of Clinical Virology. 58 (2013) 564– 567

Cuartil: 2

Indice de impacto (JCR 2013): 3.287

**Título:** IgA level in plasma as a differential factor for influenza infection in severe viral pneumonia.

Revista: Journal of Clinical Virology. 59 (2014) 135– 136

Cuartil: 2

Indice de impacto (JCR 2013): 3.287

## Congresos internacionales

---

**Título:** IgM as protective against uncontrolled inflammatory response and early mortality in critical post-pandemic influenza

R. Ortiz De Lejarazu Leonardo, R. Almansa, L. Socias, M. Justel Alvarez, C. Lopez-Mestanza, M.C. Gallegos, V. Fernandez, I. Martin-Loeches, P. Ramirez, M. Gordon, D.Andaluz, S. Rojo, I. Sanz, A. Estella, A. Loza, C. Leon, J. Blanco, JA. Berezo, S. Rosich, J.F. Bermejo- Martín

Options for the Control of Influenza VIII. Cape Town. 5-10 septiembre 2013

## Congresos nacionales

---

**Título:** Relación entre niveles plasmáticos de inmunoglobulinas y mortalidad en neumonía grave causada por virus de la gripe A(H1N1)pdm09.

M. Justel Alvarez, R. Almansa, L. Socias, P. Ramirez, M.C. Gallegos, D.Andaluz, L. Nogales, S. Rojo, J. Valles, A. Estella, A. Loza, I.C. Lopez, J. Blanco, J.A. Berezo, A. Torres, R. Ortiz De Lejarazu Leonardo, I. Martín- Loeches, J.F. Bermejo-Martín.

**Presentación oral.** XVIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valencia, 9-11 abril 2014.

**Título:** Estudio del perfil plasmático de inmunoglobulinas y citoquinas en pacientes con neumonía grave causada por gripe y otros virus respiratorios

M. Justel Alvarez, R. Almansa, L. Socias, P. Ramirez, D. Andaluz, A. Estella, A. Loza, J. Blanco, J.A. Berezo, S. Rosich, C. Cilloniz, A. Torres, I.C. Lopez, S. Rojo, R. Ortiz De Lejarazu Leonardo, I. Martin-Loeches, J.F. Bermejo- Martín.

XVIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valencia, 9-11 abril 2014.



Volume 58, Issue 3, November 2013

ISSN 1388-6532

# JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY



Pan American Society for Clinical Virology



European Society for Clinical Virology

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Clinical Virology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jcv](http://www.elsevier.com/locate/jcv)

Short communication

## IgM levels in plasma predict outcome in severe pandemic influenza



Mar Justel<sup>a,1</sup>, Lorenzo Socias<sup>b,1</sup>, Raquel Almansa<sup>c,1</sup>, Paula Ramírez<sup>d</sup>, Maria C. Gallegos<sup>e</sup>, Victoria Fernandez<sup>e</sup>, Monica Gordon<sup>d</sup>, David Andaluz-Ojeda<sup>f</sup>, Leonor Nogales<sup>f</sup>, Silvia Rojo<sup>a</sup>, Jordi Vallés<sup>g</sup>, Angel Estella<sup>h</sup>, Ana Loza<sup>i</sup>, Cristobal León<sup>i</sup>, Cristina Lopez-Mestanza<sup>a</sup>, Jesús Blanco<sup>j</sup>, Jose Ángel Berezo<sup>j</sup>, Sara Rosich<sup>k</sup>, Catia Cillóniz<sup>l</sup>, Antoni Torres<sup>l</sup>, Raul Ortiz de Lejarazu<sup>a</sup>, Ignacio Martin-Loeches<sup>g</sup>, Jesus F. Bermejo-Martin<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, SACYL, Avda Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain<sup>2</sup>

<sup>b</sup> Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Son Llatzer, SEMICYUC, Ctra. Manacor, km 4, 07198 Palma de Mallorca, Spain<sup>3</sup>

<sup>c</sup> Unidad de Investigación Biomédica, Hospital Clínico Universitario de Valladolid (ibC), SACYL/IECSCYL, Avda Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain<sup>2</sup>

<sup>d</sup> Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, SEMICYUC, Valencia, Bulevar del Sur, 46026 Valencia, Spain<sup>4</sup>

<sup>e</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Son Llatzer, Ctra. Manacor, km 4, 07198 Palma de Mallorca, Spain<sup>3</sup>

<sup>f</sup> Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, SEMICYUC, SACYL, Avda Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain<sup>2</sup>

<sup>g</sup> Centro de Críticos, Corporación Sanitaria y Universitaria Parc Taulí – Hospital de Sabadell, CIBER Enfermedades Infecciosas, SEMICYUC, Parc Taulí, 1, 08208 Sabadell, Spain<sup>5</sup>

<sup>h</sup> Servicio de Medicina Intensiva, Hospital de Jérez, SAS, SEMICYUC, Ronda de Circunvalacion, s/n, Jérez, Spain<sup>6</sup>

<sup>i</sup> Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Nuestra Señora de Valme, SEMICYUC, Carretera Madrid-Cádiz (Pol. Ind. La Palmera), KM 548, 41014 Sevilla, Spain<sup>7</sup>

<sup>j</sup> Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario Río Hortega, SEMICYUC, SACYL, Centro de investigación en red de enfermedades respiratorias, CIBERES, Valladolid, Dulzaina 2, 47012 Valladolid, Spain<sup>7</sup>

<sup>k</sup> Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitari Joan XXIII, SEMICYUC, Mallafre Guasch 4, 43007 Tarragona, Spain<sup>8</sup>

<sup>l</sup> Hospital Clínic, IDIBAPS, Ciberes, Barcelona, Spain<sup>9</sup>

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 July 2013

Received in revised form 5 September 2013

Accepted 6 September 2013

## Keywords:

Influenza

Immunoglobulins

Prognosis

Critical

Cytokines

## ABSTRACT

**Background:** Little is known on the participation of immunoglobulin isotypes and subclasses in the pathogenesis of the severe disease caused by the pandemic influenza virus (influenza A(H1N1)pdm09).

**Objectives:** (1) To evaluate the association between plasma levels of IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE and outcome in patients with severe pandemic influenza. (2) To evaluate the association between immunoglobulin and cytokine levels in these patients.

**Study design:** 40 critically ill patients with community acquired pneumonia and influenza A(H1N1)pdm09 infection were recruited from November 2010 to February 2011. Plasma samples were collected during the first 24 h following admission to the ICU. Immunoglobulins and 17 major cytokines were profiled in plasma.

**Results:** 15 patients died (37.5%). When the association between clinical variables and prognosis was assessed, prior immunosuppression, APACHE II score, levels of IgG2 and levels of IgM were associated with outcome in a univariate Cox regression analysis. Kaplan Meier analysis showed that patients with

**Abbreviations:** ICU, intensive care unit; CAP, community acquired pneumonia; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; HBP, high blood pressure.

\* Corresponding author. Tel.: +34 983420000x383; fax: +34 983420040.

E-mail addresses: [jfbermejo@saludcastillayleon.es](mailto:jfbermejo@saludcastillayleon.es), [berinmuno@hotmail.com](mailto:berinmuno@hotmail.com) (J.F. Bermejo-Martin).

<sup>1</sup> Contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Tel.: +34 983420000.

<sup>3</sup> Tel.: +34 871 202 000.

<sup>4</sup> Tel.: +34 961 24 40 00.

<sup>5</sup> Tel.: +34 93 723 18 18.

<sup>6</sup> Tel.: +34 956032000.

<sup>7</sup> Tel.: +34 955 01 50 00.

<sup>8</sup> Tel.: +34 977 29 58 00.

<sup>9</sup> Tel.: +34 93 312 94 11.

levels of IgG2 and IgM <59 and <58 mg/dl respectively died earlier. Multivariate Cox regression analysis showed that APACHE II score and levels of IgM were the best predictors of outcome, being levels of IgM a protective factor against mortality. IgM was the immunoglobulin showing the largest number of negative correlations with cytokine levels.

**Conclusions:** Our results support a central role of IgM in preventing uncontrolled inflammatory response and mortality in severe pandemic influenza. Early assessment of IgM could contribute to guide clinical decisions in these patients.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Background

Pandemics generated by 2009 influenza A/H1N1 virus (influenza A(H1N1)pdm09) caused a great concern in the society. Little is known on the participation of immunoglobulin isotypes in the pathogenesis of the severe disease caused by this virus. Gordon et al. [1] described lower levels of the IgG2 subclass in severe cases of pandemic influenza. Chan et al. reported that the lower IgG2 levels in these cases are associated with cytokine dysregulation [2]. To the present date, there is no any available information on the involvement of immunoglobulins in the prognosis of patients with critical respiratory illness caused by this virus.

## 2. Objectives

(1) To evaluate the association between plasma levels of IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE and outcome in patients with severe pandemic influenza. (2) To evaluate the association between immunoglobulin and cytokine levels in these patients.

## 3. Study design

**Patients:** 40 critically ill patients with community acquired pneumonia (CAP) with influenza A(H1N1)pdm09 infection were prospectively recruited from November 2010 to February 2011. Definition of CAP was based on current American Thoracic Society and Infectious Disease Society of America guidelines [3]. Patients with HIV infection or those receiving radiotherapy, immunosuppressive drugs, including chemotherapy or systemic steroids in the last three months previous to admission to the ICU were considered as immunosuppressed. Informed consent was obtained directly from each patient and control before enrolment. Approval of the study protocol for both the scientific and the ethical aspects was obtained from the Scientific Committee for Clinical Research of our hospital. The study has been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

**Samples:** A single blood sample was obtained from each patient in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid within the first 24 h following admission to the ICU. Cytokine levels in plasma were evaluated using the Biorad® 17 plex assay (Hercules, CA, USA). This system allows for quantitative measurement of IL-1 $\beta$ ; IL-6; IL-8; IL-7; IL-17; G-CSF; MCP-1; MIP-1 $\beta$ ; IL-2; IL-4; IL-5; IL-10; IL-12(p70); IL-13; GM-CSF; IFN- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ . Levels of IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, and IgE in plasma were measured by using a multiplex Immunoglobulin Isotyping kit purchased to Biorad on the same Luminex platform. Microbiological identification was performed by standard diagnostic methods in each participating Hospital using respiratory cultures, blood cultures, and/or positive urinary antigen test to *Legionella pneumophila* or *Streptococcus pneumoniae*. Molecular diagnosis was used for influenza detection in respiratory samples, using the *pandemic Influenza A/H1N1 Detection Set* (Roche®) on a Roche 2.0 Light Cycler platform. Presence of other viruses was excluded by using the *Respiratory Viral Panel-XTAG RVP* (Abott®) on the Luminex platform.

**Statistical analysis:** The impact of clinical variables and immunoglobulin levels on mortality over time was assessed by using univariate Cox regression analysis. Those variables yielding  $p$  values <0.1 in the univariate analysis were further introduced in a multivariate analysis using the Wald test for forward selection. The accuracy of immunoglobulins for diagnosis of mortality was studied by calculating areas under the receiver operating characteristic (AUROC) curve. Correlation between immunoglobulin and cytokine levels was assessed by using the Spearman Karber test. Those correlations that were significant at the level of  $p < 0.05$  were represented in a heat map by using the JColorGrid software (University of California San Francisco and University of California Berkeley) [4]. All statistical tests were 2 sided, and  $p < 0.05$  was considered significant. Data analysis was performed using SPSS 20.0 software (IBM-SPSS, Chicago, IL).

**Table 1**

Clinical characteristics and immunoglobulin levels of the patients. Differences between groups were assessed using the  $\chi^2$  test for categorical variables and the Mann Whitney  $U$  test for continuous variables when appropriate. Continuous variables were expressed as median [interquartile rank]. Categorical variables are shown as  $n$  (% over column). COPD, chronic obstructive pulmonary disease; HBP, high blood pressure.

Characteristics	Survivors ( $n = 25$ )	Non survivors ( $n = 15$ )	$p$
Age (years)	52 [27]	58 [9]	n.s.
Sex			
Female	7 (28)	5 (33)	n.s.
Male	18 (72)	10 (66)	n.s.
Comorbidities			
Digestive disease	2 (8)	1 (6)	n.s.
Cardiovascular disease	4 (16)	3 (20)	n.s.
Neurological disease	3 (12)	0 (0)	n.s.
Renal disease	2 (8)	0 (0)	n.s.
Respiratory disease	8 (32)	3 (20)	n.s.
Immunosuppression	6 (24)	9 (60)	0.023
Diabetes	4 (16)	2 (13)	n.s.
HBP	8 (32)	4 (26)	n.s.
COPD	5 (20)	2 (13)	n.s.
Smoker (ever)	11 (44)	7 (46)	n.s.
Alcohol abuse	2 (8)	1 (6)	n.s.
IV drugs abuse	1 (4)	0 (0)	n.s.
Steroids	5 (20)	3 (20)	n.s.
Obesity	5 (20)	3 (20)	n.s.
Bacterial infection			
At ICU admission	5 (20)	5 (33)	n.s.
At any time	6 (24)	8 (53)	n.s.
IMV	14 (56)	15 (100)	0.004
NMV	10 (40)	1 (6)	n.s.
APACHE	13 [8]	21 [9]	0.001
Death time (days)	–	8 [24]	n.s.
PAFI	115 [139]	86 [71]	n.s.
Creatinine level (mg/dl)	1.05 [0]	1.16 [6]	n.s.
AST (U/l)	60 [56]	50 [104]	n.s.
ALT (U/l)	34 [33]	41 [68]	n.s.
WBC count ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	10.9 [9.9]	3.9 [18.1]	n.s.
Neutrophils ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	8.8 [8.7]	3.6 [8.4]	n.s.
IgG1 (mg/dl)	856 [674]	816 [2057]	n.s.
IgG2 (mg/dl)	69 [85]	34 [150]	n.s.
IgG3 (mg/dl)	102 [202]	66 [172]	n.s.
IgG4 (mg/dl)	43 [91]	23 [51]	n.s.
IgM (mg/dl)	91 [93]	50 [86]	0.049
IgA (mg/dl)	135 [84]	130 [136]	n.s.

#### 4. Results

15 patients died. The main causes of death were respiratory failure (60%) and multiorgan failure (26%). Survivors and non survivors were comparable in terms of age, sex and frequency and type of co-morbidities independently of their final outcome, with the exception of the presence of concomitant immunosuppression, which was more frequent in the non survivors group (Table 1). Causes of immunosuppression in the non survivors group were as follows: hematologic malignancy treated with chemotherapy in the last three months ( $n=6$ ); HIV infection ( $n=2$ ); lung cancer under treatment ( $n=1$ ). In turn, in the group of survivors, 1 patient had HIV infection, 1 patient had a hematologic malignancy treated with chemotherapy in the last three months, and 4 patients were receiving systemic steroids as treatment for an autoimmune disease.

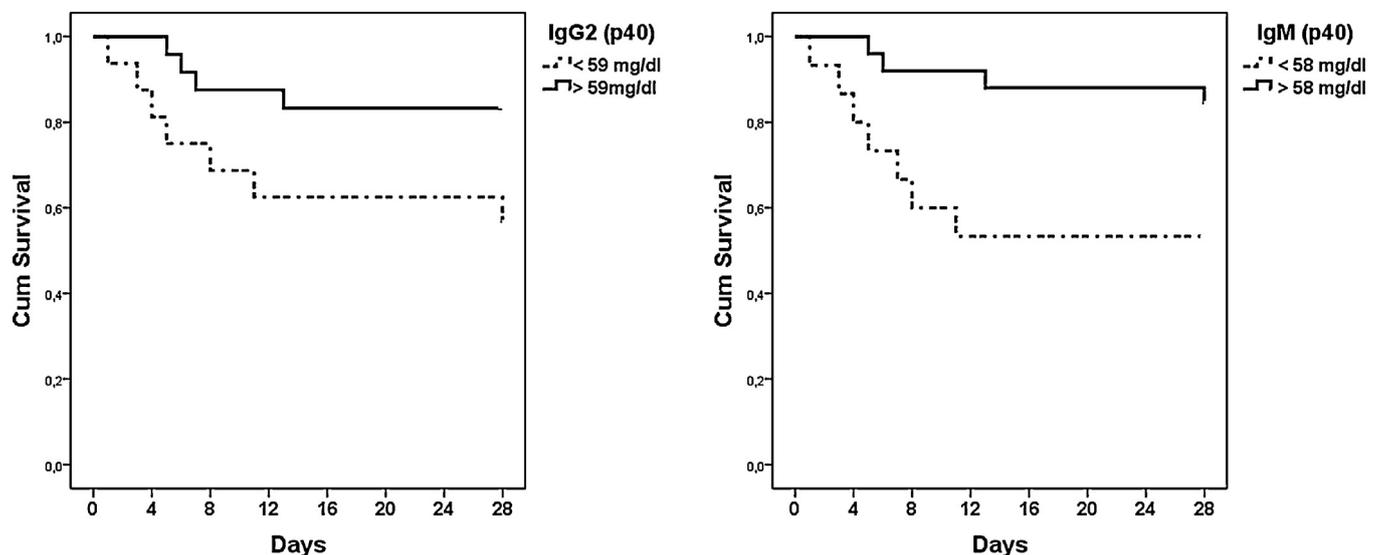
IgE levels were not detectable in the plasma of our patients. Non survivors showed lower levels of IgM (Table 1). IgM levels correlated inversely with the APACHE-II score at admission (correlation coefficient,  $p$ ): (-0.4, 0.012). As expected, immunosuppressed patients showed lower levels of IgG2 [(12.9, 95.6) vs. (75.6, 162.3)], IgG3 [(47.5, 157.3) vs. (115.1, 251.1)], IgM [(18.5, 79.8) vs. (91.5, 95.3)] and IgA [(87.8, 120.4) vs. (143.6, 82.2)] (median in mg/dl, interquartile rank in each group). 100% of non survivors needed of invasive mechanical ventilation, but ventilated patients had no significant differences in immunoglobulin levels compared with non ventilated ones (data not shown). Clinical variables introduced in the univariate Cox regression analysis were presence of COPD, obesity, diabetes, high blood pressure, prior immunosuppression, alcohol abuse, smoking habit, digestive disease, cardiovascular disease, neurological disease, renal disease, respiratory disease, autoimmune disease, bacterial infection at ICU admission, bacterial infection at any time during hospitalization at the ICU, and APACHE II score at ICU admission. Only the variables

prior immunosuppression and APACHE II score were associated with increased risk of mortality in this analysis. In the immunoglobulin side, levels of (IgG2) and (IgM) at ICU admission ( $\log$  values) showed a protective association against mortality in the univariate analysis. Kaplan Meier analysis showed that patients with levels of IgG2 and IgM < 59 and < 58 mg/dl respectively died earlier (Fig. 1). Multivariate Cox regression analysis showed that APACHE II score and IgM were the best predictors for outcome. AUROC analysis showed that IgM levels at ICU admission were a good test for diagnosing survival (area (CI95%),  $p$ : 0.77 (0.58–0.96) 0.009).

When cytokine levels were evaluated at admission to the ICU, IL-1 $\beta$ , IL-2 and IL-5 were not detectable in the patients' plasma. Non survivors showed higher levels of IL-6, IL-8, IL-10, G-CSF, MCP-1 and MIP-1 $\beta$  ( $p < 0.05$ , data not shown). Immunoglobulin levels correlated inversely with cytokine levels, being IgM the isotype showing the largest number of correlations, followed by IgG2 (Fig. 2),

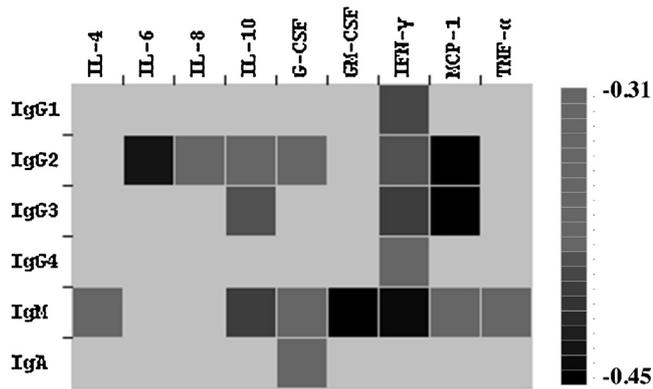
#### 5. Discussion

Our results demonstrate that IgM levels at admission to the ICU are a good prognostic factor in patients with severe disease caused by influenza A(H1N1)pdm09. Qiu et al. [5] demonstrated that IgM is critical in the early response against influenza infection and influences subsequent IgG antibody responses. Jayasekera et al. [6] reported that natural IgM in cooperation with the early components of the classical pathway of complement work in concert to neutralize influenza virus and may have a significant impact on the course of influenza viral pneumonia. In addition to its antiviral effect, IgM develops major immunomodulatory activities. IgM plays an important role in the clearance of oxidation-specific epitopes and in consequence may provide a generalized protective response against the consequences of oxidative stress produced in the context of critical illness [7]. As occurred for IgM, IgG2 showed a protective trend in our study. IgG2 accounts for approximately



	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)		p
		Lower	Upper	
APACHE	1,123	1,024	1,230	,013
IgM	,275	,095	,793	,017

Fig. 1. Up: Kaplan Meier curves for survival. Deciles from percentile 10 to percentile 90 of IgG2 and IgM were calculated and used to compare survival times in those patients with low or high concentrations of these parameters. The first decile showing significant differences between groups based upon the log-rank test (Mantel-Haenzel) was used as the cut-off point (percentile 40). Outcome for this analysis was time until death. Cum Surv indicates cumulative survival. Down: Multivariate Cox regression analysis for mortality. HR: hazard ratio. Time was censored at day 28.



**Fig. 2.** Heat map representing the Spearman coefficient for correlations between immunoglobulins and cytokine levels. Lightgray represents an exception color for no significant correlations.

one-quarter of the total IgG in the normal host. As already said, low levels of IgG2 have been reported to be associated with severe pandemic influenza infection [1].

In consonance with previous results, levels of immunoglobulins were associated inversely with cytokine levels at ICU admission. Presence of hypercytokinemia during influenza infection has been linked to poor control of viral replication [8,9]. Our results reinforce previous findings highlighting the central role of immunoglobulins in preventing un-controlled pro-inflammatory responses during influenza infection [2,10]. A limitation of our work was that immunosuppression was heavily represented in the non survivors' group. Immunosuppression was a common antecedent between patients suffering from severe influenza infection during the post-pandemic season (period during which the study was performed) [11]. Although our results should be validated in larger studies including both immunosuppressed and non immunosuppressed patients, they provide an interesting clue on the participation of IgM in the pathogenesis of severe influenza that deserves to be further explored.

Our results support a central role of IgM in preventing uncontrolled inflammatory response and mortality in severe pandemic influenza. Early assessment of IgM could contribute to guide clinical decisions in these patients.

## Funding

The authors acknowledge the support of "Instituto de Salud Carlos III- Fondo de Investigaciones Sanitarias, FIS" and Health Council,

Junta de Castilla y León (JCYL-IECSCYL-SACYL); Programa de Investigación Comisionada en Gripe, GR09/0021, GR09/0022.

## Competing interest

The authors declare no conflict of interest.

## Ethical approval

Approval of the study protocol for both the scientific and the ethical aspects was obtained from the Scientific Committee for Clinical Research of our hospital. The study has been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

## References

- [1] Gordon CL, Johnson PDR, Permezel M, Holmes NE, Gutteridge G, McDonald CF, et al. Association between severe pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection and immunoglobulin G(2) subclass deficiency. *Clin Infect Dis* 2010;50(marzo (5)):672–8.
- [2] Chan JF-W, To KK-W, Tse H, Lau CC-Y, Li IW-S, Hung IF-N, et al. The lower serum immunoglobulin G2 level in severe cases than in mild cases of pandemic H1N1 2009 influenza is associated with cytokine dysregulation. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18(febrero (2)):305–10.
- [3] Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007;44(marzo (Suppl. 2)):S27–72.
- [4] Joachimiak MP, Weisman JL, May BC. JColorGrid: software for the visualization of biological measurements. *BMC Bioinformatics* 2006;7:225.
- [5] Qiu C, Tian D, Wan Y, Zhang W, Qiu C, Zhu Z, et al. Early adaptive humoral immune responses and virus clearance in humans recently infected with pandemic 2009 H1N1 influenza virus. *PLoS ONE* 2011;6(8):e22603.
- [6] Jayasekera JP, Moseman EA, Carroll MC. Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity. *J Virol* 2007;81(abril (7)):3487–94.
- [7] Binder CJ. Natural IgM antibodies against oxidation-specific epitopes. *J Clin Immunol* 2010;30(mayo (Suppl. 1)):S56–60.
- [8] Almansa R, Anton A, Ramirez P, Martin-Loeches I, Banner D, Pumarola T, et al. Direct association between pharyngeal viral secretion and host cytokine response in severe pandemic influenza. *BMC Infect Dis* 2011;11:232.
- [9] De Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJD, Chau TNB, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 2006;12(octubre (10)):1203–7.
- [10] Zheng R, Qin X, Li Y, Yu X, Wang J, Tan M, et al. Imbalanced anti-H1N1 immunoglobulin subclasses and dysregulated cytokines in hospitalized pregnant women with 2009 H1N1 influenza and pneumonia in Shenyang, China. *Hum Immunol* 2012;73(septiembre (9)):906–11.
- [11] Martin-Loeches I, Díaz E, Vidaur L, Torres A, Laborda C, Granada R, et al. Pandemic and post-pandemic influenza A (H1N1) infection in critically ill patients. *Crit Care Lond Engl* 2011;15(6):R286.



## Letter to the Editor

### IgA level in plasma as a differential factor for influenza infection in severe viral pneumonia



We have recently reported the protective role of IgM in a cohort of patients with severe disease caused by influenza A(H1N1)pdm09 virus [1]. Here we compared levels of 17 cytokines and 7 immunoglobulin isotypes in the plasma of these patients against those of a cohort of patients suffering from pneumonia caused by other viruses. Cytokines and immunoglobulins were measured by using Biorad multiplex kits. Respiratory samples were screened for the presence of viruses by using the A(H1N1)pdm09 Detection Set (Roche®), the Respiratory Viral Panel-XTAG RVP (Abott®) or culturing them on Hep2/Vero/MDCK-SIAT cells. In the non-influenza group ( $n=20$ ), the viral aetiology was as follows: Enterovirus/Rhinovirus ( $n=7$ ), Metapneumovirus ( $n=6$ ), Respiratory Syncytial Virus ( $n=5$ ), Coronavirus NL63 ( $n=1$ ) and Herpesvirus ( $n=1$ ). Patients with influenza ( $n=38$ ) were younger (median (yrs), [interquartile rank, IQR]): influenza: (54 [19]); other viruses: 64 [19]) ( $p=0.005$  Mann-Whitney  $U$  test). The frequency of prior

immunosuppression was similar: 12 out of 38 (31.6%) for influenza; 5 out of 20 (25.0%) for non-influenza, ( $p=0.601$ , Chi squared Test). APACHE II score at admission was also similar in both groups: (median [IQR]): influenza: (18.5 [10]); other viruses: (16.5 [25]) ( $p=0.761$ ). Nevertheless, patients with influenza needed more frequently of invasive mechanical ventilation: influenza: 29 out of 38 (76.3%); other viruses: 10 out of 20 (50.0%),  $p=0.042$ . Frequency of bacterial co-infection at admission was also comparable: influenza: 7 out of 38 (18.4%); other viruses: 3 out of 20 (15.0%)  $p=0.772$ . The percentage of fatal cases was higher in the influenza group, although difference was not significant: influenza: 14 out of 38 (36.8%); other viruses: 3 out of 20 (15.0%)  $p=0.080$ . Patients with influenza showed higher levels of MCP-1 (282.6 [521.1]; 56.7[203.1]) and MIP-1 $\beta$  (83.8 [86.1]; 51.4 [49.7]), median (pg/ml), [IQR], indicating probably a worst control of the infection [2]. Conversely, influenza patients showed lower levels of IgA (133.9 [92.8]; 212.1 [308.9]), median (mg/dl), [IQR]) (Fig. 1). The area under the receiver operating characteristic (AUROC) curves for MCP-1, MIP-1 $\beta$  and IgA levels allowed distinguishing between influenza and non influenza infection (AUROC, [CI 95%],  $p$ ): MCP-1 (0.69,

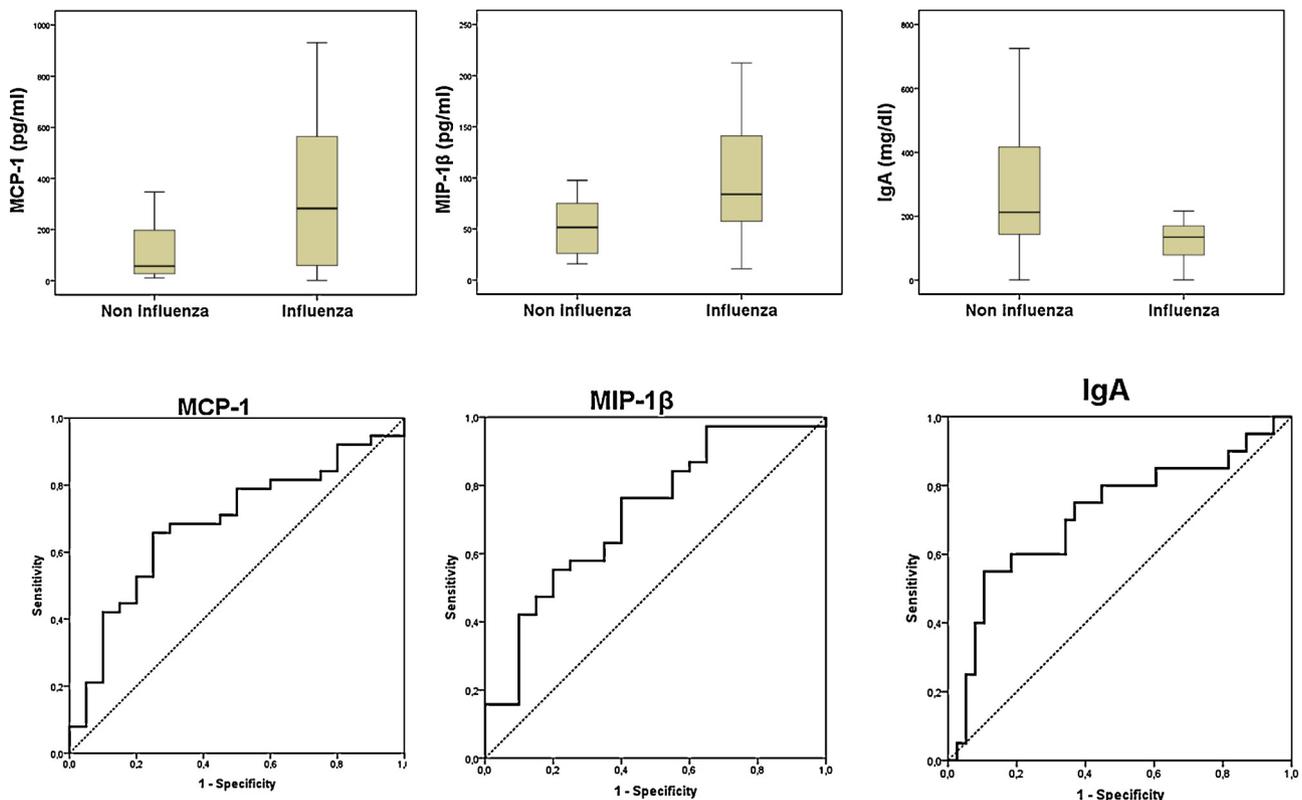


Fig. 1. Up: Box plots showing levels of chemokines and IgA in both groups ( $p < 0.05$ ). Down: AUROC for influenza (MCP-1, MIP-1 $\beta$ )/non-influenza diagnosis (IgA).

# Options for the Control of Influenza



Cape Town, South Africa  
5-10 September 2013

## Abstracts



For full instructions on how to best view and search this document,  
please see the READ ME Instructions included on this USB.

[www.controlinfluenza.com](http://www.controlinfluenza.com)



**isirv**  
International Society for  
Influenza and other  
Respiratory Virus Diseases

**LBA-P2-025****IgM as protective factor against uncontrolled inflammatory response and early mortality in critical post-pandemic influenza**

*R Ortiz de Lejarazu<sup>1\*</sup>, R Almansa<sup>1,2</sup>, L Socias<sup>3</sup>, M Justel<sup>1,2</sup>, C Lopez-Mestanza<sup>1</sup>, MC Gallegos<sup>4</sup>, V Fernandez<sup>4</sup>, I Martin-Loeches<sup>5</sup>, P Ramirez<sup>6</sup>, M Gordon<sup>6</sup>, D Andaluz<sup>7</sup>, S Rojo<sup>1</sup>, I Sanz<sup>1</sup>, A Estella<sup>8</sup>, A Loza<sup>9</sup>, C León<sup>9</sup>, J Blanco<sup>10</sup>, JA Berezo<sup>10</sup>, S Rosich<sup>11</sup>, JF Bermejo-Martin<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Valladolid National Influenza Centre, Microbiology and Immunology Service, Hospital Clínico Universitario SACYL, Spain; <sup>2</sup>Unidad de Investigación Biomédica del Clínico (ibC), Hospital Clínico Universitario. SACYL-IECSCYL, Valladolid, Spain; <sup>3</sup>Critical Care Department, Hospital Son Llatzer SEMICYUC, Palma de Mallorca, Spain; <sup>4</sup>Microbiology Service, Hospital Son Llatzer SEMICYUC, Palma de Mallorca, Spain; <sup>5</sup>Critical Care Department Parc Tauli, Hospital Universitari de Sabadell-CIBERES/SEMICYUC, Tarragona, Spain; <sup>6</sup>Critical Care Department, Hospital Universitario La Fe-SEMICYUC, Valencia, Spain; <sup>7</sup>Critical Care Medicine Service, Hospital Clínico Universitario. SACYL, SEMICYUC, Valladolid, Spain; <sup>8</sup>Intensive Care Department, Hospital del SAS de Jerez—SEMICYUC, Cádiz, Spain; <sup>9</sup>Critical Care Department, Hospital N Sra de Valme—SEMICYUC, Sevilla, Spain; <sup>10</sup>Critical Care Medicine Service, Hospital Universitario Río Hortega—SACYL/SEMICYUC, Valladolid, SPAIN; <sup>11</sup>Critical Care Department, Hospital Universitari Joan XXIII—SEMICYUC, Tarragona, Spain

**Background:** Lower levels of the IgG2 subclass associated with cytokine dysregulation have been associated with severe pandemic influenza. Nonetheless, there is no information on the role of immunoglobulin isotypes other than IgG in the critical illness caused by influenza infection. This work aimed to describe host immunoglobulin subclasses and isotype profiles in critical influenza infections during the 2010-2011 postpandemic season. **Materials and Methods:** Forty patients with severe respiratory failure and community-acquired pneumonia with confirmed laboratory influenza infection (polymerase chain reaction and/or cell culture) were recruited. Levels of IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, and 17 cytokines were measured by using multiplex assays on plasma samples collected in the first 24 hours following admission to the ICU. Association studies among immunoglobulin/cytokine levels, disease severity, and outcome were performed by using the Spearman test, Cox regression analysis and Kaplan-Meier curves. Multivariate analysis was adjusted by age, sex, APACHE score, immunosuppression, and bacterial infection. **Results:** Fifteen patients died. Concomitant immunosuppression was more frequent in nonsurvivors than in survivors (N = 9 and 3, respectively). Patients showing immunosuppression had lower levels of IgG2 and IgM and higher levels of IL-6, IL-8, and G-CSF than nonimmunosuppressed patients. Correlation studies revealed that the IgG2 and IgM levels were inversely associated with the APACHE score. IgM correlated inversely with 7 proinflammatory/immunomodulatory cytokines. On the contrary, cytokines levels were directly associated with severity. Results of Cox regression analysis for mortality censored at day 28 following ICU admission showed that IgM had a protective effect against mortality at 28 days, whereas IL-8, G-CSF, MCP-1, MIP-1 $\beta$  behaved as risk factors. **Conclusions:** This study showed that IgM in critically ill patients is a protective factor in postpandemic influenza, preventing uncontrolled hypercytokinemia, severe disease, and fatal outcome. **Acknowledgments:** The authors acknowledge the support of "Instituto de Salud Carlos III—Fondo de Investigaciones Sanitarias and Health Council, Junta de Castilla y León (JCYL-IECSCYL-SACYL): Programa de Investigación Comisionada en Gripe, GR09/0021, GR09/0022.

[0.54–0.82] 0.021); MIP-1 $\beta$  (0.71, [0.57–0.85] 0.007); IgA (0.71, [0.56–0.86] 0.008) (Fig. 1).

Local IgA in the respiratory mucosa has been shown to play an important protective role in the infection caused by respiratory viruses [3,4]. However the role played by systemic IgA in this context is not well known. This work evidences for the first time the existence of lower levels of plasma IgA in patients with viral pneumonia caused by influenza. The potential of IgA in determining viral aetiology along with its participation in the pathogenic events in this disease merits further investigation.

## Funding

The authors acknowledge the support of “Instituto de Salud Carlos III – Fondo de Investigaciones Sanitarias, FIS” and Health Council, Junta de Castilla y León (JCYL-IECSCYL-SACYL): Programa de Investigación Comisionada en Gripe, GR09/0021, GR09/0022.

## Competing interest

The authors declare no conflict of interest.

## Ethical approval

Approval of the study protocol for both the scientific and the ethical aspects was obtained from the Scientific Committee for Clinical Research of our hospital. The study has been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

## Acknowledgements

The authors thank Lucia Rico and Verónica Iglesias for their support with laboratory work and David Banner for language reviewing of the manuscript.

## References

- [1] Justel M, Socias L, Almansa R, Ramírez P, Gallegos MC, Fernandez V, et al. IgM levels in plasma predict outcome in severe pandemic influenza. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 2013;58(de november de (3)):564–7.
- [2] Almansa R, Anton A, Ramirez P, Martin-Loeches I, Banner D, Pumarola T, et al. Direct association between pharyngeal viral secretion and host cytokine response in severe pandemic influenza. *BMC Infect Dis* 2011;11:232.
- [3] Van Riet E, Ainaí A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. *Vaccine* 2012;30(de agosto de (40)):5893–900.
- [4] Dubois ME, Yoshihara P, Slifka MK. Antibody-mediated protection against respiratory viral infection. *Semin Respir Crit Care Med* 2005;26(diciembre de (6)):635–42.

Raquel Almansa<sup>1,2</sup>  
*Unidad de Investigación Biomédica, Hospital Clínico  
 Universitario de Valladolid (ibC), SACYL/IECSCYL,  
 Avda Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain*

Mar Justel<sup>1,2</sup>  
*Servicio de Microbiología, Hospital Clínico  
 Universitario de Valladolid, SACYL, Avda Ramón y  
 Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain*

Lorenzo Socias<sup>3</sup>  
*Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Son Llatzer,  
 SEMICYUC, Ctra. Manacor, km 4, 07198 Palma de  
 Mallorca, Spain*

Paula Ramírez<sup>4</sup>  
*Servicio de Medicina Intensiva, Hospital  
 Universitario y Politécnico La Fe, SEMICYUC, Valencia,  
 Bulevar del Sur, 46026 Valencia, Spain*

David Andaluz-Ojeda<sup>2</sup>  
*Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Clínico  
 Universitario de Valladolid, SEMICYUC, SACYL, Avda  
 Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain*

Angel Estella<sup>5</sup>  
*Servicio de Medicina Intensiva, Hospital de Jerez, SAS,  
 SEMICYUC, Ronda de Circunvalacion, s/n, Jerez, Spain*

Ana Loza<sup>6</sup>  
*Servicio de Medicina Intensiva. Hospital Nuestra  
 Señora de Valme, SEMICYUC, Carretera Madrid-Cádiz  
 (Pol. Ind. La Palmera), Km 548, 41014 Sevilla, Spain*

Jesús Blanco<sup>6</sup>  
 Jose Ángel Berezo<sup>6</sup>  
*Servicio de Medicina Intensiva. Hospital  
 Universitario Rio Hortega, SEMICYUC, SACYL, Centro  
 de investigación en red de enfermedades  
 respiratorias, CIBERES, Valladolid, Dulzaina 2, 47012  
 Valladolid, Spain*

Sara Rosich<sup>7</sup>  
*Servicio de Medicina Intensiva. Hospital Universitari  
 Joan XXIII, SEMICYUC, Mallfre Guasch 4, 43007  
 Tarragona, Spain*

Catia Cillóniz  
 Antoni Torres<sup>8</sup>  
*Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERES, Barcelona, Spain*

Raul Ortiz de Lejarazu<sup>2</sup>  
*Servicio de Microbiología, Hospital Clínico  
 Universitario de Valladolid, SACYL, Avda Ramón y  
 Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain*

Ignacio Martin-Loeches<sup>9</sup>  
*Centro de Críticos, Corporación Sanitaria y  
 Universitaria Parc Taulí – Hospital de Sabadell, CIBER  
 Enfermedades Infecciosas, SEMICYUC, Parc Taulí 1,  
 08208 Sabadell, Spain*

Jesus F. Bermejo-Martin\*  
*Unidad de Investigación Biomédica, Hospital Clínico  
 Universitario de Valladolid (ibC), SACYL/IECSCYL,  
 Avda Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, Spain*

\* Corresponding author. Tel.: +34 983420000x383;  
 fax: +34 983420040.

E-mail addresses: [jfbermejo@saludcastillayleon.es](mailto:jfbermejo@saludcastillayleon.es),  
[berinmuno@hotmail.com](mailto:berinmuno@hotmail.com) (J.F. Bermejo-Martin)

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Tel.: +34 983420000.

<sup>3</sup> Tel.: +34 871 202 000.

<sup>4</sup> Tel.: +34 961 24 40 00.

<sup>5</sup> Tel.: +34 956032000.

<sup>6</sup> Tel.: +34 955 01 50 00.

<sup>7</sup> Tel.: +34 977 29 58 00.

<sup>8</sup> Tel.: +34 93 312 94 11.

<sup>9</sup> Tel.: +34 93 723 18 18.

23 October 2013

# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Volumen 32, Especial Congreso 1, Abril 2014

Publicación mensual



PUBLICACIÓN OFICIAL  
DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA  
DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS  
Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

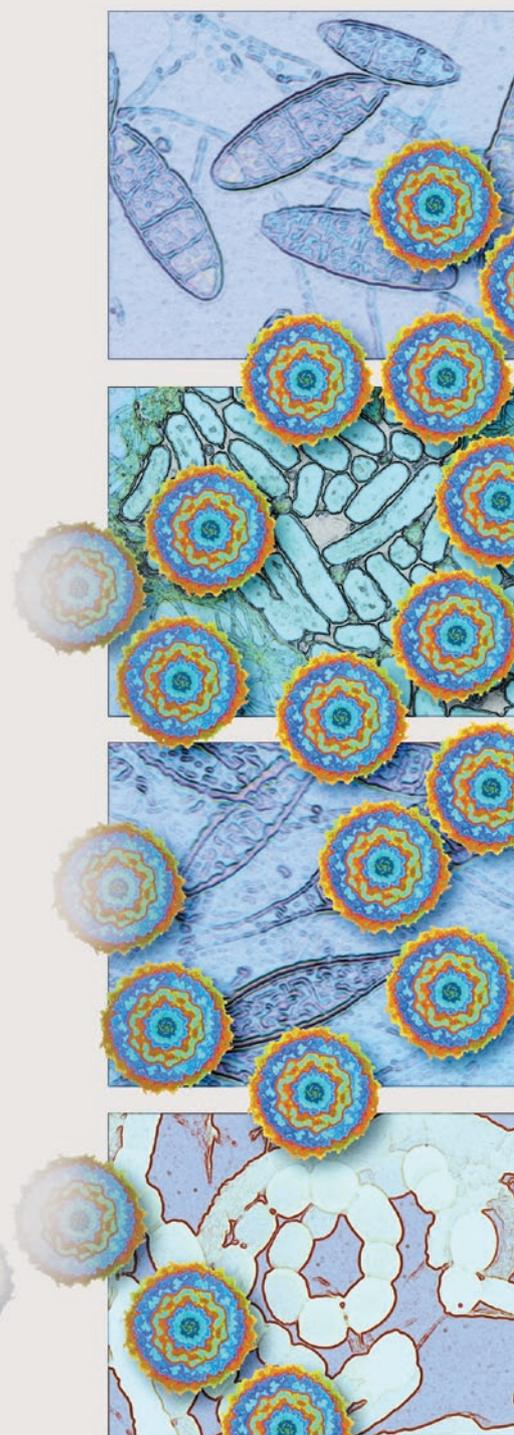
XVIII Congreso de la Sociedad Española de  
Enfermedades Infecciosas y Microbiología  
Clínica (SEIMC)

Valencia, 9-11 de abril de 2014



[www.elsevier.es/eimc](http://www.elsevier.es/eimc)

Incluida en: Index Medicus/MEDLINE  
Excerpta Medica/EMBASE  
Current Contents/Clinical Medicine  
ISI Alerting Services  
Science Citation Index-Expanded  
Journal Citation Reports  
SCOPUS



tales de la Comunitat Valenciana. El cribado se realizó de lunes a sábado en todas las admisiones por urgencias de las 24-48 horas previas. Se obtuvieron frotis nasofaríngeos y nasales (< 14 años) o faríngeos ( $\geq$  14 años). Se llevó a cabo la detección de 14 virus respiratorios, en un laboratorio centralizado, mediante RT-PCR multiplex. De forma prospectiva y sistemática se seleccionaron aislados gripe A y gripe B y se secuenció el gen completo de la hemaglutinina, para compararlo con el de aislados de referencia mediante análisis filogenético.

**Resultados:** De 1.034 pacientes incluidos en el estudio, en 510 se detectó como mínimo algún virus por RT-PCR, de los que 242 fueron positivos para gripe. Observamos dos olas, la primera de gripe B y la segunda de gripe A. Casi todos los aislados de gripe B ( $n = 108$ ; 63%) pertenecían al linaje B-Yamagata, y unos pocos casos ( $n = 5$ ; 3%) fueron clasificados como B Victoria o B no tipado. El resto fueron A(H1N1)pdm09 ( $n = 85$ ; 35%) y sólo 5 A(H3N2). Los aislados de gripe B Yamagata (54 secuenciados) se distribuyeron en dos clados: (i) clado 2, B/Brisbane/3/2007-like, cercano a B/Massachusetts/02/2012; y clado 3, B/Wisconsin/1/10 (cepa vacunal)-like, cercano a B/England/709/2012. La mayoría de los virus A(H1N1)pdm09 (37 secuenciados) pertenecían al clado 6 (A/St.Petersburg/27/2011-like), y sólo cuatro aislados pertenecían al clado 7 (A/St.Petersburg/100/2011-like). Un total de 18 (34%) vs 34 (65%) aislados de gripe B, o 12 (32%) vs 25 (68%) de gripe A, provenían de pacientes vacunados o no vacunados, respectivamente. No se encontró un agrupamiento filogenético diferencial de los aislados según el estado de vacunación, ni para gripe A, ni para gripe B.

**Conclusiones:** No se pudo relacionar ningún grupo filogenético de gripe B-Yamagata o A(H1N1)pdm09 con fallo vacunal en ingresos por enfermedad respiratoria grave durante la temporada 2012-13. Otros factores pueden contribuir a la poca efectividad de la vacuna en una porción sustancial de casos.

### 134. RELACIÓN ENTRE NIVELES PLASMÁTICOS DE INMUNOGLOBULINAS Y MORTALIDAD EN NEUMONÍA GRAVE CAUSADA POR VIRUS DE LA GRIPE A(H1N1)PDM09

M. Justel Álvarez<sup>1</sup>, R. Almansa<sup>1</sup>, L. Socias<sup>2</sup>, P. Ramírez<sup>3</sup>, M.C. Gallegos<sup>2</sup>, D. Andaluz<sup>1</sup>, L. Nogales<sup>1</sup>, S. Rojo<sup>1</sup>, J. Valles<sup>4</sup>, A. Estella<sup>5</sup>, A. Loza<sup>6</sup>, I.C. Lopez<sup>1</sup>, J. Blanco<sup>7</sup>, J.A. Berezo<sup>7</sup>, A. Torres<sup>8</sup>, R. Ortiz de Lejarazu Leonardo<sup>1</sup>, I. Martín-Loeches<sup>4</sup> y J.F. Bermejo-Martín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hospital Clínico Universitario. Valladolid. <sup>2</sup>Fundación Hospital Son Llàtzer. Palma de Mallorca. <sup>3</sup>Hospital Universitario La Fe. Valencia. <sup>4</sup>Corporació Sanitària ParcTaulí. Sabadell. <sup>5</sup>Hospital del SAS de Jerez de la Frontera. Jerez de la Frontera. <sup>6</sup>Hospital Universitario de Valme. Sevilla. <sup>7</sup>Hospital Universitario del Río Hortega. Valladolid. <sup>8</sup>Hospital Clínic de Barcelona. Barcelona.

**Introducción:** A pesar de que la pandemia causada por el virus de la gripe A(H1N1)pdm09 ha sido intensamente estudiada, es poco conocido el papel de los distintos isotipos y subclases de inmunoglobulinas en la neumonía grave causada por este virus. Se han descrito niveles bajos de IgG2 en casos graves de neumonía causada por el virus de la gripe A(H1N1)pdm09 y se han relacionado con disregulación de citoquinas, pero no se ha estudiado el papel de las inmunoglobulinas en el pronóstico de los pacientes con enfermedad crítica causada por dicho virus. El objetivo del presente estudio es evaluar la asociación entre niveles plasmáticos de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE y mortalidad en pacientes con enfermedad grave por gripe A (H1N1)pdm09.

**Material y métodos:** De noviembre-2010 hasta febrero-2011 se reclutaron pacientes ingresados en UCI con neumonía adquirida en

la comunidad causada por virus de la gripe A (H1N1)pdm09. Se recogió una muestra de sangre en las primeras 24 horas desde el ingreso. Los niveles de inmunoglobulinas IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, e IgE fueron medidos con el kit BioPlex Human Immunoglobulinotyping (Biorad) en plataforma Luminex. La identificación bacteriológica se realizó en muestras respiratorias, hemocultivos y mediante detección urinaria de antígenos. El diagnóstico virológico se realizó mediante los kits pandemic Influenza A/H1N1 Detection Set en plataforma 2.0 Light Cycler (Roche). La presencia de otros virus se excluyó usando el Respiratory Viral Panel-XTAG RVP en plataforma Luminex y mediante cultivo celular. El impacto de las variables clínicas y los niveles de inmunoglobulinas en la mortalidad se analizó mediante análisis de regresión de Cox. Las variables que presentaban valores  $p < 0,1$  en el análisis univariante se incluyeron en un análisis multivariante. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 20.0.

**Resultados:** Se reclutaron 40 pacientes; de los cuales fallecieron 15 (37.5%). Las principales causas de muerte fueron fallo respiratorio (60%) y fracaso multiorgánico (26%). El grupo de pacientes fallecidos presentaba con mayor frecuencia inmunosupresión, necesidad de ventilación mecánica, mayor score APACHE II al ingreso y menores niveles de IgM. Edad, sexo, score APACHE II, comorbilidades y niveles de inmunoglobulinas se introdujeron en el análisis univariante de Cox, las únicas asociadas con mortalidad fueron inmunosupresión y APACHE II, como factores de riesgo, e IgG2 e IgM (valores logaritmizados) como factores protectores. El análisis de regresión multivariante de Cox mostró que el score APACHE II y los niveles plasmáticos IgM son los mejores predictores de mortalidad. (Tabla 1)

**Conclusiones:** Los niveles de IgM en el momento de la admisión en la UCI son un buen indicador pronóstico en pacientes con neumonía grave por gripe A(H1N1)pdm09. La medición temprana de estos niveles podría contribuir a guiar las decisiones clínicas en estos pacientes. Además de los niveles de IgM, también los niveles de IgG2 muestran un papel protector en nuestra cohorte.

### 135. PREVALENCIA DE VIRUS SAFFOLD EN MUESTRAS RESPIRATORIAS PEDIÁTRICAS

P. Brañas, C. Prieto, M. García, J.R. Otero y L. Folgueira

Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid.

**Introducción y objetivos:** El virus Saffold (SAFV) fue identificado por primera vez en 2007, y fue incluido en el género *Cardiovirus* dentro de la familia *Picornaviridae*. Desde entonces, ha sido descrito en muestras respiratorias, fecales y de líquido cefalorraquídeo. También se han realizado estudios de seroprevalencia en distintas poblaciones. A pesar de todos los esfuerzos, su asociación con alguna patología en concreto continúa siendo motivo de discusión. El objetivo de nuestro trabajo fue identificar el virus SAFV en muestras respiratorias de población pediátrica y buscar su asociación con clínica respiratoria.

**Material y métodos:** Se realizó un estudio retrospectivo sobre muestras de aspirado nasofaríngeo de población infantil con clínica de infección respiratoria, recibidas en el Hospital 12 de Octubre (Madrid) durante 2004-2006. Se realizó cultivo convencional y shell-vial en las líneas celulares MRC-5, A-549 y MDCK, y se investigó la presencia de virus Influenza A y B, VRS, Parainfluenza 1, 2 y 3 y Adenovirus (MonofluoScreen, Bio-Rad). El ARN se obtuvo a partir de 140 microlitros de muestra respiratoria (QIAamp viral RNA kit, Qiagen) y se realizó retrotranscripción con random-hexámeros. Se utilizó una PCR a tiempo real con primers y sonda específicos de SAFV dirigidos frente a la región conservada 5'-UTR (CP797, CF723 y CR888) y un control interno para la detección de inhibidores de PCR. La amplificación se realizó en el LightCycler 480 II (Roche Molecular Biochemicals) con las condiciones: 10 min a 95 °C, y 50 ciclos de 15 s a 95 °C y 60 s a 60 °C. El producto de PCR se detectó mediante sondas TaqMan

**Tabla.** (Comunicación 134) Resultado del análisis multivariante de Cox

	Exp(B)	IC95%	Valor p	
APACHE	1,123	0,013	1,23	0,013
Log IgM	0,275	0,017	0,793	0,017

### 615. ESTUDIO DEL PERFIL PLASMÁTICO DE INMUNOGLOBULINAS Y CITOQUINAS EN PACIENTES CON NEUMONÍA GRAVE CAUSADA POR GRIPE Y OTROS VIRUS RESPIRATORIOS

M. Justel Álvarez<sup>1</sup>, R. Almansa<sup>1</sup>, L. Socías<sup>2</sup>, P. Ramírez<sup>3</sup>, D. Andaluz<sup>1</sup>, A. Estella<sup>4</sup>, A. Loza<sup>5</sup>, J. Blanco<sup>6</sup>, J.A. Berezo<sup>6</sup>, S. Rosich<sup>7</sup>, C. Cilloniz<sup>8</sup>, A. Torres<sup>8</sup>, I.C. López<sup>1</sup>, S. Rojo<sup>1</sup>, R. Ortiz de Lejarazu Leonardo<sup>1</sup>, I. Martín-Loeches<sup>9</sup> y J.F. Bermejo-Martín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hospital Clínico Universitario. Valladolid. <sup>2</sup>Fundación Hospital Son Llàtzer. Palma de Mallorca. <sup>3</sup>Hospital Universitario La Fe. Valencia. <sup>4</sup>Hospital del SAS de Jerez de la Frontera. Jerez de la Frontera. <sup>5</sup>Hospital Universitario de Valme. Sevilla. <sup>6</sup>Hospital Universitario del Río Hortega. Valladolid. <sup>7</sup>Hospital Universitari Joan XXIII. Tarragona. <sup>8</sup>Hospital Clínic de Barcelona. Barcelona. <sup>9</sup>Corporació Sanitària ParcTaulí. Sabadell.

**Introducción:** La etiología vírica de la neumonía adquirida en la comunidad se documenta en aproximadamente un 30% de los casos, siendo el virus de la gripe el más frecuentemente implicado. Se ha descrito relación entre niveles bajos de IgG2 y desregulación de citoquinas en pacientes infectados por gripe. Recientemente se ha descrito el papel protector de la IgM en gripe grave. No hay estudios acerca del papel de estas moléculas en la neumonía causada por otros virus respiratorios. El objetivo del presente estudio es analizar los patrones plasmáticos de inmunoglobulinas y citoquinas en pacientes con neumonía vírica grave.

**Material y métodos:** Se reclutaron pacientes con neumonía vírica ingresados en UCI. Se recogió una muestra de sangre en las primeras 24 horas tras el ingreso. Los niveles de citoquinas se analizaron usando el Bio-PlexProHumanCytokine 27-plex Assay (Bio-Rad), los niveles de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, e IgE fueron medidos usando el kit BioPlex Human ImmunoglobulinIsotyping Assay (Bio-Rad) ambos en plataforma Luminex. La identificación bacteriológica se realizó en cada hospital en muestras respiratorias, hemocultivos y test de detección urinaria de antígenos. El diagnóstico virológico se realizó mediante los kits pandemic Influenza A/H1N1 Detection Set en plataforma 2.0 LightCycler (Roche), Respiratory Viral Panel-XTAG RVP en plataforma Luminex y mediante cultivo celular. Las diferencias entre ambos grupos se analizaron mediante test de chi-cuadrado para variables categóricas y el test U de Mann-Whitney para variables continuas. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 20.0.

**Resultados:** Se incluyeron 38 pacientes con gripe y 20 pacientes con otros virus. El grupo de pacientes con gripe era significativamente más joven, presentaba con más frecuencia patología respiratoria, hipertensión arterial, necesidad de ventilación mecánica invasiva, menor nivel de leucocitos y neutrófilos (tabla). Los niveles de inmunoglobulinas y citoquinas fueron similares excepto para la IgA, MCP-1 y MIP-1β (tabla).

**Conclusiones:** La IgA es un factor diferencial entre los pacientes con patología grave por gripe o virus no gripales, presentando niveles plasmáticos inferiores en los primeros. Las citoquinas MCP-1 y MIP-

**Tabla.** (Comunicación 615) Características clínicas y analíticas de los pacientes

	Gripe (n = 38)	Otros virus (n = 20)	Valor p
Edad	54 ± 19	64 ± 19	0,005
Patología respiratoria	11 (28)	11 (55)	0,034
Hipertensión	12 (31)	12 (60)	0,037
VMI	29 (76)	10 (50)	0,047
Leucocitos (× 10 <sup>3</sup> /μL)	8,8 ± 11,2	17,3 ± 10,8	0,001
Neutrófilos (× 10 <sup>3</sup> /μL)	6,9 ± 10	15,7 ± 9,7	< 0,001
IgG1 (mg/dL)	807,8 ± 964,8	734,5 ± 880,8	n.s.
IgG (mg/dL)	64,8 ± 118,1	89 ± 131	n.s.
IgG3 (mg/dL)	102,5 ± 165	120,6 ± 154,3	n.s.
IgG4 (mg/dL)	26,3 ± 74,5	33,8 ± 76,3	n.s.
IgM (mg/dL)	66 ± 80,7	79,4 ± 58,6	n.s.
IgA (mg/dL)	133,9 ± 98,8	212,1 ± 308,9	0,008
MCP-1 (pg/ml)	282,6 ± 521	53,7 ± 203,1	0,021
MIP-1β (pg/ml)	83,8 ± 86,1	51,4 ± 49,7	0,007

\*Valores expresados como mediana ± rango intercuartil o N° (%). n.s. = no significativo.

1β, relacionadas con respuesta inflamatoria, presentan niveles más elevados en estos pacientes, indicando probablemente, un peor control de la infección.

### 616. EFECTO DEL USO DE APÓSITOS CON GEL DE CLORHEXIDINA INTEGRADO (TEGADERM™ CHG) SOBRE LA FORMACIÓN DE BIOFILM EN LAS SUPERFICIES EXOLUMINAL Y ENDOLUMINAL DE LOS CATÉTERES VENOSOS CENTRALES. ESTUDIO CLÍNICO DE CASOS CONSECUTIVOS

M. Gordón Sahuquillo, A. Cortés Herrera, M.T. Gisbert García, A. van Bommel Ganem, E. Villarreal Tello, R. Gimeno Costa, J. Mazarrota Palomares, J.C. Mateo Pardo, S. Meseguer Cuenca, E.M. González Barbera, C. Pérez Bellés, J. Bonastre Mora y P. Ramírez Gallego

Hospital Universitario La Fe. Valencia.

**Introducción:** La colonización de los catéteres venosos centrales (CVC) temporales de los pacientes críticos en forma de biofilm parece estar directamente relacionados con el desarrollo de bacteriemia asociada a catéter (BRC). Realizamos este estudio con el objetivo de estudiar el efecto de los apósitos con gel de clorhexidina integrado sobre la colonización del CVC y la formación de biofilm.

**Material y métodos:** Se incluyeron en el estudio a todos los pacientes mayores de 18 años ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Universitario y Politécnico la Fe, portadores de un CVC con una duración prevista superior a 48 horas. Se establecieron dos líneas de tratamiento: 1) medidas de higiene y asepsia habituales; y 2) utilización del apósito transparente semipermeable con gel de clorhexidina integrado (Tegaderm™ CHG) sobre el punto de entrada del CVC desde el momento de su inserción, con recambio del apósito cada 7 días o en caso de pérdida de integridad. Los pacientes fueron asignados de forma secuencial a cada una de las dos líneas de tratamiento. Se realizó un seguimiento clínico y microbiológico cada 3 días (cultivos de sangre e hisopado de la superficie interna de las conexiones del catéter). En el momento de retirada del CVC, se analizó la formación de biofilm sobre su superficie interna y externa mediante cultivo (técnica de Maki y sonicación) y microscopio electrónico de barrido. Se calcularon frecuencias relativas y absolutas para variables discretas. La comparación de poblaciones se realizó con la prueba  $\chi^2$ .

**Resultados:** Se incluyeron un total de 20 pacientes (11 casos y 9 controles). Se sospechó bacteriemia asociada a catéter en 2 de los pacientes del grupo de casos e infección del punto de entrada en 2 pacientes del grupo control, sin llegar al diagnóstico microbiológico de infección en ninguno de los casos. No se detectaron incidencias directamente relacionadas con el uso del apósito Tegaderm®. En general se obtuvo un mayor porcentaje de aislamientos microbiológicos en los hemocultivos y cultivos de la superficie interna del grupo control (30% vs 11,25%; p 0,546), fundamentalmente en los catéteres de más de 7 días de permanencia (31% vs 4,5% p 0,639), sin alcanzar significación estadística, mayoritariamente *Staphylococcus coagulasa* negativo y *Enterococcus*. Los cultivos de las puntas de los catéteres venosos centrales incluidos en el estudio fueron negativos en todos los pacientes. En catéteres de menos de 7 días de permanencia, se observó tendencia a presentar menor cantidad de biofilm sobre la superficie exoluminal en el grupo de casos, sin alcanzar significación estadística (16,7% vs 66,6%; p 0,223).

**Conclusiones:** Nuestros resultados muestran beneficios con la utilización del apósito Tegaderm® sobre el punto de inserción de los CVC temporales en pacientes críticos. El grupo de casos presentó un menor número de hemocultivos positivos y una tendencia a la reducción de la formación de biofilm sobre la superficie exoluminal de la punta en los primeros 7 días de permanencia. El pequeño tamaño muestral pudo impedir la obtención de conclusiones estadísticamente significativas.

*Anexos*

---



## **Anexo 1**

Proyecto de investigación: “ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A VIRUS EN NEUMONÍA GRAVE”

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO**

Yo (nombre y apellidos) \_\_\_\_\_

He recibido suficiente información sobre el estudio y la he comprendido, por lo que presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

En.....a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Fdo.: \_\_\_\_\_ Fdo.: \_\_\_\_\_

El paciente o representante legal

El médico responsable del paciente

## Anexo 2

### Patient Case Report Form

#### Demographic details

Sex:	Male <input type="checkbox"/> Female <input type="checkbox"/>
Age:	___ (yrs)
Body Weight:	___ kg <input type="checkbox"/>
Height:	___ cm <input type="checkbox"/>

#### Chronic Co-morbidities/Conditions

Diabetes (Type I or II)	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Valvular Heart Disease	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Ischemic Heart Disease / Angina	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Bronchopulmonary Dysplasia	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Congenital Heart Disease	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Asthma	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Arrhythmia	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Other Chronic Lung Disease	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
COPD	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Cerebrovascular Disease	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Smoker (ever)	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Other Neurological Disease	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Hypertension	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Hematologic Malignancy	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Peripheral Vascular Disease	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Cirrhosis of the Liver	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Metastatic Solid Cancer	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Cerebral Palsy / Development Delay	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Gastrointestinal Disease	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Spina Bifida/spinal paralysis	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Seizure Disorder	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Systemic Autoimmune Disease	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Scoliosis	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Immunosuppression	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Renal Insufficiency (>1.5 norm)	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Steroids	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Dialysis dependence	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Chemotherapy	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Post-partum (<1 month)	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Alcohol abuse	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Congestive Heart Failure	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	IV drug abuse	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Obesity	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Other Co-morbidities (specify)	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>

#### Time Course and Outcomes

Date of onset of initial symptoms	__/__/__ (mm/dd/yr)
Hospital admission date	__/__/__ (mm/dd/yr)
ICU admission date (=day 1)	__/__/__ (mm/dd/yr)
Invasive mechanical ventilation in hospital?	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Non-invasive mechanical ventilation in hospital?	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Date any ventilation initiated	__/__/__ (mm/dd/yr)
Date final extubation (i.e. not re-intubated and not receiving non-invasive ventilation within 48h post)	__/__/__ (mm/dd/yr)
Date of live ICU discharge (if applicable)	__/__/__ (mm/dd/yr)
Date of live hospital discharge (if applicable)	__/__/__ (mm/dd/yr)
Date of Death (if applicable)	__/__/__ (mm/dd/yr)
Cause of death (if applicable)	Primary respiratory <input type="checkbox"/> Non-respiratory <input type="checkbox"/> Specify Cause _____

### Treatments (at any time ICU)

Treatment	dose (mg/day)	Date (mm/dd/yr)
Oseltamivir (Tamiflu)		Start: __/__/__ Stop: __/__/__
	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Start: __/__/__ Stop: __/__/__
All IV antibiotics		Start: __/__/__ Stop: __/__/__
	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Start: __/__/__ Stop: __/__/__
Corticosteroids	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Start: __/__/__ Stop: __/__/__
Specify: _		Dose: _mg/day

**Microbiology**

	Organism	Specimen Date (mm/dd/yr)
Positive <i>blood</i> culture (specify organism any point in admission) Exclude coag negative staph and other skin contaminants		__/__/__
		__/__/__
Positive <i>respiratory</i> culture (specify organism at any point in admission)		__/__/__

*All measurements at the first 24 hours after ICU admission*

		Date: __/__/__ (mm/dd/yr)	
FiO <sub>2</sub>	(0.21-1.0)		
PaO <sub>2</sub>	mmHg <input type="checkbox"/> kPa <input type="checkbox"/>		
Chest X-ray (no. quadrants/unilat-bilateral) e.g. 1U			
Creatinine level <input type="checkbox"/> umol/L			
AST/SGOT			
ALT/SGPT			
White Blood Cell Count			
Leucocytes		%	Total
Neutrophils		%	Total
Lymphocytes		%	Total

**APACHE:**

## *Bibliografía*

---



---

**Bibliografía**

---

1. Mathers C., Boerma T., Ma Fat D. WHO- The global burden of disease: 2004 update [Internet]. [citado 1 de julio de 2015]. Recuperado a partir de: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/2004\\_report\\_update/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/)
2. Gómez JG, Gobernado M. Enfoque clínico de los grandes síndromes infecciosos. 5ª ed. Ergon; 2013. 811 p.
3. Macedo M., Mateos S. Infecciones respiratorias. Temas de Bacteriología y Virología Médica. Oficina del Libro FEFMUR. Universidad de la República Facultad de Medicina; 2006.
4. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clin Infect Dis*. 2007;44(Supplement 2):S27-72.
5. Torres A, Peetermans WE, Viegi G, Blasi F. Risk factors for community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *Thorax*. 2013;68(11):1057-65.
6. Torres A, Barberán J, Falguera M, Menéndez R, Molina J, Olaechea P, et al., Grupo de la Guía Multidisciplinar para el Manejo de la Neumonía Adquirida en la Comunidad. [Multidisciplinary guidelines for the management of community-acquired pneumonia]. *Med Clin Barc*. 2013;140(5):223.e1-223.e19.
7. Pachon J, Prados MD, Capote F, Cuello JA, Garnacho J, Verano A. Severe community-acquired pneumonia. Etiology, prognosis, and treatment. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142(2):369-73.
8. Welte T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax*. 2010;67(1):71-9.
9. Radigan KA, Wunderink RG. Epidemic viral pneumonia and other emerging pathogens. *Clin Chest Med*. 2011;32(3):451-67.
10. Thomas J. Epidemiology, pathogenesis, and microbiology of community-acquired pneumonia in adults [Internet]. [citado 1 de julio de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-pathogenesis-and-microbiology-of-community-acquired-pneumonia-in-adults>
11. Wunderink RG, Waterer GW. Community-acquired pneumonia: pathophysiology and host factors with focus on possible new approaches to management of lower respiratory tract infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2004;18(4):743-59, vii.
12. Mason CM, Nelson S. Pulmonary host defenses and factors predisposing to lung infection. *Clin Chest Med*. 2005;26(1):11-7.

13. Mandell, Douglas, Bennett. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7<sup>a</sup> ed. Elsevier; 2010. 4155 p.
14. Gil D. R, Fernández V. P, Sabbagh P. E. Diagnóstico clínico-radiológico de la neumonía del adulto adquirida en la comunidad. Rev Chil Infectol. 2005;22:s26-231.
15. Reimann HA. An acute infection of the respiratory tract with atypical pneumonia. JAMA J Am Med Assoc. 1984;251(7):936-44.
16. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, et al. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. N Engl J Med. 1997;336(4):243-50.
17. Bartlett J. Diagnostic approach to community-acquired pneumonia in adults [Internet]. [citado 1 de julio de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.uptodate.com/contents/diagnostic-approach-to-community-acquired-pneumonia-in-adults>
18. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. Lancet Lond Engl. 2011;377(9773):1264-75.
19. Lieberman D, Shimoni A, Shemer-Avni Y, Keren-Naos A, Shtainberg R, Lieberman D. Respiratory viruses in adults with community-acquired pneumonia. Chest. 2010;138(4):811-6.
20. Oosterheert JJ, van Loon AM, Schuurman R, Hoepelman AIM, Hak E, Thijsen S, et al. Impact of rapid detection of viral and atypical bacterial pathogens by real-time polymerase chain reaction for patients with lower respiratory tract infection. Clin Infect Dis. 2005;41(10):1438-44.
21. Jennings LC, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Laing RTR, Werno AM, et al. Incidence and characteristics of viral community-acquired pneumonia in adults. Thorax. 2008;63(1):42-8.
22. Liu Y, Chen M, Gao Y, Cao B, Dong J, Zhang Y, et al. [Etiologic characteristics of adult patients with community-acquired pneumonia in Beijing]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 9 de julio de 2013;93(26):2043-7.
23. Versalovic J., Carrol. K., Funke G., Jorgensen J., Landry ML., Warnock D. Manual of clinical microbiology. 10.<sup>a</sup> ed. ASM Press;
24. Dolin R. Epidemiology of influenza [Internet]. [citado 1 de julio de 2015]. Recuperado a partir de: [http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-of-influenza?source=see\\_link](http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-of-influenza?source=see_link)
25. Hirst GK. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. Science. 1941;94(2427):22-3.
26. Eiros JM., Casas I., Ortiz de Lejarazu R., Pérez P., Pozo F., Ruiz G., et al. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por virus respiratorios. [citado 1 de julio de 2015]; Recuperado a partir de: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap29.pdf>

27. Yasuda J, Nakada S, Kato A, Toyoda T, Ishihama A. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology*. 1993;196(1):249-55.
28. Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*. 1992;69(3):517-28.
29. Varghese JN, Laver WG, Colman PM. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature*. 1983;303(5912):35-40.
30. Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*. 1988;333(6172):426-31.
31. Reina J. Factores de virulencia y patogenicidad en las cepas gripales (virus influenza tipo A) aviares y humanas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002;20(7):346-53.
32. Resa-Infante P, Jorba N, Coloma R, Ortín J. The influenza RNA synthesis machine. *RNA Biol*. 2011;8(2):207-15.
33. Gerber M, Isel C, Moules V, Marquet R. Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment. *Trends Microbiol*. 2014;22(8):446-55.
34. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet*. 2003;362(9397):1733-45.
35. Steinhauer DA, Skehel JJ. Genetics of influenza viruses. *Annu Rev Genet*. 2002;36:305-32.
36. Potter C. A history of influenza. *J Appl Microbiol*. 2001;91(4):572-9.
37. Fouchier RAM, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SAG, Munster V, et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(5):1356-61.
38. Uyeki TM, Chong Y-H, Katz JM, Lim W, Ho Y-Y, Wang SS, et al. Lack of evidence for human-to-human transmission of avian influenza A (H9N2) viruses in Hong Kong, China 1999. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(2):154-9.
39. Justel Álvarez M, Sanz Muñoz I, Rojo Rello S, Ortiz de Lejarazu Leonardo R. ¿Se adelanta la gripe? ¿Cómo informo? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(8):548-9.
40. Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog*. 2007;3(10):1470-6.
41. Bridges CB, Kuehnert MJ, Hall CB. Transmission of influenza: implications for control in health care settings. *Clin Infect Dis*. 2003;37(8):1094-101.
42. WHO Europe: Influenza A (H1N1): pandemic alert phase 6 declared, of moderate severity [Internet]. [citado 15 de junio de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/influenza/pandemic-influenza/pandemic-h1n1-2009/archive-who-europe-news-and-updates/influenza-a-h1n1-pandemic-alert-phase-6-declared,-of-moderate-severity>

43. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Swine influenza A (H1N1) infection in two children--Southern California, March-April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009;58(15):400-2.
44. Dawood FS, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med.* 2009;360(25):2605-15.
45. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science.* 2009;325(5937):197-201.
46. Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, Hanage WP, Van Kerkhove MD, Hollingsworth TD, et al., WHO Rapid Pandemic Assessment Collaboration. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science.* 2009;324(5934):1557-61.
47. WHO: Pandemic (H1N1) 2009 - update 60 [Internet]. [citado 30 de agosto de 2014]. Recuperado a partir de: [http://www.who.int/csr/don/2009\\_08\\_04/en/](http://www.who.int/csr/don/2009_08_04/en/)
48. WHO | Pandemic (H1N1) 2009 - update 112 [Internet]. WHO. [citado 10 de noviembre de 2014]. Recuperado a partir de: [http://www.who.int/csr/don/2010\\_08\\_06/en/](http://www.who.int/csr/don/2010_08_06/en/)
49. WHO. Review of the 2010–2011 winter influenza season, northern hemisphere. *Wkly Epidemiol Rec Health Sect Secr Leag Nations.* 2011;86(22):222-7.
50. Viasus D, Antón A, Pumarola T, Carratalà J. Influenza A(H1N1)pdm09: beyond the pandemic. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30:54-7.
51. Martin-Loeches I, Diaz E, Vidaur L, Torres A, Laborda C, Granada R, et al. Pandemic and post-pandemic Influenza A (H1N1) infection in critically ill patients. *Crit Care.* 2011;15(6):R286.
52. Rodríguez A, Martin-Loeches I, Bonastre J, Olaechea P, Alvarez-Lerma F, Zaragoza R, et al., SEMICYUC-CIBERES-REIPI working group. First influenza season after the 2009 pandemic influenza: report of the first 300 ICU admissions in Spain. *Med Intensiva.* 2011;35(4):208-16.
53. Dolin R. Clinical manifestations of seasonal influenza in adults [Internet]. [citado 1 de febrero de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-of-seasonal-influenza-in-adults>
54. Ramsey CD, Kumar A. Influenza and endemic viral pneumonia. *Crit Care Clin.* 2013;29(4):1069-86.
55. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol.* 1999;73(3):1941-8.
56. Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA, Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2006;55(8):1-20.

57. Johnson KM, Bloom HH, Forsyth B, Mufson MA, Webb PA, Chanock RM. The role of enteroviruses in respiratory disease. *Am Rev Respir Dis.* 1963;88:SUPPL 240-5.
58. ViralZone [Internet]. [citado 30 de enero de 2015]. Recuperado a partir de: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/97.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html)
59. Jacobs SE, Lamson DM, St. George K, Walsh TJ. Human Rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1):135-62.
60. Gern JE. The ABCs of Rhinoviruses, Wheezing, and Asthma. *J Virol.* 2010;84(15):7418-26.
61. 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(17):1749-59.
62. Walsh EE, McConnochie KM, Long CE, Hall CB. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *J Infect Dis.* 1997;175(4):814-20.
63. Gilca R, De Serres G, Tremblay M, Vachon M-L, Leblanc E, Bergeron MG, et al. Distribution and clinical impact of human respiratory syncytial virus genotypes in hospitalized children over 2 winter seasons. *J Infect Dis.* 2006;193(1):54-8.
64. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Respiratory syncytial virus activity-- United States, July 2011-January 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013;62(8):141-4.
65. Peret TC, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, et al. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect Dis.* 2000;181(6):1891-6.
66. Simoes EAF. Environmental and demographic risk factors for respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. *J Pediatr.* 2003;143(5 Suppl):S118-26.
67. Houben ML, Bont L, Wilbrink B, Belderbos ME, Kimpen JLL, Visser GHA, et al. Clinical prediction rule for RSV bronchiolitis in healthy newborns: prognostic birth cohort study. *Pediatrics.* 2011;127(1):35-41.
68. Boyce TG, Mellen BG, Mitchel EF, Wright PF, Griffin MR. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in medicaid. *J Pediatr.* 2000;137(6):865-70.
69. El Saleeby CM, Somes GW, DeVincenzo JP, Gaur AH. Risk factors for severe respiratory syncytial virus disease in children with cancer: the importance of lymphopenia and young age. *Pediatrics.* 2008;121(2):235-43.
70. Hall CB, Powell KR, MacDonald NE, Gala CL, Menegus ME, Suffin SC, et al. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *N Engl J Med.* 1986;315(2):77-81.
71. Falsey AR, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(3):371-84.
72. Walsh EE, Peterson DR, Falsey AR. Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection in elderly persons. *J Infect Dis.* 15 de enero de 2004;189(2):233-8.

73. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med*. 2009;360(6):588-98.
74. Lee N, Lui GCY, Wong KT, Li TCM, Tse ECM, Chan JYC, et al. High morbidity and mortality in adults hospitalized for respiratory syncytial virus infections. *Clin Infect Dis*. 2013;57(8):1069-77.
75. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the united states. *JAMA*. 2003;289(2):179-86.
76. Barr F. GB. Respiratory syncytial virus infection: Clinical features and diagnosis [Internet]. [citado 28 de junio de 2015]. Recuperado a partir de: [http://www.uptodate.com/contents/respiratory-syncytial-virus-infection-clinical-features-and-diagnosis?source=see\\_link](http://www.uptodate.com/contents/respiratory-syncytial-virus-infection-clinical-features-and-diagnosis?source=see_link)
77. Johnstone J, Majumdar SR, Fox JD, Marrie TJ. Viral infection in adults hospitalized with community-acquired pneumonia: prevalence, pathogens, and presentation. *Chest*. 2008;134(6):1141-8.
78. Dowell SF, Anderson LJ, Gary HE, Erdman DD, Plouffe JF, File TM, et al. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. *J Infect Dis*. 1996;174(3):456-62.
79. Hoebee B, Rietveld E, Bont L, Oosten M van, Hodemaekers HM, Nagelkerke NJD, et al. Association of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis with interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha polymorphisms. *J Infect Dis*. 2003;187(1):2-11.
80. Goetghebuer T, Isles K, Moore C, Thomson A, Kwiatkowski D, Hull J. Genetic predisposition to wheeze following respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(5):801-3.
81. Hoebee B, Bont L, Rietveld E, van Oosten M, Hodemaekers HM, Nagelkerke NJD, et al. Influence of promoter variants of interleukin-10, interleukin-9, and tumor necrosis factor-alpha genes on respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2004;189(2):239-47.
82. Puthothu B, Krueger M, Forster J, Heinzmann A. Association between severe respiratory syncytial virus infection and IL13/IL4 haplotypes. *J Infect Dis*. 2006;193(3):438-41.
83. Hull J, Rowlands K, Lockhart E, Moore C, Sharland M, Kwiatkowski D. Variants of the chemokine receptor CCR5 are associated with severe bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*. 2003;188(6):904-7.
84. Hall CB, Douglas RG. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr*. 1981;99(1):100-3.
85. Hall CB. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the «Cold War» has not ended. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2000;31(2):590-6.
86. Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, et al. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated

- epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J Infect Dis.* 1990;162(6):1283-90.
87. Kravetz HM, Knight V, Chanock RM, Morris JA, Johnson KM, Rifkind D, et al. Respiratory syncytial virus. III. Production of illness and clinical observations in adult volunteers. *JAMA J Am Med Assoc.* 1961;176:657-63.
  88. King JC, Burke AR, Clemens JD, Nair P, Farley JJ, Vink PE, et al. Respiratory syncytial virus illnesses in human immunodeficiency virus- and noninfected children. *Pediatr Infect Dis J.* 1993;12(9):733-9.
  89. Johnson JE, Gonzales RA, Olson SJ, Wright PF, Graham BS. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Mod Pathol.* 2006;20(1):108-19.
  90. Nadal D, Wunderli W, Meurmann O, Briner J, Hirsig J. Isolation of respiratory syncytial virus from liver tissue and extrahepatic biliary atresia material. *Scand J Infect Dis.* 1990;22(1):91-3.
  91. Zlateva KT, Van Ranst M. Detection of subgroup B respiratory syncytial virus in the cerebrospinal fluid of a patient with respiratory syncytial virus pneumonia. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23(11):1065-6.
  92. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(6):633-9.
  93. Garofalo RP, Patti J, Hintz KA, Hill V, Ogra PL, Welliver RC. Macrophage inflammatory protein-1alpha (not T helper type 2 cytokines) is associated with severe forms of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2001;184(4):393-9.
  94. Hall CB, Walsh EE, Long CE, Schnabel KC. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 1991;163(4):693-8.
  95. Henderson FW, Collier AM, Clyde WA, Denny FW. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med.* 1979;300(10):530-4.
  96. Glezen WP, Paredes A, Allison JE, Taber LH, Frank AL. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. *J Pediatr.* 1981;98(5):708-15.
  97. Stockman LJ, Curns AT, Anderson LJ, Fischer-Langley G. Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among infants and young children in the United States, 1997-2006. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(1):5-9.
  98. Hall CB, Long CE, Schnabel KC. Respiratory syncytial virus infections in previously healthy working adults. *Clin Infect Dis.* 2001;33(6):792-6.
  99. Walsh EE, Falsey AR, Hennessey PA. Respiratory syncytial and other virus infections in persons with chronic cardiopulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(3):791-5.

100. Falsey AR, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly adults. *Drugs Aging*. 2005;22(7):577-87.
101. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child*. 1986;140(6):543-6.
102. 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(6):719-24.
103. Crowe J. Human metapneumovirus infections [Internet]. [citado 2 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: [http://www.uptodate.com/contents/human-metapneumovirus-infections?source=search\\_result&search=metapneumovirus&selectedTitle=1%7E31](http://www.uptodate.com/contents/human-metapneumovirus-infections?source=search_result&search=metapneumovirus&selectedTitle=1%7E31)
104. Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *Int J Infect Dis*. 2014;25C:45-52.
105. Deffrasnes C, Hamelin M-E, Boivin G. Human metapneumovirus. *Semin Respir Crit Care Med*. 2007;28(2):213-21.
106. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G, Hanson CT, Murphy BR, Collins PL, et al. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology*. 2003;315(1):1-9.
107. Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weigl J, Falcone V. Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(1):147-50.
108. Gray GC, Capuano AW, Setterquist SF, Erdman DD, Nobbs ND, Abed Y, et al. Multi-year study of human metapneumovirus infection at a large US Midwestern Medical Referral Center. *J Clin Virol*. 2006;37(4):269-76.
109. Boivin G, De Serres G, Côté S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(6):634-40.
110. Sloots TP, Mackay IM, Bialasiewicz S, Jacob KC, McQueen E, Harnett GB, et al. Human Metapneumovirus, Australia, 2001-2004. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(8):1263-6.
111. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreaks of human metapneumovirus in two skilled nursing facilities -West Virginia and Idaho, 2011-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013;62(46):909-13.
112. Tyrrell DA, Bynoe ML. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *Br Med J*. 1965;1(5448):1467-70.
113. Hamre D, Procknow JJ. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1966;121(1):190-3.
114. McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967;57(4):933-40.

115. Bradburne AF, Bynoe ML, Tyrrell DA. Effects of a «new» human respiratory virus in volunteers. *Br Med J.* 1967;3(5568):767-9.
116. Bradburne AF, Somerset BA. Coronative antibody tires in sera of healthy adults and experimentally infected volunteers. *J Hyg (Lond).* 1972;70(2):235-44.
117. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt H-R, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348(20):1967-76.
118. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al., SARS Working Group. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348(20):1953-66.
119. Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJM, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med.* 2004;10(4):368-73.
120. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L. The Novel Human Coronaviruses NL63 and HKU1. *J Virol.* 2007;81(7):3051-7.
121. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med.* 2012;367(19):1814-20.
122. Coleman CM, Frieman MB. Emergence of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *PLoS Pathog.* 2013;9(9):e1003595.
123. To KKW, Hung IFN, Chan JFW, Yuen K-Y. From SARS coronavirus to novel animal and human coronaviruses. *J Thorac Dis.* 2013;5(Suppl 2):S103-8.
124. Reed SE. The behaviour of recent isolates of human respiratory coronavirus in vitro and in volunteers: evidence of heterogeneity among 229E-related strains. *J Med Virol.* 1984;13(2):179-92.
125. Forster J, Ihorst G, Rieger CHL, Stephan V, Frank H-D, Gurth H, et al. Prospective population-based study of viral lower respiratory tract infections in children under 3 years of age (the PRI.DE study). *Eur J Pediatr.* 2004;163(12):709-16.
126. König B, König W, Arnold R, Werchau H, Ihorst G, Forster J. Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. *J Clin Microbiol.* 2004;42(10):4632-5.
127. Van der Hoek L, Sure K, Ihorst G, Stang A, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Med.* 2005;2(8):e240.
128. Pérez Sáenz, JL., Gimeno Cardona, C., Navarro Ortega, D., Oña Navarro, M. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por herpesvirus. [Internet]. SEIMC; 2005. Recuperado a partir de: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia8a.pdf>
129. Barton TD, Blumberg EA. Viral pneumonias other than cytomegalovirus in transplant recipients. *Clin Chest Med.* 2005;26(4):707-20, viii.

130. Cesario TC. Viruses associated with pneumonia in adults. *Clin Infect Dis*. 2012;55(1):107-13.
131. Burmester G., Peruzzo A. *Color Atlas of Immunology*. Thieme Medical Publishers; 2003. 322 p.
132. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
133. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:189-220.
134. Vollmers HP, Brändlein S. The «early birds»: natural IgM antibodies and immune surveillance. *Histol Histopathol*. 2005;20(3):927-37.
135. Baumgarth N. How specific is too specific? B-cell responses to viral infections reveal the importance of breadth over depth. *Immunol Rev*. 2013;255(1):82-94.
136. Merino MC, Gruppi A. Origen y desarrollo de linfocitos B1. *Medicina (Mex)*. 2006;66(2):165-72.
137. Kaveri SV, Silverman GJ, Bayry J. Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. *J Immunol*. 2012;188(3):939-45.
138. Kayser F., Bienz K., Eckert J., Zinkernagel R. *Medical Microbiology*. Thieme Medical Publishers; 2005. 698 p.
139. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24(2):179-89.
140. Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, et al. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant*. 2004;4(10):1614-27.
141. Maniati E, Soper R, Hagemann T. Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment. *Oncogene*. 2010;29(42):5653-62.
142. Vahlenkamp TW, Tompkins MB, Tompkins WAF. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infections. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;108(1-2):219-25.
143. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(6):389-400.
144. Redpath S, Ghazal P, Gascoigne NR. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol*. 2001;9(2):86-92.
145. Kolli D, Bao X, Casola A. Human Metapneumovirus Antagonism of Innate Immune Responses. *Viruses*. 2012;4(12):3551-71.
146. Fukuyama S, Kawaoka Y. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(4):481-6.

147. Schwarze J, Mackenzie KJ. Novel insights into immune and inflammatory responses to respiratory viruses. *Thorax*. 2013;68(1):108-10.
148. Carvajal, E. J, González, J.S.L, Rojas, M. T, Díaz, E. S. Receptores de la inmunidad innata en procesos infecciosos pulmonares. *Rev Inst Nac Enfermedades Respir*. 2009;22(4).
149. Cerutti A, Chen K, Chorny A. Immunoglobulin Responses at the Mucosal Interface. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:273-93.
150. Johnston JB, McFadden G. Poxvirus Immunomodulatory Strategies: Current Perspectives. *J Virol*. 2003;77(11):6093-100.
151. Bonilla F. Structure of immunoglobulins [Internet]. [citado 13 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.uptodate.com/contents/structure-of-immunoglobulins>
152. Lemmon J., Knutsen A. IgG subclasses: Physical properties, genetics, and biologic functions [Internet]. [citado 7 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: [http://www.uptodate.com/contents/igg-subclasses-physical-properties-genetics-and-biologic-functions?source=see\\_link](http://www.uptodate.com/contents/igg-subclasses-physical-properties-genetics-and-biologic-functions?source=see_link)
153. Burton DR, Gregory L, Jefferis R. Aspects of the molecular structure of IgG subclasses. *Monogr Allergy*. 1986;19:7-35.
154. Adeniji KA, Cusack R. The Simple Triage Scoring System (STSS) successfully predicts mortality and critical care resource utilization in H1N1 pandemic flu: a retrospective analysis. *Crit Care*. 2011;15(1):R39.
155. Vassilev T, Mihaylova N, Voynova E, Nikolova M, Kazatchkine M, Kaveri S. IgM-enriched human intravenous immunoglobulin suppresses T lymphocyte functions in vitro and delays the activation of T lymphocytes in hu-SCID mice. *Clin Exp Immunol*. 2006;145(1):108-15.
156. Hurez V, Kazatchkine MD, Vassilev T, Ramanathan S, Pashov A, Basuyaux B, et al. Pooled normal human polyspecific IgM contains neutralizing anti-idiotypes to IgG autoantibodies of autoimmune patients and protects from experimental autoimmune disease. *Blood*. 1997;90(10):4004-13.
157. Racine R, Winslow GM. IgM in microbial infections: taken for granted? *Immunol Lett*. 2009;125(2):79-85.
158. OMS: Obesidad y sobrepeso [Internet]. WHO. [citado 1 de julio de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
159. Loens K, Bergs K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Evaluation of NucliSens easyMAG for Automated Nucleic Acid Extraction from Various Clinical Specimens. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):421-5.
160. Panning M, Eickmann M, Landt O, Monazahian M, Olschläger S, Baumgarte S, et al. Detection of influenza A(H1N1)v virus by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2009;14(36).
161. De Roux A, Marcos MA, Garcia E, Mensa J, Ewig S, Lode H, et al. Viral community-acquired pneumonia in nonimmunocompromised adults. *Chest*. 2004;125(4):1343-51.

162. Monge V, San-Martín VM, González A. The burden of community-acquired pneumonia in Spain. *Eur J Public Health*. 2001;11(4):362-4.
163. Bauer TT, Welte T, Ernen C, Schlosser BM, Thate-Waschke I, de Zeeuw J, et al. Cost analyses of community-acquired pneumonia from the hospital perspective. *Chest*. 2005;128(4):2238-46.
164. Kaplan V, Angus DC, Griffin MF, Clermont G, Scott Watson R, Linde-Zwirble WT. Hospitalized community-acquired pneumonia in the elderly: age- and sex-related patterns of care and outcome in the United States. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(6):766-72.
165. Almansa R, Wain J, Tamayo E, Andaluz-Ojeda D, Martin-Loeches I, Ramirez P, et al. Immunological monitoring to prevent and treat sepsis. *Crit Care*. 2013;17(1):109.
166. Jain S, Kamimoto L, Bramley AM, Schmitz AM, Benoit SR, Louie J, et al. Hospitalized Patients with 2009 H1N1 Influenza in the United States, April–June 2009. *N Engl J Med*. 2009;361(20):1935-44.
167. Domínguez-Cherit G, Lapinsky SE, Macias AE, Pinto R, Espinosa-Perez L, de la Torre A, et al. Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. *JAMA*. 2009;302(17):1880-7.
168. Athanasiou M, Baka A, Andreopoulou A, Spala G, Karageorgou K, Kostopoulos L, et al. Influenza surveillance during the post-pandemic influenza 2010/11 season in Greece, 04 October 2010 to 22 May 2011. *Euro Surveill*. 2011;16(44).
169. Bolotin S, Pebody R, White PJ, McMenemy J, Perera L, Nguyen-Van-Tam JS, et al., UK Severe Influenza Surveillance System (USISS) Steering Group. A new sentinel surveillance system for severe influenza in England shows a shift in age distribution of hospitalised cases in the post-pandemic period. *PloS One*. 2012;7(1):e30279.
170. Xu C, Iuliano AD, Chen M, Cheng P-Y, Chen T, Shi J, et al. Characteristics of hospitalized cases with influenza A (H1N1)pdm09 infection during first winter season of post-pandemic in China. *PloS One*. 2013;8(2):e55016.
171. Rahamat-Langendoen JC, Tutuhaturnewa ED, Schölvinck EH, Hak E, Koopmans M, Niesters HGM, et al. Influenza in the immediate post-pandemic era: a comparison with seasonal and pandemic influenza in hospitalized patients. *J Clin Virol*. 2012;54(2):135-40.
172. Chuang J-H, Huang AS, Huang W-T, Liu M-T, Chou J-H, Chang F-Y, et al. Nationwide surveillance of influenza during the pandemic (2009-10) and post-pandemic (2010-11) periods in Taiwan. *PloS One*. 2012;7(4):e36120.
173. Simonsen L, Reichert TA, Viboud C, Blackwelder WC, Taylor RJ, Miller MA. Impact of influenza vaccination on seasonal mortality in the us elderly population. *Arch Intern Med*. 2005;165(3):265-72.
174. Mertz D, Kim TH, Johnstone J, Lam P-P, Science M, Kuster SP, et al. Populations at risk for severe or complicated influenza illness: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2013;347:f5061.

175. Falsey AR, Walsh EE. Viral Pneumonia in Older Adults. *Clin Infect Dis*. 2006;42(4):518-24.
176. Chan PA, Mermel LA, Andrea SB, McCulloh R, Mills JP, Echenique I, et al. Distinguishing characteristics between pandemic 2009-2010 influenza A (H1N1) and other viruses in patients hospitalized with respiratory illness. *PLoS One*. 2011;6(9):e24734.
177. Lerma Chippirraz E, Sorlí L, Montero M, Mas V, López Granados E, Vilaplana C, et al. Factores predictivos de neumonía en pacientes infectados por el nuevo virus de la gripe A (H1N1) pandémica. *Rev Esp Quimioter*. 2011;24(4):204-8.
178. Punpanich W, Chotpitayasunondh T. A review on the clinical spectrum and natural history of human influenza. *Int J Infect Dis*. 2012;16(10):e714-23.
179. Rodríguez A, Socías L, Guerrero JE, Figueira JC, González N, Maraví-Poma E, et al. Gripe A pandémica en una unidad de cuidados intensivos: experiencia en España y Latinoamérica. *J Med Intensiva Soc Esp Med Intensiva Unidades Coronarias*. 2010;34(2):87-94.
180. Jokinen C, Heiskanen L, Juvonen H, Kallinen S, Kleemola M, Koskela M, et al. Microbial etiology of community-acquired pneumonia in the adult population of 4 municipalities in eastern Finland. *Clin Infect Dis*. 2001;32(8):1141-54.
181. Kumar A, Zarychanski R, Pinto R, Cook DJ, Marshall J, Lacroix J, et al., Canadian Critical Care Trials Group H1N1 Collaborative. Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) infection in Canada. *JAMA J Am Med Assoc*. 2009;302(17):1872-9.
182. Luna CM, Famiglietti A, Absi R, Videla AJ, Nogueira FJ, Fuenzalida AD, et al. Community-acquired pneumonia: etiology, epidemiology, and outcome at a teaching hospital in Argentina. *Chest*. 2000;118(5):1344-54.
183. Poulakou G, Pérez M, Rello J. Severe acute respiratory infections in the postpandemic era of H1N1. *Curr Opin Crit Care*. 2012;18(5):441-50.
184. Bermejo-Martin JF, Martin-Loeches I, Rello J, Antón A, Almansa R, Xu L, et al. Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza. *Crit Care*. 2010;14(5):R167.
185. Viasus D, Paño-Pardo JR, Pachón J, Campins A, López-Medrano F, Villoslada A, et al., Novel Influenza A (H1N1) Study Group of the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Factors associated with severe disease in hospitalized adults with pandemic (H1N1) 2009 in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(5):738-46.
186. Ribeiro AF, Pellini ACG, Kitagawa BY, Marques D, Madalosso G, de Cassia Nogueira Figueira G, et al. Risk Factors for Death from Influenza A(H1N1)pdm09, State of São Paulo, Brazil, 2009. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118772.
187. Almansa R, Bermejo-Martín JF, de Lejarazu Leonardo RO. Immunopathogenesis of 2009 pandemic influenza. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30 Suppl 4:18-24.
188. Louie JK, Acosta M, Samuel MC, Schechter R, Vugia DJ, Harriman K, et al., California Pandemic (H1N1) Working Group. A novel risk factor for a novel virus: obesity and 2009 pandemic influenza A (H1N1). *Clin Infect Dis*. 2011;52(3):301-12.

189. Poulakou G, Souto J, Balcells J, Pérez M, Laborda C, Roca O, et al. First influenza season after the 2009 pandemic influenza: characteristics of intensive care unit admissions in adults and children in Vall d'Hebron Hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(4):374-80.
190. Rodríguez-Rodríguez E, López-Plaza B, López-Sobaler AM<sup>a</sup>, Ortega RM<sup>a</sup>. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos españoles. *Nutr Hosp.* 2011;26(2):355-63.
191. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 1985;13(10):818-29.
192. Bai L, Gu L, Cao B, Zhai X-L, Lu M, Lu Y, et al. Clinical features of pneumonia caused by 2009 influenza A(H1N1) virus in Beijing, China. *Chest.* 2011;139(5):1156-64.
193. Koegelenberg CFN, Irusen EM, Cooper R, Diacon AH, Taljaard JJ, Mowlana A, et al. High mortality from respiratory failure secondary to swine-origin influenza A (H1N1) in South Africa. *QJM Mon J Assoc Physicians.* 2010;103(5):319-25.
194. Bauernfeind S, Bruennler T, Ehrenstein B, Langgartner J, Wenzel JJ, Werner S, et al. Pandemic and post-pandemic influenza A (H1N1) seasons in a tertiary care university hospital-high rate of complications compared to previous influenza seasons. *Infection.* 2013;41(1):145-50.
195. Brandsaeter BJ, Pillgram M, Berild D, Kjekshus H, Kran A-MB, Bergersen BM. Hospitalised patients with suspected 2009 H1N1 influenza A in a hospital in Norway, July - December 2009. *BMC Infect Dis.* 2011;11:75.
196. Fica A, Dabanch J, Andrade W, Bustos P, Carvajal I, Ceroni C, et al. Clinical relevance of rhinovirus infections among adult hospitalized patients. *Braz J Infect Dis.* 2015;19(2):118-24.
197. Riquelme R, Torres A, Rioseco ML, Ewig S, Cillóniz C, Riquelme M, et al. Influenza pneumonia: a comparison between seasonal influenza virus and the H1N1 pandemic. *Eur Respir J.* 2011;38(1):106-11.
198. Dhanoa A, Fang NC, Hassan SS, Kaniappan P, Rajasekaram G. Epidemiology and clinical characteristics of hospitalized patients with pandemic influenza A (H1N1) 2009 infections: the effects of bacterial coinfection. *Virology.* 2011;8:501.
199. Martin-Loeches I, Rodriguez A, Bonastre J, Zaragoza R, Sierra R, Marques A, et al., H1N1 SEMICYUC Working Group. Severe pandemic (H1N1)v influenza A infection: report on the first deaths in Spain. *Respirology.* 2011;16(1):78-85.
200. Alonso-Tarres C, Cortes-Lletget C, Pintado S, Ricart A. Severe influenza A (H1N1)v in patients without any known risk factor. *Crit Care.* 2009;13(6):425.
201. WHO. WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 and other Influenza Viruses [Internet]. Recuperado a partir de: [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1\\_guidelines\\_pharmaceutical\\_mngt.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt.pdf)
202. Falagas ME, Vouloumanou EK, Baskouta E, Rafailidis PI, Polyzos K, Rello J. Treatment options for 2009 H1N1 influenza: evaluation of the published evidence. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(5):421-30.

203. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet*. 9 de abril de 2011;377(9773):1264-75.
204. Diaz E, Martin-Loeches I, Canadell L, Vidaur L, Suarez D, Socias L, et al., H1N1 SEMICYUC-CIBERES-REIPI Working Group (GETGAG). Corticosteroid therapy in patients with primary viral pneumonia due to pandemic (H1N1) 2009 influenza. *J Infect*. 2012;64(3):311-8.
205. Brun-Buisson C, Richard J-CM, Mercat A, Thiébaud ACM, Brochard L, REVA-SRLF A/H1N1v 2009 Registry Group. Early corticosteroids in severe influenza A/H1N1 pneumonia and acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(9):1200-6.
206. The Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans. *N Engl J Med*. 2005;353(13):1374-85.
207. Kim S-H, Hong S-B, Yun S-C, Choi W-I, Ahn J-J, Lee YJ, et al., Korean Society of Critical Care Medicine H1N1 Collaborative. Corticosteroid treatment in critically ill patients with pandemic influenza A/H1N1 2009 infection: analytic strategy using propensity scores. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(9):1207-14.
208. Martin-Loeches I, Lisboa T, Rhodes A, Moreno RP, Silva E, Sprung C, et al., ESICM H1N1 Registry Contributors. Use of early corticosteroid therapy on ICU admission in patients affected by severe pandemic (H1N1)v influenza A infection. *Intensive Care Med*. 2011;37(2):272-83.
209. Mandell L, Wunderink R., Anzueto A., Bartlett J., Campbell D., Dean N., et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society: Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clin Infect Dis*. 44(Supplement 2):S27-72.
210. Koon K, Sanders CM, Green J, Malone L, White H, Zayas D, et al. Co-detection of pandemic (H1N1) 2009 virus and other respiratory pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(12):1976-8.
211. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis*. 2008;198(7):962-70.
212. Perez-Padilla R, de la Rosa-Zamboni D, Ponce de Leon S, Hernandez M, Quiñones-Falconi F, Bautista E, et al., INER Working Group on Influenza. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med*. 2009;361(7):680-9.
213. Xi X, Xu Y, Jiang L, Li A, Duan J, Du B, Chinese Critical Care Clinical Trial Group. Hospitalized adult patients with 2009 influenza A(H1N1) in Beijing, China: risk factors for hospital mortality. *BMC Infect Dis*. 2010;10:256.
214. Zhang P-J, Cao B, Li X-L, Liang L-R, Yang S-G, Gu L, et al. Risk factors for adult death due to 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection: a 2151 severe and critical cases analysis. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(12):2222-8.

215. Reyes S, Montull B, Martínez R, Córdoba J, Molina JM, Martí V, et al. Risk factors of A/H1N1 etiology in pneumonia and its impact on mortality. *Respir Med.* 2011;105(9):1404-11.
216. Viasus D, Cordero E, Rodríguez-Baño J, Oteo JA, Fernández-Navarro A, Ortega L, et al. Changes in epidemiology, clinical features and severity of influenza A (H1N1) 2009 pneumonia in the first post-pandemic influenza season. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):E55-62.
217. Liao Q, Ip DKM, Tsang TK, Cao B, Jiang H, Liu F, et al. A clinical prediction rule for diagnosing human infections with avian influenza A(H7N9) in a hospital emergency department setting. *BMC Med.* 2014;12:127.
218. Wang L, Chang L-S, Lee I-K, Tang K-S, Li C-C, Eng H-L, et al. Clinical diagnosis of pandemic A(H1N1) 2009 influenza in children with negative rapid influenza diagnostic test by lymphopenia and lower C-reactive protein levels. *Influenza Other Respir Viruses.* 2014;8(1):91-8.
219. Yang T-H, Chu D, Hu B-S, Hung Y-T, Chou P. Early experience of the pandemic influenza H1N1 2009 epidemic in Taiwan. *J Chin Med Assoc.* 2011;74(7):298-304.
220. Sohn CH, Ryoo SM, Yoon JY, Seo DW, Lim KS, Kim SH, et al. Comparison of clinical features and outcomes of hospitalized adult patients with novel influenza A (H1N1) pneumonia and other pneumonia. *Acad Emerg Med.* 2013;20(1):46-53.
221. To KKW, Hung IFN, Li IWS, Lee K-L, Koo C-K, Yan W-W, et al. Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection. *Clin Infect Dis.* 2010;50(6):850-9.
222. Viasus D, Marinescu C, Villoslada A, Cordero E, Gálvez-Acebal J, Fariñas MC, et al., Influenza A (H1N1) Study Group of the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Community-acquired pneumonia during the first post-pandemic influenza season: a prospective, multicentre cohort study. *J Infect.* 2013;67(3):185-93.
223. Bermejo-Martin JF, Ortiz de Lejarazu R, Pumarola T, Rello J, Almansa R, Ramírez P, et al. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit Care.* 2009;13(6):R201.
224. Chan JF-W, To KK-W, Tse H, Lau CC-Y, Li IW-S, Hung IF-N, et al. The lower serum immunoglobulin G2 level in severe cases than in mild cases of pandemic H1N1 2009 influenza is associated with cytokine dysregulation. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(2):305-10.
225. De Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJD, Chau TNB, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med.* 2006;12(10):1203-7.
226. Bermejo-Martin JF, Garcia-Arevalo MC, Alonso A, De Lejarazu RO, Pino M, Resino S, et al. Persistence of proinflammatory response after severe respiratory syncytial virus disease in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(6):1547-50.
227. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:165974.

228. Deng JC, Standiford TJ. The systemic response to lung infection. *Clin Chest Med.* 2005;26(1):1-9.
229. Menéndez R, Martínez R, Reyes S, Mensa J, Filella X, Marcos MA, et al. Biomarkers improve mortality prediction by prognostic scales in community-acquired pneumonia. *Thorax.* 2009;64(7):587-91.
230. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Host innate defenses in the lung: the role of cytokines. *Curr Opin Infect Dis.* 2003;16(3):193-8.
231. Julkunen I, Sareneva T, Pirhonen J, Ronni T, Melén K, Matikainen S. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12(2-3):171-80.
232. Panopoulos AD, Watowich SS. Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and «emergency» hematopoiesis. *Cytokine.* 2008;42(3):277-88.
233. Nelson S. Novel nonantibiotic therapies for pneumonia: cytokines and host defense. *Chest.* 2001;119(2 Suppl):419S - 425S.
234. Almansa R, Socias L, Ramirez P, Martin-Loeches I, Vallés J, Loza A, et al. Imbalanced pro- and anti-Th17 responses (IL-17/granulocyte colony-stimulating factor) predict fatal outcome in 2009 pandemic influenza. *Crit Care.* 2011;15(5):448.
235. McKinstry KK, Strutt TM, Buck A, Curtis JD, Dibble JP, Huston G, et al. IL-10 deficiency unleashes an influenza-specific Th17 response and enhances survival against high dose challenge. *J Immunol.* 2009;182(12):7353-63.
236. Paquette SG, Banner D, Zhao Z, Fang Y, Huang SSH, León AJ, et al. Interleukin-6 is a potential biomarker for severe pandemic H1N1 influenza A infection. *PLoS One.* 2012;7(6):e38214.
237. Lee BO, Rangel-Moreno J, Moyron-Quiroz JE, Hartson L, Makris M, Sprague F, et al. CD4 T Cell-Independent Antibody Response Promotes Resolution of Primary Influenza Infection and Helps to Prevent Reinfection. *J Immunol.* 2005;175(9):5827-38.
238. Logtenberg SJ, Pasma FH, Wolfhagen MJ, Dikkeschei LD, Bilo HJ. Disappearance of immunoglobulins in acute phase of influenza A infection. *Lancet.* 2006;368(9546):1546.
239. Miao H, Hollenbaugh JA, Zand MS, Holden-Wiltse J, Mosmann TR, Perelson AS, et al. Quantifying the early immune response and adaptive immune response kinetics in mice infected with influenza A virus. *J Virol.* 2010;84(13):6687-98.
240. Harada Y, Muramatsu M, Shibata T, Honjo T, Kuroda K. Unmutated immunoglobulin M can protect mice from death by influenza virus infection. *J Exp Med.* 2003;197(12):1779-85.
241. Qiu C, Tian D, Wan Y, Zhang W, Qiu C, Zhu Z, et al. Early adaptive humoral immune responses and virus clearance in humans recently infected with pandemic 2009 H1N1 influenza virus. *PLoS One.* 2011;6(8):e22603.

242. Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown LE, Herzenberg LA, Chen J. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med.* 2000;192(2):271-80.
243. Baumgarth N. A two-phase model of B-cell activation. *Immunol Rev.* 2000;176:171-80.
244. Choi YS, Baumgarth N. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *J Exp Med.* 2008;205(13):3053-64.
245. Binder CJ. Natural IgM antibodies against oxidation-specific epitopes. *J Clin Immunol.* 2010;30 Suppl 1:S56-60.
246. Gordon CL, Johnson PDR, Permezel M, Holmes NE, Gutteridge G, McDonald CF, et al. Association between severe pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection and immunoglobulin G(2) subclass deficiency. *Clin Infect Dis.* 2010;50(5):672-8.
247. Gordon CL, Holmes NE, Grayson ML, Torresi J, Johnson PDR, Cheng AC, et al. Comparison of immunoglobulin G subclass concentrations in severe community-acquired pneumonia and severe pandemic 2009 influenza A (H1N1) infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(3):446-8.
248. Zheng R, Qin X, Li Y, Yu X, Wang J, Tan M, et al. Imbalanced anti-H1N1 immunoglobulin subclasses and dysregulated cytokines in hospitalized pregnant women with 2009 H1N1 influenza and pneumonia in Shenyang, China. *Hum Immunol.* 2012;73(9):906-11.
249. Renegar KB, Small PA. Passive transfer of local immunity to influenza virus infection by IgA antibody. *J Immunol.* 1991;146(6):1972-8.
250. Renegar KB, Small PA. Immunoglobulin A mediation of murine nasal anti-influenza virus immunity. *J Virol.* 1991;65(4):2146-8.
251. Renegar KB, Small PA, Boykins LG, Wright PF. Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. *J Immunol.* 2004;173(3):1978-86.
252. Takahashi E, Kataoka K, Indalao IL, Konoha K, Fujii K, Chida J, et al. Oral Clarithromycin Enhances Airway Immunoglobulin A (IgA) Immunity through Induction of IgA Class Switching Recombination and B-Cell-Activating Factor of the Tumor Necrosis Factor Family Molecule on Mucosal Dendritic Cells in Mice Infected with Influenza A Virus. *J Virol.* 2012;86(20):10924-34.
253. Almansa R, Anton A, Ramirez P, Martin-Loeches I, Banner D, Pumarola T, et al. Direct association between pharyngeal viral secretion and host cytokine response in severe pandemic influenza. *BMC Infect Dis.* 2011;11:232.
254. Pérez-Rubio A, Eiros Bouza JM, Castrodeza Sanz JJ. Evaluación de la vacunación frente al virus de la gripe A H1N1 en Castilla y León. *Med Clin Barc.* 2010;135(12):543-5.
255. Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H, et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med.* 2009;361(20):1945-52.

- 
256. Summah H, Qu J-M. Biomarkers: a definite plus in pneumonia. *Mediators Inflamm.* 2009;675753.
  257. Christ-Crain M, Opal SM. Clinical review: The role of biomarkers in the diagnosis and management of community-acquired pneumonia. *Crit Care.* 2010;14(1):203.
  258. Shankar-Hari M, Spencer J, Sewell WA, Rowan KM, Singer M. Bench-to-bedside review: Immunoglobulin therapy for sepsis - biological plausibility from a critical care perspective. *Crit Care.* 2012;16(2):206.
  259. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Catálogo de medicamentos. 2009. 3420 p.
  260. Hui DS, Lee N, Chan PK. Adjunctive therapies and immunomodulatory agents in the management of severe influenza. *Antiviral Res.* 2013;98(3):410-6.
  261. Pentaglobin. Human IgM-enriched immunoglobulin [Internet]. [citado 10 de enero de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.paviour.org/pentaglobin.htm>
  262. Tugrul S, Ozcan PE, Akinci O, Seyhun Y, Cagatay A, Cakar N, et al. The effects of IgM-enriched immunoglobulin preparations in patients with severe sepsis. *Crit Care.* 2002;6(4):357-62.
  263. Berlot G, Vassallo MC, Busetto N, Bianchi M, Zornada F, Rosato I, et al. Relationship between the timing of administration of IgM and IgA enriched immunoglobulins in patients with severe sepsis and septic shock and the outcome: a retrospective analysis. *J Crit Care.* 2012;27(2):167-71.
  264. Neilson AR, Burchardi H, Schneider H. Cost-effectiveness of immunoglobulin M-enriched immunoglobulin (Pentaglobin) in the treatment of severe sepsis and septic shock. *J Crit Care.* 2005;20(3):239-49.
  265. Kreymann KG, de Heer G, Nierhaus A, Kluge S. Use of polyclonal immunoglobulins as adjunctive therapy for sepsis or septic shock. *Crit Care Med.* 2007;35(12):2677-85.
  266. Norrby-Teglund A, Haque KN, Hammarström L. Intravenous polyclonal IgM-enriched immunoglobulin therapy in sepsis: a review of clinical efficacy in relation to microbiological aetiology and severity of sepsis. *J Intern Med.* 2006;260(6):509-16.
  267. Hung IF, To KK, Lee C-K, Lee K-L, Chan K, Yan W-W, et al. Convalescent plasma treatment reduced mortality in patients with severe pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus infection. *Clin Infect Dis.* 2011;52(4):447-56.
  268. Hung IFN, To KKW, Lee C-K, Lee K-L, Yan W-W, Chan K, et al. Hyperimmune IV immunoglobulin treatment: a multicenter double-blind randomized controlled trial for patients with severe 2009 influenza A(H1N1) infection. *Chest.* 2013;144(2):464-73.

