

Alberto Tenorio Abreu^{1,2},
Jose María Eiros Bouza^{1,2},
Esmeralda Rodríguez
Molins²,
Jesús Francisco Bermejo
Martín¹,
Marta Domínguez-Gil¹,
Tomás Vega Alonso²,
Javier Castrodeza Sanz¹,
Raul Ortiz de Lejarazu^{1,2}

Vigilancia de la gripe mediante diagnóstico molecular

¹Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Avda. Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid.
²Centro Nacional de Gripe. Universidad de Valladolid. Avda. Ramón y Cajal 7, 47005 Valladolid.

RESUMEN

Introducción: Nuestro objetivo ha sido evaluar la aplicación de técnicas moleculares en la vigilancia de gripe, así como describir características clínicas y epidemiológicas de los casos diagnosticados en las temporadas 2007-2008 y 2008-2009.

Métodos: se analizaron 183 frotis faríngeos procedentes de otros tantos pacientes remitidos al laboratorio de virología por la Red de Médicos Centinelas de Castilla y León, para el estudio de virus gripales mediante la técnica de shell-vial y RT-PCR múltiple capaz de detectar de forma simultánea, virus gripales A, B, C, virus respiratorio sincitial A, B y adenovirus.

Resultados: Mediante cultivo celular se aislaron 17 virus gripales A y 19 virus gripales B (19,7% del total). Por RT-PCR múltiple, se detectaron 49 virus gripales A, 29 virus gripales B, un virus gripal C, 3 virus sincitiales tipo A u otro B y 6 adenovirus, (44,3% del total). Todos los virus gripales aislados por cultivo celular se detectaron mediante RT-PCR. Por RT-PCR se detectaron 5 coinfecciones, que supuso un 6,25% de coinfecciones sobre las muestras positivas. La edad media de los pacientes fue de 29 años (SD=21,07). La proporción de mujeres y hombres correspondió al 43,7% y 56,3% respectivamente. El número de casos diagnosticados en relación a la edad sigue un patrón de correlación lineal negativa.

Conclusiones: La RT-PCR se presenta como una herramienta útil para la vigilancia epidemiológica de la gripe permitiendo además subtipar los virus gripales y detectar otros virus implicados en procesos respiratorios de forma simultánea.

Palabras clave: Virus de la gripe. Vigilancia epidemiológica. Diagnóstico molecular.

Influenza surveillance by molecular diagnosis

ABSTRACT

Introduction: Our objective was to evaluate the application of molecular techniques in the surveillance of influenza, and to describe clinical and epidemiological characteristics of cases diagnosed in 2007-2008 and 2008-2009 seasons.

Methods: We analyzed 183 pharyngeal swabs from the same number of patients referred to the virology laboratory of the Sentinel Physician Network of Castilla y Leon, the study of influenza viruses by shell-vial technique and RT-PCR capable of detecting multiple Simultaneously, influenza virus A, B, C, respiratory syncytial virus A, B and adenovirus.

Results: Using cell culture were isolated 17 influenza A viruses and 19 influenza B viruses (19.7% of total). By multiple RT-PCR, was detected 49 influenza A virus, 29 influenza B virus, an influenza virus C, 3 syncytial virus type A and other B and 6 adenoviruses (44.3% of total). All influenza viruses isolated in cell culture was detected by RT-PCR. RT-PCR by 5 co-infections were detected, which represented a 6.25% of co-infections on the whole of positive samples. The average age of patients was 29 years (SD = 21.07). The proportion of women and men accounted for 43.7% and 56.3% respectively. The number of cases diagnosed in relation to age follows a pattern of negative linear correlation.

Conclusions: RT-PCR is revealed as an useful tool for epidemiological surveillance of influenza, allowing also to detect viral subtypes along with other viruses involved in respiratory infections.

Keywords: Influenza virus. Epidemiological alertness. Molecular diagnosis.

Correspondencia:
José M^o Eiros Bouza.
Area de Microbiología. Sexta Planta.
Facultad de Medicina. Avda. Ramón y Cajal 7.
47005 Valladolid.

Tf 983 423063. Fax 983 423022.
Correo electrónico:
eiros@med.uva.es

INTRODUCCIÓN

Los virus de la gripe son capaces de producir epidemias anuales en el hemisferio norte y sur, con la consiguiente repercusión económica y sanitaria que ello supone¹⁻³. Los programas de vigilancia de la gripe llevados a cabo por la Red de Centros Nacionales de Gripe distribuidos estratégicamente por todo el mundo, tienen la misión de vigilar, contener y anticipar los efectos que puedan provocar dichos virus. Uno de los principales objetivos de los Centros Nacionales de Gripe es detectar con rapidez la actividad gripal que pueda producirse en la población que asiste. A este respecto, es fundamental una definición clínica que unifique la declaración epidemiológica lo máximo posible, maximizando las posibilidades de aislar virus gripales de los pacientes declarados. Para ello, distintos trabajos indicaron hace tiempo la necesidad de recoger muestra en los tres primeros días del inicio de los síntomas de los pacientes con clínica que cumpla la definición previamente establecida. Los Centros Nacionales, cuentan con un sistema de detección clínica, compuesta por una Red de Médicos Centinela, encargada de detectar los casos gripe en la comunidad. Otra de las funciones de dicha Red de Centros de Gripe, es la de confirmar el diagnóstico etiológico y aislar las cepas de virus que servirán para la elaboración de la vacuna antigripal anual. El cultivo celular es fundamental para la recuperación de virus viables necesarios para dicho cometido. Sin embargo, las nuevas técnicas moleculares podrían complementar y añadir nuevos datos a los estudios epidemiológicos y sobre la etiología.

La aparición de distintas experiencias con diagnósticos basados en la detección de genoma del virus puede dar lugar a una nueva y diferente forma de realizar la vigilancia de gripe. Sin abandonar el cultivo celular necesario para la recuperación de virus cultivables, el Centro Nacional de Gripe de Valladolid adoptó una PCR múltiple⁴ capaz de detectar virus gripales A, B y C así como otros virus respiratorios de circulación invernal en el hemisferio norte.

En el presente estudio, se propone como objetivo evaluar la aportación de técnicas moleculares para el diagnóstico de virus respiratorios aplicada a la vigilancia de gripe, como herramienta adicional al cultivo vírico tradicional. Por otra parte, se pretende describir las características clínicas y epidemiológicas de los casos diagnosticados por la Red de Vigilancia de Médicos Centinela de Castilla y León, durante las temporadas epidémicas 2007-2008 y 2008-2009.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y muestras clínicas. Se seleccionaron aquellos pacientes compatibles con clínica gripal, que acudieron a la consulta de médicos centinela adscritos al programa de vigilancia de la gripe en Castilla y León, procediéndose a una toma de muestra faríngea por paciente. Los criterios de inclusión de los pacientes para estudio virológico están descritos en el programa anual de gripe⁵. Básicamente consisten en la presencia de seis síntomas o criterios clínicos fuera del periodo epidémi-

co y al menos cuatro en el periodo epidémico de los siguientes: aparición súbita, fiebre, escalofríos, astenia y postración, mialgias, tos, contacto con enfermo de gripe y síntomas respiratorios de vías altas. Las muestras se remitieron al Centro Nacional de Gripe acompañadas de un volante de petición debidamente cumplimentado, donde se recogieron los datos epidemiológicos del paciente (edad, sexo, fecha de toma de muestra, lugar de procedencia, estado vacunal del paciente, caso esporádico o brote epidémico) y clínicos anteriormente mencionados, así como los datos del médico peticionario.

Análisis de muestras. Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Virología del Centro Nacional de Gripe de Valladolid. Todas las muestras se procesaron en paralelo mediante la técnica de lisis-centrifugación para cultivo en shell vial⁶ y una RT-PCR múltiple⁴. Para el cultivo por shell vial, tras la lisis-centrifugación, las muestras se incubaron en contacto con células MDCK en monocapa, fijadas en una base de vidrio depositada en el fondo de pequeños viales cilíndricos de 14 mm de diámetro. Para el revelado y observación al microscopio de fluorescencia, se utilizaron anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína, frente a los virus de la gripe A y B (Imgen, Dako AS).

La segunda técnica empleada para el diagnóstico en paralelo de virus gripales, basada en métodos moleculares, consistió en una RT-PCR nested múltiple organizada en dos reacciones, una primera RT-PCR y otra segunda reacción de una nested-PCR, capaz de detectar de forma simultánea virus gripales A, B y C, adenovirus y virus respiratorio sincitial A y B⁴.

La primera reacción de RT-PCR se realizó utilizando un kit de RT-PCR de Access de Promega[®], con un set compuesto por la enzima retrotranscriptasa, la enzima Taq polimerasa, tampón de reacción, dNTPs, SO₄Mg y controles de amplificación. Para la reacción se partió de 5 µl de extracto genómico y un termociclador convencional, en el que se siguió el siguiente programa de temperaturas: un ciclo a 48° C durante 45 minutos para transcribir el RNA a cDNA; un ciclo a 95° C durante 3 minutos para inactivar la retrotranscriptasa y preparar la reacción de amplificación; 45 ciclos a 95° C durante 30 segundos (desnaturalización), 50° C durante un minuto (alineamiento) y 72° C durante un minuto (elongación); por último, un ciclo final a 72° C durante 10 minutos.

En la segunda reacción de nested-PCR, se partió de 5 µl de la primera reacción de RT-PCR, y se utilizó el kit GeneAmp[®] de Applied Biosystems, que suministra la enzima Taq polimerasa, MgCl₂ y tampón de reacción. Dicha reacción se llevo a cabo igualmente en el mismo termociclador convencional con el siguiente programa de temperaturas: un ciclo a 95° C durante 4 minutos; 35 ciclos a 94° C durante 30 segundos, 55° C durante un minuto y 72° C durante 30 segundos; finalmente un ciclo a 72° C durante 10 minutos.

La visualización se realizó por separación de los fragmentos genómicos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. La interpretación de los resultados se hizo en función del tamaño molecular, correspondiendo a la gripe A un tamaño de 301 pb, a la gripe B un tamaño de 226 pb, a la

gripe C un tamaño de 111 pb, al virus respiratorio sincitial tipo A un tamaño de 363 pb, al tipo B un tamaño de 661 pb y al adenovirus un tamaño de 168 pb.

El subtipo de gripe A se determinó por el tipo de hemaglutinina mediante la misma técnica de RT-PCR nested, en la que se utilizaron los siguientes cebadores en el primer paso de RT-PCR: PHA1+ (5'-3') GGGGTTAGCAAAGCAGGRG; PHA1-CAWCCRKCIAYCAKICCWKICCAICC. Para la segunda reacción de nested PCR se utilizaron los siguientes cebadores: H1+SSEQ CAATATGTATAGGCTACCATGC; H1-ASEQ CCCTCAA-TRAAACCRGCAAT, para el subtipo H1 y H3+SSEQ GACACCATG-CAGTGCCAA; H3-ASEQ CCCTCCAACCATTTCTAT, para el subtipo H3.

Para la extracción de ácidos nucleicos previa a la detección genómica por PCR, se utilizó un extractor automático, basado en el método boom empleando una suspensión de partículas de sílice magnética capaces de atrapar a los ácidos nucleicos y separarlas mediante la aplicación de un campo magnético y sucesivos lavados, por medio de un autoanalizador que permite la extracción de 24 muestras por ronda de trabajo (EasyMag, Biomerieux, France).

Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa informático Epidat 3.1 y el paquete estadístico de Microsoft Office Excel 2007.

RESULTADOS

Desde Octubre del 2007 hasta Febrero del 2009, se incluyeron un total de 183 pacientes que presentaban cuadros compatibles con síndromes gripales, seleccionados por médicos pertenecientes a la Red Centinela de Vigilancia de la Gripe de Castilla y León (Spain). Las edades de los pacientes se encontraron en rangos entre 2 y 83 años, con una media de 28,9 años (SD=21,07) y una mediana de 28 años. La proporción de mujeres y hombres en la serie analizada, fue del 45,7% y 54,3% para la temporada 2007-2008; y del 41,3% y 58,3% para la temporada 2008-2009, respectivamente. La proporción media de ambas temporadas correspondió al 43,7% para mujeres y al 56,3% para hombres.

En la figura 1 y 2 se representa el número de muestras procesadas en relación a la edad y virus detectados mediante PCR. La gráfica de la temporada 2007-2008 presenta un coeficiente de correlación lineal de -0,96 ($r=-0,96$) en función de la edad y positividad de la muestra, y la de la temporada 2008-2009 presenta un coeficiente de correlación lineal de -0,76 ($r=0,76$).

En la figura 3 y 4 se muestra, el número de detecciones de virus gripales, mediante técnicas de PCR en las temporadas 2007-2008 y 2008-2009, respectivamente, en relación al número total de muestras procesadas.

El cultivo celular, confirmó el diagnóstico de gripe en el 20% de los pacientes que cumplían criterios clínicos de sospecha de gripe. La RT-PCR confirmó el diagnóstico de gripe en el 43% de los casos. En el 3,8% de los pacientes, se confirmó el diagnóstico de otros virus respiratorios no gripales.

Tabla 1

Frecuencia síntomas gripales en los pacientes estudiados.

	Frecuencia en pacientes con clínica gripal (%)	Frecuencia en pacientes con diagnóstico de laboratorio confirmado (%)
Aparición súbita	95,45%	96%
Fiebre	95,45%	100%
Escalofríos	85,22%	86%
Astenia y postración	94,31%	100%
Mialgias	84,1%	82%
Tos	84,1%	90%
Síntomas respiratorios de vías altas	82,95%	84%

Mediante cultivo celular, se aislaron en la temporada 2007-2008, 6 virus gripales A y 17 virus gripales B, que supuso un 25% de positividad sobre todas las muestras analizadas, mientras que en la temporada 2008-2009 se aislaron 11 virus gripales A y 2 virus gripales B, representando un 14,3% de positivos sobre el total de muestras, lo que indica un descenso significativo de incidencia. Por medio de la técnica de RT-PCR multiplex, en la temporada 2007-2008, se detectaron 28 virus gripales A (todos subtipo H1), 27 virus gripales B, un virus gripal C, un virus respiratorio sincitial B y cuatro adenovirus, constituyendo un 61% de positividad del total de las muestras. En la temporada 2008-2009, por PCR, se detectaron 21 virus gripales A (20 subtipos H3 y un subtipo H1), 2 virus gripales B, 2 adenovirus y 3 virus respiratorios sincitiales tipo A, correspondiendo un 30,7% de positividad sobre el total de muestras. Todos los virus gripales aislados por cultivo celular, se detectaron mediante RT-PCR en ambas temporadas, lo que supone una sensibilidad del 100% para la PCR. Además con esta última técnica se detectaron cinco coinfecciones (todas ellas en la temporada 2007-2008), que supuso un 6,25% de coinfecciones sobre el total de las muestras positivas de las dos temporadas de estudio, correspondiendo dos a gripe A/adenovirus, una a gripe A/gripe B, una a gripe B/gripe C y una a gripe B/adenovirus.

La proporción de mujeres y hombres correspondientes a los virus gripales A detectados fue del 42,8% y 57,2% ($p=0,14$), y para los virus gripales B fue del 50% para ambos sexos.

De los 183 pacientes, solo 13 refirieron estar vacunados entre los años 2007 y 2008 frente a los virus gripales. En dos pacientes, de los 13 vacunados, se detectaron virus gripales. El primero de ellos, se trató de una mujer de 62 años con diagnóstico de gripe B e identificado como brote familiar aparecido en el mes de Abril del 2008. El segundo de ellos, fue una mujer de 74 años con diagnóstico de gripe A subtipo H3 en el mes de Enero del 2009.

La frecuencia de los síntomas clínicos descritos para los pacientes seleccionados con sospecha de infección gripal, tan-

Días transcurridos desde el inicio de los síntomas hasta la toma	Nº de muestras	Nº de + por cultivo	Nº de + por PCR	Nº + por ambas técnicas	Nº + por PCR y - por cultivo	Nº + por cultivo y - por PCR
<3 días	158	31	65	14	31	34
0	≥3 días	25	5	5	9	0

to en el global de los pacientes diagnosticados de forma clínica como los confirmados por métodos de laboratorio, se relacionan en la tabla 1.

En la tabla 2 se muestra el rendimiento diagnóstico para los virus gripales utilizando el cultivo y la PCR en relación al momento de la toma de muestra en el curso de la enfermedad. Las muestras se dividen en dos grupos; uno, en el cual, la toma se realizó en los dos primeros días desde el inicio de los síntomas; y otro grupo, donde la toma se realizó a los tres o más días desde el inicio de los síntomas. Mediante cultivo celular, se diagnosticaron el 58% y 50% de los virus detectados por PCR para ambos grupos respectivamente.

DISCUSIÓN

La RT PCR confirmó el diagnóstico de gripe en el 43% de los pacientes con criterios clínicos de sospecha de gripe, contrastando con tan sólo el 20% de aislados por cultivo, resultados esperados por la mayor sensibilidad de las técnicas moleculares⁷⁻⁹. Estos hallazgos de sensibilidad con RT-PCR múltiple, se presentan similares a nuestros homólogos en Francia para el programa de Vigilancia de Gripe, comunicados por Plouceau et al¹⁰, para la temporada 2006-2007. Con los datos obtenidos mediante biología molecular, se confirma un elevado porcentaje de casos sospechosos de gripe diagnosticados con criterios clínicos, que demuestra la buena correlación y especificidad de la sintomatología clínica descrita para los virus gripales. Estos hechos, de importancia en el contexto de la vigilancia de gripe, demuestran que la selección de casos por los médicos centinelas, se realiza de forma eficaz a juicio de la clínica consensuada. En tan sólo un pequeño porcentaje de casos, se diagnosticaron otros virus respiratorios (3,8%) mediante PCR.

Todos los virus gripales tipo A detectados en la temporada 2007-2008, fueron subtipos H1. Esto supone un cambio epidemiológico de circulación de virus gripales A con respecto a años anteriores, en el que en nuestro entorno europeo^{10,11}, predominó el subtipo H3. A diferencia de Estados Unidos, en donde la circulación de subtipos H1 fueron más abundante en años anteriores, con un 70% de prevalencia en la temporada 2006-2007¹², y un predominio de H3 (75%), en la temporada del 2007-2008¹³. Por el contrario, en la temporada 2008-2009, todos los hallazgos de gripe A fueron subtipo H3, excepto uno que se confirmó subtipo H1 de origen humano, detectado en-

tre los últimos de la serie a finales de Enero del 2009. Este hecho precede a poco tiempo de la llegada de la nueva variante H1N1, emergida de México a finales de Marzo del 2009¹⁴⁻¹⁵.

Las infecciones respiratorias por virus gripales parecen incidir con mayor frecuencia en los segmentos de edades más cortas, aunque la gravedad también puede ser importante en edades avanzadas¹⁶⁻¹⁷. En la presente serie, la edad media fue de 28,9 años, con una mediana de 28 años, estando representados en proporción decreciente los diferentes grupos etarios conforme avanzamos en la edad, aunque en la temporada 2008-2009, dicha relación no se mostró de forma tan evidente. Estos hallazgos se muestran concordantes con otros estudios en los que se han documentado dichas relaciones de prevalencia de virus gripales con la edad¹⁹⁻²⁰. Sin embargo, otra serie española comunicada por Lenglet AD et al¹⁸, no refieren diferencias en la prevalencia por edades. El rango de edad fue muy amplio, desde los dos hasta los 83 años de edad, lo que demuestra y recuerda la importancia que estos virus supone para la población en general y que ningún grupo de edad está exento de padecer estas patologías; incluso pacientes vacunados, pueden sufrir la agresión de estos virus altamente variantes. En la presente serie se confirmaron dos casos en pacientes recientemente vacunados, uno de gripe A y otro de gripe B, confirmando la relativa eficacia de la vacuna antigripal.

No se ha encontrado diferencia significativa en la prevalencia por sexo ($p=0,14$) de los pacientes infectados por el virus gripal A, aunque ligéramente a favor de los hombres; así, el 57,2% de los confirmados eran hombres y el 42,8%, mujeres. Estas proporciones son similares a las halladas en otras series españolas de mayor duración, como la comunicada por Lenglet AD et al¹⁸, aunque con mayores diferencias significativas, que incluyen las temporadas comprendidas entre el año 2000 y 2004, y reflejan una proporción para mujeres y hombres del 40% y 60%, respectivamente, para los aislados gripales A; también los de Arostegi et al²¹, que incluyeron 84 casos de virus gripales, con una proporción de 41,7% y 58,3% para mujeres y hombres, respectivamente. Para los virus gripales B, no se ha encontrado ninguna diferencia en la distribución por sexo, con un 50% de representación para ambos sexos.

El número de virus detectados mediante PCR, fue muy superior al número de aislados por cultivo celular independientemente al momento de la toma de muestra en el transcurso de la enfermedad, tanto si se hizo en los dos primeros días como

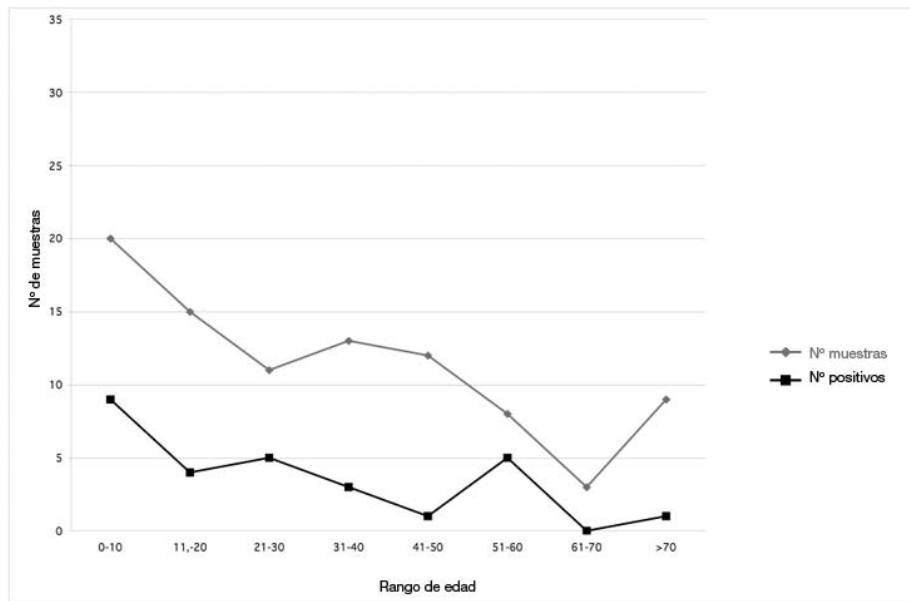


Figura 2 Muestras procesadas por rango de edad en relación a virus detectados por PCR múltiple de la temporada epidémica del 2008-2009.

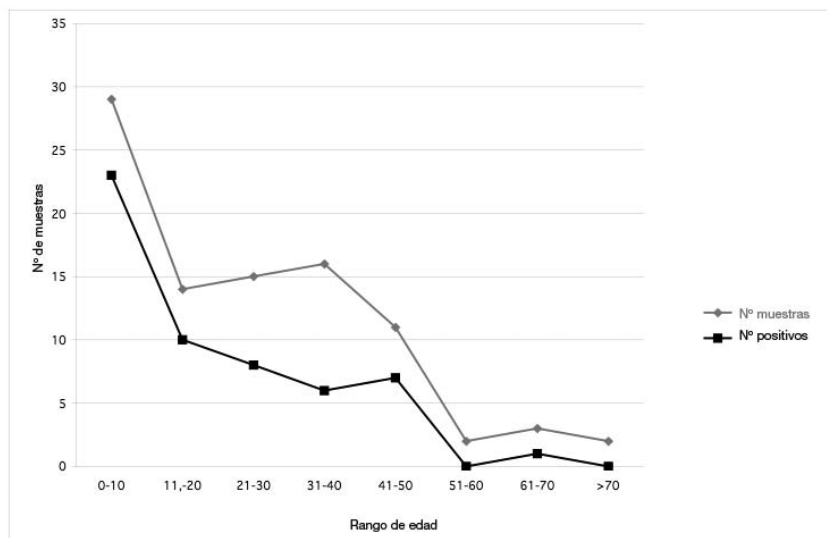


Figura 1 Muestras procesadas por rango de edad en relación a virus detectados por PCR múltiple de la temporada epidémica del 2007-2008.

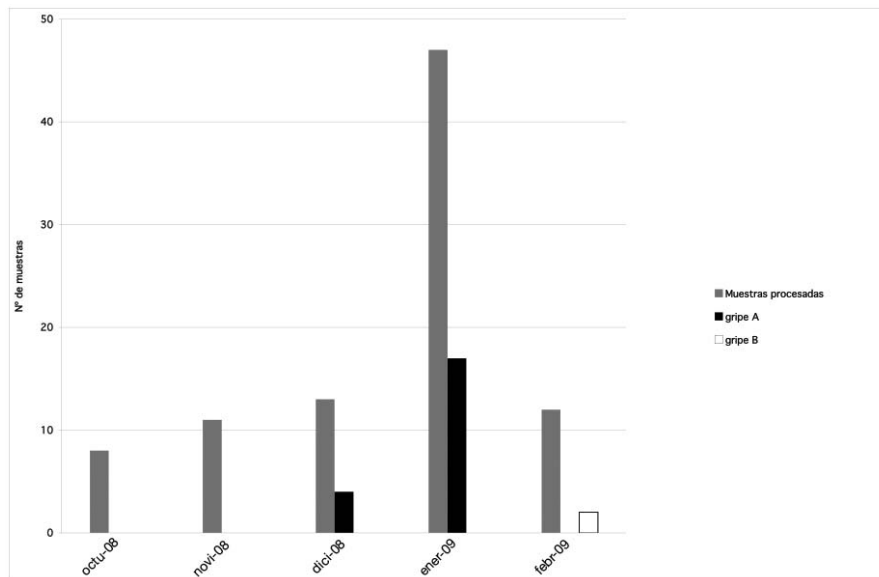


Figura 4 Evolución de muestras procesadas y virus gripales detectados a lo largo de la temporada 2008-2009 mediante RT-PCR múltiple.

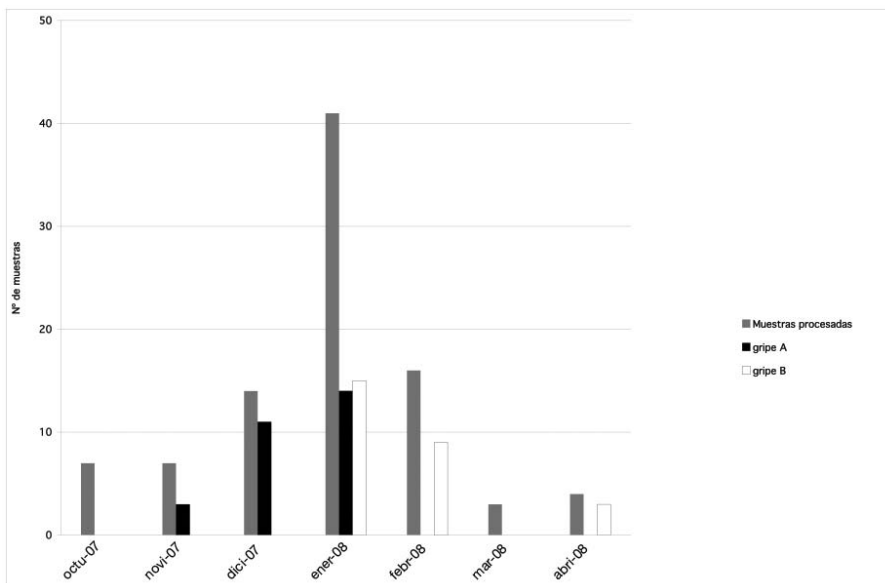


Figura 3 Evolución de muestras procesadas y virus gripales detectados a lo largo de la temporada 2007-2008 mediante RT-PCR múltiple.

en el tercer o más días desde el inicio de los síntomas. En los dos grupos separados por momento de toma, la PCR mostró un rendimiento de casi el doble con respecto al cultivo, coincidiendo con otra serie americana²² de similares características.

Los signos o manifestaciones clínicas más frecuentes, tanto en el total de pacientes sospechosos como en los confirmados por diagnóstico de laboratorio, fueron la fiebre y la astenia, representándose incluso en el 100% en los casos confirmados. La aparición súbita se encontró en segundo lugar como criterio frecuente, seguido de la tos, escalofríos, síntomas respiratorios de vías altas y mialgias.

En conclusión, podemos afirmar, que la RT-PCR se presenta como una herramienta útil para la vigilancia epidemiológica de la gripe, aportando mayor sensibilidad y rapidez al diagnóstico. Además, permite subtipar los virus gripales y detectar otros virus implicados en procesos respiratorios sin incrementar susceptiblemente su coste en relación al análisis individual, con lo que supone un valor añadido al control y vigilancia de gripe. Por otra parte, la prevalencia parece depender de la edad y no estar directamente relacionada con el sexo en la serie estudiada.

Son necesarios más trabajos que demuestren la utilidad y eficacia de la técnica de PCR en el manejo y vigilancia de la gripe, aunque los datos obtenidos parecen apuntar a una buena aplicación en este campo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Nettleman MD, White T, Lavoie S, Chafin C. School absenteeism, parental work loss, and acceptance of childhood influenza vaccination. *Am J Med Sci* 2001;321:178-180.
- 2- Neuzil KM, Hohlbein C, Zhu Y. Illness among schoolchildren during influenza season: effect on school absenteeism, parental absenteeism from work, and secondary illness in families. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2002;156:986-91.
- 3- Kahn LH. Pandemic influenza school closure policies. *Emerg Infect Dis* 2007;13:344-345.
- 4- Coiras MT, Pérez-Breña P, García ML and Casas I. Simultaneous detection of influenza A, B and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested PCR assay. *J Med Virol* 2003;69:132-144.
- 5- Programa de vigilancia de gripe en Castilla y León [consultado el 10 Septiembre 2008]. Disponible en <http://www.sanidad.jcyl.es>.
- 6- Navarro-Mari J, Sanbonmatsu-GámezS, Pérez-Ruiz M, De La Rosa-Ruiz M. Rapid detection of respiratory viruses by shell vial assay using simultaneous cultura of HEp-2, LLC-MK2 and MDCK cells in a single vial. *J Clin Microbiol* 1999;37:2346-2347.
- 7- Hindiyeh M, Hillyard DR, Carroll KC. Evaluation of the Prodesse Hexaplex multiplex PCR assay for direct detection of seven respiratory viruses in clinical specimens. *Am J Clin Pathol* 2001;116:218-224.
- 8- Van Elden LJ, Nijhuis M, Schipper P, Schuurman R, van Loon AM. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:196-200.
- 9- Smith AB, Mock V, Melear R, Colarusso P, Willis DE. Rapid detection of influenza A and B viruses in clinical specimens by Light Cycler real time RT-PCR. *J Clin Virol* 2003;28:51-58.
- 10- Plouzeau C, Paccalin M, Beby-Defaux A, Giraudeau G, Godet C, Agius G. Diagnosis and epidemiological surveillance of influenza and respiratory syncytial virus infections: interest of multiplex PCR. *Med Mal Infect* 2007;37:728-733.
- 11- Meijer A, Paget WJ, Meerhoff TJ, Brown CS, Meuwissen LE, van der Velden J; European Influenza Surveillance Scheme (EISS). Epidemiological and virological assessment of influenza activity in Europe, during the 2004-2005 winter. *Euro Surveill* 2006;11:111-118.
- 12- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: Influenza activity--United States and worldwide, 2006-07 season, and composition of the 2007-08 influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2007;56:789-794.
- 13- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: influenza activity--United States, September 30, 2007-April 5, 2008, and composition of the 2008-09 influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008;57:404-409.
- 14- Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *N Engl J Med* 2009. [Epub ahead of print].
- 15- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: infections with a swine-origin influenza A (H1N1) virus--United States and other countries, April 28, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58(16):431-433.
- 16- Takahashi M, Nagai M. Estimation of excess mortality associated with influenza epidemics specific for sex, age and cause of death in Japan during 1987-2005. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 2008;63:5-19.
- 17- Miniño AM, Heron MP, Murphy SL, Kochanek KD; Centers for Disease Control and Prevention National Center for Health Statistics National Vital Statistics System. Deaths: final data for 2004. *Natl Vital Stat Rep* 2007;55:1-119.
- 18- Lenglet AD, Hernando V, Rodrigo P, Larrauri A, Donado JD, de Mateo S. Impact of flu on hospital admissions during 4 flu seasons in Spain, 2000-2004. *BMC Public Health* 2007;7:197.
- 19- De Donno A, Quattrocchi M, Errico P, Lobreglio G, Sanapo F, Guido M. Influenza Collaborative Group. Epidemiological and virological assessment of influenza activity in Apulia, Italy, during the seasons 2004 - 2005 and 2005 -2006. *J Int Med Res* 2007;35:657-665.
- 20- Huang QS, Lopez L, Adlam B. Influenza surveillance in New Zealand in 2005. *N Z Med J* 2007;120:U2581.
- 21- Arostegi Kareaga N, Montes M, Pérez-Yarza EG, Sardón O, Vicente D, Cilla G. Clinical characteristics of children hospitalized for influenza virus infection. *An Pediatr (Barc)* 2005;62:5-12.
- 22- Zitterkopf NL, Leekha S, Espy MJ, Wood CM, Sampathkumar P, Smith TF. Relevance of influenza a virus detection by PCR, shell vial assay, and tube cell culture to rapid reporting procedures. *J Clin Microbiol* 2006;44:3366-3367.