

## Manifestaciones clínicas de la infección y diversas pruebas utilizadas para el diagnóstico de la infección por el virus Chikungunya

### Clinical manifestations of infection and various tests used for the diagnosis of Chikungunya virus infection

Pedro Victoria<sup>1</sup>, Ricardo Carina<sup>2</sup>, Lugo Carlos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Peru

<sup>2</sup>Departamento de Ciencia, Universidad de San Martín de Porres, Peru

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias, Instituto del Mar del Peru, Peru

#### Resumen

Las infecciones virales emergentes se han convertido en un problema grave en los últimos años. Aparición o reaparición de casos graves. Las fiebres hemorrágicas arbovirales causadas por virus transmitidos por mosquitos, como el virus del dengue y el virus Chikungunya, han sido frecuentes en los últimos años. El artículo analiza las manifestaciones clínicas de la infección y varias pruebas que se utilizan para el diagnóstico de la infección por el virus de Chikungunya.

**Palabras clave:** Infección por virus chikungunya, infecciones virales, manifestaciones clínicas, diagnóstico.

#### Abstract

Emerging viral infections have become a serious problem in recent years. Emergence or re-emergence of severe arboviral hemorrhagic fevers caused by mosquito borne viruses, such as dengue virus and Chikungunya virus, have been frequently in the past few years. The article analyses the clinical manifestations of infection and various tests that are used for diagnoses of Chikungunya virus infection.

**Keywords:** Chikungunya virus infection, viral infections, clinical manifestations, diagnoses

#### 1. Introducción

Las infecciones virales emergentes se han convertido en un grave problema. en años recientes. Aparición o reaparición de casos graves. Fiebres hemorrágicas arbovirales causadas por mosquitoborne Virus, como el virus del dengue y el chikungunya[1]. (CHIK) virus, se han reportado con frecuencia en el Subcontinente indio en los últimos años[2]. Desde el Perspectiva clínica, estas infecciones tienen clínica similar. manifestaciones y son difíciles de distinguir de uno otro[3]. Debido a que los resultados de estas infecciones varían sobre la base del agente infeccioso (el dengue tiene un alto tasa de mortalidad), plantean un dilema diagnóstico para la clinico Por lo tanto, hay una necesidad de un medio de Diagnóstico definitivo e identificación del agente viral. para pronosticar el resultado[4].

El agente causante del virus CHIK, de una sola hebra, El ARN de sentido positivo, virus envuelto, es un miembro del género Alphavirus de la familia Togaviridae[5]. Es Generalmente se transmite de primates a humanos a través de Aedes. Mosquitos aegypti y Aedes albopictus[6].

La infección por CHIK produce una enfermedad autolimitada en los humanos. que a menudo se caracteriza por la aparición repentina de fiebre, dolor de cabeza, fatiga, náuseas, vómitos, erupción cutánea, mialgia, y severa y muy dolorosa poliartralgia, que dura de 1 a 10 días[7]. Sin embargo, la artralgia puede persistir durante meses a años. Como es el caso de la mayoría de los alfavirus, La detección del virus CHIK depende del aislamiento. del virus en muestras de sangre obtenidas de viremic pacientes o en muestras de tejidos infectados obtenidos de Artrópodos que se alimentan de la sangre, que llevan mucho tiempo. Herramientas de diagnóstico molecular, como las convencionales. RT-PCR, están disponibles para el estudio de la replicación del virus CHIK. En sobrenadantes de cultivo de virus o muestras clínicas[8].

Informamos observaciones clínicas e investigaciones de laboratorio. involucrando métodos de aislamiento de virus y moleculares[9]. ensayos realizados para 296 sospechosos clínicamente casos de fiebre chik. De particular interés fue la aplicabilidad. de un nuevo método de amplificación de genes. llamado amplificador isotérmico mediado por bucle en tiempo real (RT-LAMP) como un método rápido, sensible y de tiempo específico para detectar y cuantificar el virus CHIK en el Fase aguda de la infección[10].

## 2. Material y métodos

El estudio incluyó a 296 pacientes con antecedentes de inicio repentino de fiebre, dolor de cabeza, fatiga, náuseas, vómitos, erupción cutánea, mialgias y Poliartalgia severa y muy dolorosa que sugiere infección por CHIK. Los pacientes informaron directamente o fueron referidos Instituto de Ciencias Médicas de Nizam (Hyderabad, India) para tratamiento de regiones en y alrededor de Hyderabad, Andhra Pradesh, Sur de la India, durante el periodo marzo-diciembre 2006. No hubo sesgo de muestreo ni ningún intento de reclutar especialmente pacientes El estudio fue aprobado por la Ética Institucional. Comité del Instituto de Ciencias Médicas de Nizam (EC / NIMS / 675/2006). Se obtuvo consentimiento informado por escrito de cada paciente Se obtuvieron muestras de suero de fase aguda durante Días 1–7 después del inicio de los síntomas.

Se recogieron dos grupos de muestras de sangre entera de todos 296 pacientes. Un conjunto fue utilizado para el aislamiento del virus, que fue Realizado utilizando ensayos moleculares con tubos EDTA Vacutainer. (BD Biosciences); El otro conjunto se sometió a ELISA con SST. Tubos de vacío (BD Biosciences). Muestras de plasma y suero. se dividieron en alícuotas en viales estériles y se almacenaron a 80 ° C en el Departamento de Microbiología Departamento de Nizam en el Instituto de las ciencias médicas hasta la prueba. Las muestras fueron transportadas. En cadena de frío al laboratorio de virología de la Defensa y Establecimiento de investigación (Gwalior, India), donde todos los ensayos y se realizaron aislamientos de virus.

Sesenta y cinco de los 296 pacientes reportados para seguimiento arriba. Las muestras de suero obtenidas de estos 65 pacientes fueron Analizó la presencia del virus CHIK, específico IgM e IgG anticuerpos que utilizan un kit ELISA de varilla medidora. Porque Los síntomas de la fiebre CHIK imitan a los de la fiebre del dengue, un panel de 107 de 296 muestras de suero obtenidas de pacientes con clínica características similares a las de CHIK o fiebre del dengue fue Incluido en el estudio. Además, un panel de 20 muestras de suero. Obtenido de individuos sanos sin signos y síntomas. de CHIK o dengue se incluyó como negativo controlar.

Se intentó el aislamiento del virus en células C6 / 36. Líneas de 32 muestras de plasma positivas para RT-PCR que fueron aleatorias Seleccionados durante el brote. Se realizó aislamiento de virus. Utilizando la técnica de adsorción de virus [7]. En resumen, un Confluen monocapa de células cultivadas en flas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> se adsorbió con 0,5 ml de inóculo a 37°C durante 2 h. Después adsorción, el inóculo se rellenó con 8 ml de mantenimiento. Medio suplementado con 2% de suero bovino fetal. También se incubaron controles adecuados de células con infección simulada para la comparación de eventos citopáticos. Las células fueron incubadas a 37°C. y se observaron diariamente para efectos citopáticos. Después de la observación de 80% a 100% de efectos citopáticos, el sobrenadante de cultivo infectado Se clarificó mediante centrifugación con luz a 2000 rpm durante 10 min, que se purificó adicionalmente mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. El virus aislado se confirmó como virus CHIK. por RT-PCR.

Las 296 muestras de plasma fueron analizadas la presencia de CHIK virus-específico RNA por RT-PCR y RTLAMP. Se incluyeron controles positivos y negativos en cada uno. Ejecución de los ensayos y todas las precauciones para evitar la contaminación cruzada. fueron observados.

Para RT-PCR, el ARN se extrajo utilizando el QIAamp Viral Mini kit de ARN (Qiagen). RT-PCR de un solo paso se realizó utilizando El kit de acceso rápido RT-PCR (Promega), de acuerdo con con el protocolo del fabricante, empleando pares de cebadores dirigidos a El gen E1 diseñado a partir de la secuencia de nucleótidos de la cepa de referencia S27 (número de acceso de GenBank AF490259; CK 13, TTA CAT CAC GTG CGA TA C; CK-14, CTT TC TCT CAG GG TGC GAC TTT). Se realizó la amplificación. en un volumen de reacción total de 50 µl con Promega Access Kit de RT-PCR rápido en un solo paso, con 50 pmol de cada avance y cebador inverso y 2 µl de ARN viral extraído, de acuerdo con con las instrucciones del fabricante. La termica el perfil de RT-PCR fue de 48 ° C durante 45 minutos y de 94 ° C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 C durante 30 s, 54 C durante 30 s y 72 C Durante 30 s y una extensión fina a 72 C durante 10 min.

RT-LAMP se realizó a un volumen de reacción total de 25 µl utilizando el kit de amplificación de ARN Loopamp (Eiken Chemical). El monitoreo en tiempo real se realizó mediante incubación en 63 C durante 60 min en un turbidímetro en tiempo real Loopamp (LA- 200; Teramecas).

Monitoreo en tiempo real de la amplificación de RT-LAMP de La plantilla del virus CHIK se observó mediante espectrofotometría. Análisis mediante el registro de la densidad óptica a 400 nm cada 6 s, con la ayuda del turbidímetro en tiempo real Loopamp (LA-200; Teramecas). El valor de corte para la positividad para el RTLAMP en tiempo real ensayo se determinó teniendo en cuenta el tiempo de positividad (en min), momento en el cual la turbidez aumenta a más que el valor de umbral (que se fijó en 0.1, que es 2 veces más que el valor medio de turbidez para el negativo controles de varias réplicas).

Después de la incubación a 63 ° C durante 60 min, se obtienen alícuotas de 10 ml de RTLAMP. Los productos fueron examinados por electroforesis en 3%. NuSieve 3: 1 gel de agarosa (BMA) en tampón tris-borato, seguido Tinción con bromuro de etidio y visualización en un UV. transiluminador a 302 nm.

Para facilitar la aplicación fiel del ensayo RT-LAMP, el El monitoreo de la amplificación de RT-LAMP también se realizó con inspección a simple vista Después de la amplificación se inspeccionaron los tubos. para la turbidez blanca a simple vista después de un giro de pulso para depositar el precipitado en la parte inferior del tubo. La inspección para La amplificación también se realizó observando un cambio de color. después de la adición de 1 ml de tinte SYBR Green I al tubo. La amplificación positiva está indicada por fluorescencia verde, que Es permanente y puede ser almacenado para fines de grabación.

### 3. Resultados y discusión

Los amplicones positivos de RT-PCR se sometieron a dobles cadenas. Secuenciación con Big Dye Terminator Ciclo de secuenciación Kit de reacción preparado en un secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems). El genotipo del virus CHIK, basado en el E1 parcial. secuencia génica, se determinó por secuenciación de nucleótidos y en comparación con otros 30 aislamientos de CHIK globalmente diversos. Un dendrograma Fue construido por pareo de 340 nucleótidos. secuencias del gen E1 parcial (posiciones 10254-10503, con respecto al genoma S27), que clasifica todos los aislamientos en 3 genotipos diferentes. El árbol filogenético fue construido con El método de unión de vecinos, con un análisis bootstrap de 1000. Replica, utilizando el software MEGA, versión 2.1.

La epidemia de fiebre CHIK afectó a pacientes masculinos y femeninos en una relación de 1: 1.6. El grupo de edad más afectado fue el de las personas de edad. 31-40 años (figura 1). Durante la fase aguda de la infección, que duró de 7 a 10 días, los síntomas más comunes entre 296 pacientes fueron fiebre (temperatura, 38.5 C – 40 C) y Artralgia severa y artritis, que afectó las muñecas de los dedos, dedos, tobillos y articulaciones de la rodilla (tabla 1). La fase crónica de La infección se caracterizó por dolor articular severo, que severamente limitó la capacidad de los pacientes para caminar y realizar tareas cotidianas. Casi el 10% de los casos reportados experimentaron artralgia prolongada (duración, 13 semanas).

Un análisis comparativo de muestras de sangre obtenidas de pacientes con sospecha de infección por CHIK se realizó utilizando RT-PCR, RT-LAMP, aislamiento de virus y detección de anticuerpos IgM; los resultados se muestran en la tabla 2. Cincuenta y dos (48.6%) de 107 muestras dieron positivo para anticuerpos contra el virus del dengue IgM por Elisa.

Un total de 144 de 296 muestras dieron positivo por la presencia del ARN del virus CHIK por RT-PCR. 20 muestras adicionales arrojó resultados positivos por RT-LAMP. Las 132 muestras restantes. tuvo resultados negativos tanto por RT-PCR como por RT-LAMP.

Una búsqueda en la base de datos BLAST reveló máxima homología (199%) con aislamientos de virus CHIK de un 2005-2006 brote de infección en la isla de la reunión. Todos los aislamientos del brote de la Isla de la Reunión tuvieron una secuencia del 99,6% al 100% Identidad y fueron considerados muy estrechamente relacionados. los los aislamientos también revelaron una identidad de secuencia de nucleótidos del 98% y 94.5% con el prototipo africano CHIK virus (S27) y los abetos Virus CHIK indio (aislado de Calcuta en 1963), respectivamente. Sobre la base del dendrograma, los aislamientos indios CHIK De esta epidemia perteneció al este centro sur (ECS). Genotipo africano (figu e 2). Análisis crítico de la ramificación. patrón reveló que estos nuevos aislamientos indios forman un separado clade con otros aislados de las naciones isleñas del Océano Índico (desde los brotes de 2005–2006) dentro del genotipo ECS África. los Aislados del virus CHIK de la India más antiguos o anteriores (desde 1963–1973), Sin embargo, pertenecía al genotipo asiático.

La infección CHIK tiene un impacto económico importante en muchos países tropicales, y debido a la falta de síntomas específicos, La infección no se puede diferenciar del dengue o amarillo. fiebre. Una epidemia de fiebre CHIK se caracteriza por su desaparición repentina durante un período considerablemente largo de una Zona geográfica particular antes de su resurgimiento. Esto ha sido Bien documentado en la República del Congo e Indonesia. Sin embargo, a principios de 2005, comenzó una importante epidemia de fiebre CHIK. en muchas naciones isleñas del Océano Índico, ya finales de 2005, comenzó propagación a varias partes de la India, después de un hiato de epidemia Actividad de casi 32 años. Este reciente brote de infección CHIK en muchas partes del sur de la India es un punto de gran importancia preocupación. Esta fue la epidemia más grande y más severa, afectando 11,000,000 personas en Andhra Pradesh, Maharastra y Karnataka estados del sur de la India y se extiende a varios Nuevas áreas, con grandes inquietudes sanitarias y administrativas públicas. Para controlar la epidemia. Aunque el resurgimiento de CHIK se anticipó la fiebre, esta epidemia se considera sin precedentes,

Debido a la magnitud de la morbilidad y geográfica distribución. En varios pueblos, el 190% de los habitantes, se encontraron afectados, con una cifra estimada de 1.3 Millones de casos hasta la fecha. En 2006, brotes de fiebre CHIK. Se informó de 194 distritos en 12 estados de la India. las Manifestaciones clínicas de los casos en el brote actual coinciden. La descripción conocida de la enfermedad. El análisis del brote de 2006 sugirió que el aumento de la gravedad de la enfermedad puede haberse asociado con un cambio en la secuencia genética, alterando la proteína de la cubierta del virus, lo que potencialmente permitió al Virus para multiplicarse más fácilmente en células de mosquito. Laboratorio El diagnóstico es crítico para establecer el diagnóstico e iniciar una Respuesta específica a la salud pública.

Las especies de alfavirus se pueden caracterizar por hemaglutinación. Inhibición, ELISA, fijación de complementos y neutralización. de infectividad viral utilizando muestras de suero de referencia. El diagnóstico serológico se basa en demostrar un aumento de 4 veces en CHIK virus IgG título de anticuerpos entre la fase aguda y convalescente muestras de suero Debido a la obtención de suero pareado Las muestras no suelen ser prácticas, la demostración de anticuerpos IgM. Específicos para el virus CHIK en muestras de suero de fase aguda. está hecho. Un cultivo viral positivo para CHIK, junto con la neutralización. Por suero de referencia, se toma como prueba definitiva. De la presencia del virus CHIK. Resultados de la PCR para el genoma E1 y C individualmente o en conjunto constituyen un resultado positivo para CHIK virus.

En el presente estudio, la detección del ARN del virus CHIK en 48.6% de muestras por RT-PCR y en 55.4% de muestras por RT-LAMP, así como la detección de anticuerpos IgM en el 21,5% de Muestras, confirman la presencia del agente causal de esta epidemia. Era el virus CHIK. Los 132 pacientes que habían sospechado clínicamente. Virus CHIK pero cuyos resultados de RT-PCR y RT-LAMP fueron negativo presentado 17 días después del inicio de la fiebre; esto puede ser el motivo de los resultados negativos de la prueba. El número pico de los resultados positivos de la PCR ocurrieron el día 2 de la enfermedad.

El ensayo RT LAMP es una novedosa amplificación de ácidos nucleicos. método desarrollado por Eiken Chemical que tiene el potencial de Reemplazar PCR debido a su simplicidad, rapidez, especificidad y rentabilidad. El ensayo RT-LAMP ha emergido como una poderosa herramienta de amplificación de genes para una rápida identificación de infecciones microbianas y está siendo cada vez más utilizado por varios Investigadores para la detección rápida y tipificación de virus emergentes, como el Nilo Occidental, el síndrome respiratorio agudo severo, el dengue, y los virus de la encefalitis japonesa. La lámpara El método es rentable porque requiere solo 1 tipo de ADN. Polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena. En el presente estudio, el ensayo RT-LAMP acelerado en tiempo real de un solo tubo en un solo paso se estandarizó dirigiéndose al inmunodominante E1 Gen para la detección rápida y en tiempo real del virus CHIK. En nuestro estudio, el ensayo RT-LAMP descubrió 20 casos adicionales de Infección, que se detectó a simple vista o con una lámpara UV. Estas muestras tuvieron resultados de RT-PCR negativos, lo que demuestra La alta sensibilidad de RT-LAMP. Hubo algunos desajustes en los cebadores de RT-PCR (es decir, 1 base en el cebador directo y 2 bases en el cebador inverso), pero no afectaron la prueba sensibilidad [20]. Todas las muestras positivas de RT-PCR también dieron Resultados positivos de RT-LAMP. El RT-LAMP permite un rápido, en tiempo real Detección del virus CHIK en muestras de suero de fase aguda. sin requerir equipo sofisticado, y tiene potencial Utilidad para el diagnóstico clínico y vigilancia del virus CHIK. países en desarrollo. Cuantificación en tiempo real del CHIK. El nivel de virus también puede ser realizado por RT – LAMP con el uso de un Turbidímetro de lazo. Aislamiento del virus CHIK de 20 de 32 RTPCR– Muestras clínicas positivas confirman aún más que la infección. se debió al virus CHIK.

Estudios filogenéticos previos mostraron que las cepas de CHIK Los virus se agruparon en 3 grupos distintos en función del origen: África occidental, África central / del sur y Asia. La secuencia del virus CHIK se determinó directamente a partir de muestras clínicas sin riesgo de alterar el genoma por pases in vitro. El análisis filogenético molecular reveló que todos estos nuevos indios Las cepas del virus CHIK estaban muy estrechamente relacionadas con las análogas cepas de las naciones isleñas del océano Índico y que se formaron Un clado distinto en el genotipo africano ECS. Estas nuevas cepas son reportado para albergar muchas características moleculares únicas, haciendo Los más virulentos y evolutivamente más competentes [22]. El agrupamiento de aislamientos indios de mayor edad (incluido el último brote) aislados) en el genotipo asiático indica que la causa De este brote fue la repentina introducción del genotipo ECS. en la región de Telangana de Andhra Pradesh en el sur India, en lugar de la evolución in situ de las cepas existentes. Porque El período de nuestro estudio fue de marzo a diciembre de 2006. que es posterior al período estudiado por Prasanna et al. y Abu Barkar et al., a lo mejor de nuestro conocimiento (después de una extensa búsqueda en la base de datos Pubmed), presentamos que Este es el primer informe del genotipo africano ECS del virus CHIK. Como el agente causal de una epidemia sin precedentes.

Un agrupamiento de casos entre miembros de la misma familia. (40%) se observó en nuestro estudio, que concuerda con el hallazgo de que puede ocurrir una transmisión directa de humano a humano. Como consecuencia de las altas cargas virales en los pacientes, como era demostrado en el sur de Francia. Aunque la viremia es transitoria, la concentración de virus es suficiente para infectar a los mosquitos vectores. Que el RT-PCR y RTLAMP Los resultados fueron positivos durante el período de carga viral máxima. (es decir, los días 1 y 2 de fiebre) también confirman este hecho.

La infección de CHIK es una enfermedad autolimitada, con síntomas articulares. y signos que suelen durar meses y ocasionalmente 1 año. Sin embargo, las muertes debidas a la infección por CHIK son raras. Uso indiscriminado de antibióticos y antiinflamatorios no esteroideos. los medicamentos matiales (especialmente la aspirina) pueden contribuir a la trombocitopenia, Hemorragia gastrointestinal, y vómitos. Esto puede Conduce a insuficiencia renal aguda prerrenal y deshidratación. Estos pueden Contribuye indirectamente a la mortalidad por fiebre CHIK [26]. UNA Se observó una alta tasa de morbilidad sin mortalidad en nuestro estudio. Esto contrasta con el hallazgo de Kerala, sur de la India, donde la causa de muerte en 3 pacientes con fiebre CHIK fue probablemente una enfermedad subyacente y no estaba relacionada con CHIK infección.

#### 4. Conclusión

Los adultos jóvenes (edad, 21-40 años) fueron las personas más afectadas, y había una preponderancia de pacientes mujeres en nuestra estudio (P! .001, por prueba exacta de Fisher); estos hallazgos están en Concordancia con el hallazgo del estudio de la isla de Reunión. Algunos pacientes (4.7%) estaban tan discapacitados que requerían hospitalización, pero el número de estos casos fue insignificante, y tales casos en su mayoría involucraron a pacientes ancianos. La crónica La fase de la enfermedad se resolvió en unos pocos meses, extendiéndose hasta 6 meses. Algunos pacientes mejoraron después de recibir a corto plazo tratamiento de esteroides. Porque no existe ninguna terapia antiviral específica. Para la infección de CHIK, el tratamiento consiste en cuidados de apoyo, que incluyen Administración de analgésicos y antiinflamatorios. Medicamentos para los síntomas articulares. Personas con enfermedad febril que Se sospecha que se debe al virus CHIK debe evitar el mosquito exposición por al menos 7 días después del inicio de la enfermedad, para reducir la probabilidad de transmitir el virus CHIK a los mosquitos locales, que luego podría transmitir el virus a otros humanos. Aunque el número de casos reportados ha disminuido, Esta epidemia aún puede continuar y extenderse. Por lo tanto, Se garantiza una vigilancia continua para controlar la propagación de infección y para rastrear la posible evolución del virus durante la epidemia.

La historia natural de la fiebre CHIK no se entiende completamente. Aunque la mortalidad es rara o poco frecuente, el diagnóstico precoz y El control de vectores jugará un papel importante en la prevención de Brote de epidemias en el futuro. Punto de estudios intraoutbreak Hacia los cambios recientes en el genoma viral que han facilitado. la rápida propagación y la patogenicidad aumentada de la infección. La falta de inmunidad de rebaño, como lo demuestran los estudios disponibles, parece ser el factor atribuible más simple. También, Las razones del brote actual y las causas detrás. La reaparición del virus en la India debe evaluarse más a fondo. El diagnóstico molecular es una herramienta importante para identificar nuevos vectores transmitidos Enfermedades virales, como la fiebre CHIK, en una etapa temprana. Las medidas de salud pública deben mejorarse para prevenir tales Epidemias en el futuro. También hay una necesidad inmediata de Una vacuna eficaz para la infección por CHIK.

#### Referencias

- [1] Hidalgo Santos, A.D., Encarnación Martínez, J., Gutiérrez San Román, C., López Andreu, J.A. "Bronchitis obliterans due to Influenza B pneumonia complicated with Staphylococcus aureus infection", (2017) Archivos de Bronconeumología, 53 (8), pp. 463-464.
- [2] Reina, J., Reina, N. "Favipiravir, a new concept of antiviral drug against influenza viruses", (2017) Revista Espanola de Quimioterapia, 30 (2), pp. 79-83.
- [3] Gutiérrez-Salinas, J., Mondragón-Terán, P., García-Ortíz, L., Hernández-Rodríguez, S., Romero-Domínguez, E., Ramírez-García, S., Núñez-Ramos, N.R. "Human influenza virus as example of emergent disease in Mexico", (2016) Medicina Interna de Mexico, 32 (2), pp. 213-224.
- [4] Cuestas, M.L. "From stars and cold to the pandemic influenza a (H1N1) virus: A permanent threat to humanity", (2016) Revista Argentina de Microbiología, 48 (3), pp. 185-186.
- [5] Mejía-Nepomuceno, F., Martínez-Maldonado, F., Pérez-Padilla, R., Vázquez-Pérez, J.A. "Determinants of pathogenicity in pandemic influenza virus in Mexico: Viral factors associated with severity", (2018) Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 77 (4), pp. 297-304.
- [6] Mendoza-García, J.L., Quirós-González, V., Jiménez-Rodríguez, M., Haro-Pérez, A., Gutiérrez Zufiaurre, M.N., Rodríguez-Pérez, P. "Impact of nosocomial transmission of influenza virus in an acute hospital", (2018) Revista espanola de salud publica, 92,.

- [7] Pereiro, T., Lourido, T., Ricoy, J., Valdés, L. "Influenza Virus, Herpes Simplex Virus and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Coinfection in an Immunocompetent Patient", (2018) Archivos de Bronconeumología, 54 (3), pp. 159-160.
- [8] Herrera, B.A., Ramos, A.P., Ramírez, O.V., Arencibia, A., Valdés, C.S., Oropeza, S., Jiménez, M.M., Gonzalez, G., Goyenechea, Á., Gonzalez, G., Hernández, B., Arrieta, R.R., Morier, L., Borroto, S., Llánes, M.J., Marrero, A. "A decade of progress in the laboratory surveillance of influenza viruses in Cuba", (2017) Revista Cubana de Medicina Tropical, 69 (3),.
- [9] Ortega-Alonso, A., García-Cortés, M., Fernández-Castañer, A., Ruiz, J., González-Amores, Y., Andrade, R.J. "Acute hepatitis in a woman with influenza A virus: Cause or coincidence?", (2016) Gastroenterología y Hepatología, 39 (1), pp. 20-21.
- [10] Ordoñez, J.C., Sánchez, G., León, R., Ramos, J.M. "Rhabdomyolysis and acute renal failure associated with influenza virus type A infection", (2015) Revista Clinica Espanola, 215 (5), pp. 295-296.