

Influenza humana a H1N1: pandemia esperada

Carla S. Telo Velosa, Marisela Silva

Servicio de Enfermedades Infecciosas del Adulto. Hospital Universitario de Caracas

RESUMEN

La influenza es responsable de incremento en la morbilidad y mortalidad, del costo de las hospitalizaciones y de ausentismo escolar y laboral. Es producida por el virus de la influenza perteneciente a la familia Orthomixoviridae y es un virus ARN envuelto. El período de incubación va de 1 a 4 días. Las manifestaciones clínicas incluyen fiebre y varían desde conjuntivitis leve a neumonía grave con falla multiorgánica, hemorragia pulmonar, náuseas, vómito y diarrea. Se han reportado pandemias importantes con cifras de defunciones alarmantes. La influenza AH1N1, actualmente circulante desde marzo del 2009, es el producto de la recombinación genética del virus de la influenza porcina euroasiática, influenza porcina de Norteamérica, influenza aviar no H5, e influenza humana. Hasta el 13 de septiembre del presente año la OMS ha notificado la aparición de más de 296 471 casos y al menos 3 486 defunciones. En la región de América se informa de más de 124 126 casos con 2 625 defunciones. Según el Ministerio de Salud, en Venezuela se informa de 5 171 casos sospechosos, 1 316 confirmados y 67 defunciones por influenza AH1N1, hasta el 17 de septiembre de 2009. El lavado frecuente de manos, aislamiento de los sospechosos, tratamiento con oseltamivir o zanamivir y la inmunización al personal susceptible al tener disponible la vacuna son medidas indispensables en la prevención de la diseminación de la pandemia.

Palabras clave: Influenza, pandemias, AH1N1

SUMMARY

Influenza impacts morbidity, mortality and healthcare costs. It causes school and work absenteeism. The responsible microorganisms are RNA viruses belonging to Orthomixoviridae family. Uncomplicated influenza begins after an incubation period of 1 to 4 days. Symptoms include fever, and in some cases mild conjunctivitis, but other patients have severe pneumonia with multiorgan failure, pulmonary bleeding, nausea, vomiting, and diarrhea. New influenza A H1N1 is a genetic recombination of Euro-

Asian swine influenza virus, seasonal influenza virus, and H3N2 virus as the one isolated in Australia in 2007 (A/Brisbane/10/2007). As of September 13, 2009, the World Health Organization reported more than 296 471 confirmed cases worldwide with at least 3 486 deaths. In the Americas the figure reaches more than 124 126 cases, and 2 625 deaths. Venezuelan Ministry of Health has confirmed 1 316 cases with 67 deaths. Regular hand hygiene measures, isolation of cases, oseltamivir or zanamivir therapy to suspected or confirmed cases, and vaccination of susceptible people once the new vaccines become available are all important prevention measures.

Key words: Influenza, pandemic, AH1N1

INTRODUCCIÓN

La influenza en virus, que a lo largo de la historia ha tenido varias denominaciones, la más famosa es la de "Gripe". Se puede presentar en forma epidémica estacional o pandémica, motivo por el cual ha sido ampliamente descrito a través de los años, aislado por primera vez en 1933 (1) y registrándose brotes epidémicos cada 1 a 3 años, por lo menos desde hace 400 años. Sin embargo, faltan por dilucidar muchos aspectos de la enfermedad.

Su impacto en la actualidad está dado por el aumento en la tasa de mortalidad asociada a enfermedades respiratorias crónicas, el costo anual en hospitalizaciones y el ausentismo laboral y escolar de aquellos que la padecen.

Esta enfermedad febril aguda, representa un ejemplo clásico de las enfermedades emergentes y re-emergentes, con una historia bien documentada a lo largo de sus pandemias más importantes:

- Influenza Española de 1918-1919, que dio la vuelta al mundo en 4-6 meses, con ondas epidémicas durante 2 años y que produjo la muerte de 40-50 millones de personas.

- Influenza Asiática de 1957, en la que murieron 2 millones de personas en el mundo.
- Influenza Hong-Kong en 1968, con 1 millón de muertes en el mundo, considerándose la más benigna de las tres.

También han existido otras epidemias como las ocurridas en el Reino Unido (1995), Hong Kong (1997, 1999), Países Bajos (2003) y Canadá (2004) (1-3). El origen del virus influenza humano de la pandemia de 1918 es un misterio. En el resto de las pandemias ulteriores todos los virus influenza A han sido descendientes de los virus aviarios prevalentes. Se cree que todos los virus influenza A son endémicos en aves de agua salvajes, los cuales adquieren la capacidad de cambiar de hospederos, producir enfermedades en estos y en algunos casos, establecer la capacidad de propagarse entre estos nuevos hospederos (3,4). Científicos a nivel mundial han sostenido reuniones y difundido planes estratégicos para enfrentar una posible pandemia de influenza, que se pensó inicialmente sería consecuencia de un virus aviar, debido a la aparición e incremento de la enfermedad en aves hace algunos años y a la periodicidad con la cual se presentan las pandemias de influenza.

Conociendo al virus

Los virus de la influenza, pertenecen a la familia Orthomixoviridae y son virus de ARN envueltos. Existen 3 serotipos A, B y C que infectan al hombre. Esto determina diferencias en relación con su estructura, posibles huéspedes, epidemiología y características clínicas (1).

La envoltura de los virus influenza A y B contiene dos tipos diferentes de proteínas: la hemaglutinina (H), glicoproteína, relevante para la capacidad infecciosa del virus y la neuraminidasa (N). Estas glicoproteínas son los determinantes más importantes de la virulencia de estos virus. En caso de los virus C, sólo existe una proteína que tiene funciones de hemaglutinina y neuraminidasa. En contraste con los virus B y C, los virus influenza A pueden producir enfermedad severa, proceder de reservorios animales y tener potencial pandémico (1,2,5). Existen 16 subtipos de hemaglutininas (H1-H16) y 9 de neuraminidasas (N1-N9) (2).

Los cambios moleculares en el genoma ARN ocurren a través de dos mecanismos principales: Mutaciones puntuales (drifts) y re-arreglos en segmentos (shifts). Las primeras causan cambios menores en el carácter antigénico de los virus, siendo responsables de la enfermedad estacional; en tanto los re-arreglos en los segmentos conducen a la creación de un nuevo subtipo y

se presentan cuando una célula hospedera se infecta con dos o más virus influenza A, y son estos virus los responsables de la aparición de las pandemias (1,5).

La influenza A es responsable de epidemias que afectan no sólo al hombre sino también a cerdos, caballos, focas y una gran variedad de aves. Se ha aislado virus influenza de aves acuáticas como patos, gansos, golondrinas marinas, gaviotas y de aves domésticas como pavos, pollos, codornices, faisanes, gansos y patos. Los cerdos son susceptibles de ser infectados tanto de cepas provenientes de aves, como de humanos, por lo cual son considerados un laboratorio genético para la producción de cambio y generación de virus con diferentes características antigénicas (1,3,5).

Epidemiología, influenza estacional e influenza pandémica

Hasta el año 2006, los virus influenza porcinos que circulaban en Norteamérica eran los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2. Los virus H1N1 han circulado en la población porcina desde la pandemia de la influenza española de 1918. Desde 1930 a 1998, el subtipo H1N1 ha sido el subtipo predominantemente aislado en el ganado porcino de Estados Unidos de América (EUA). En 1998 fue aislado un nuevo subtipo, el H3N2. Un año después se presentó el H1N2 mediante el arreglo de N1H1 y H3N2. Finalmente, el cuarto subtipo, el H3N1, ha surgido del re-arreglo de los subtipos H3N2 aviar, del H1N1 humano y de los virus de influenza porcina circulantes en EUA (1,5-7).

Todos estos cambios hacen que el virus no sea adecuadamente detectado y neutralizado por los mecanismos inmunitarios, y que la vacuna que protege contra determinado tipo de virus no sea eficaz para uno diferente. Por ello es necesario inmunizar anualmente a la población en mayor riesgo de complicaciones y al personal de salud (1,5,6).

Existen claras diferencias entre la influenza epidémica o estacional y la pandémica. En primer lugar debe recordarse que una epidemia es un brote circunscrito a una zona determinada, mientras que las pandemias suelen tener transmisión rápida y casi universal.

La influenza estacional suele tener un inicio brusco, alcanzando un pico máximo en unas 2 ó 3 semanas y mantenerse de 5 a 6 semanas (8), con una tasa global media de 10 % a 20 % y de 40 % a 50 % en subgrupos con condiciones especiales (escolares, ancianos, pacientes con patologías pulmonares, diabéticos, embarazadas y pacientes viviendo con VIH, entre otros). En las zonas de clima templado las epidemias se producen casi

exclusivamente en los meses de invierno, de octubre a abril en el hemisferio norte y de mayo a septiembre en el hemisferio sur; mientras que en los trópicos puede aparecer a lo largo de todo el año (1). En Venezuela suele presentarse el mayor número de casos entre en los meses de mayo a julio. Las pandemias de influenza ocurren pocas veces a lo largo de un siglo.

Fisiopatología y manifestaciones clínicas de la influenza

Para la unión y entrada del virus, se requiere de la mediación de la hemaglutinina para unirse a los receptores de ácido siálico en la superficie celular. La neuraminidasa permite la diseminación del virus al romper los enlaces glucosídicos al ácido siálico en las células hospederas y la superficie de los virus (1,5,6).

La excreción del virus comienza unas 24 a 48 horas antes de la aparición de la sintomatología, alcanzando su máximo en las primeras 24 a 72 horas de la enfermedad y disminuyendo en los siguientes días, siendo usualmente baja o indetectable al quinto día de enfermedad, con excepción de los pacientes inmunocomprometidos, donde la excreción puede permanecer por semanas o meses (8,9). La forma de transmisión es por medio de gotas mayores de 5 µm de diámetro, las cuales son generadas cuando las personas infectadas hablan, tosen o estornudan.

En forma experimental, el virus de la influenza puede sobrevivir en superficies duras y no porosas como metales y guantes durante 24-48 horas y en la ropa, papel y tejidos durante 8-12 horas en condiciones de 35 %-40 % de humedad y temperatura de 28° C. Los virus pueden ser transferidos de las superficies no porosas a las manos hasta 24 horas después de ser contaminados, aun cuando los tejidos pueden transferir los virus a las manos hasta 15 minutos después de que el tejido fue contaminado (1,5,9).

El período de incubación tiene un rango de 1 a 4 días, y el intervalo promedio entre la aparición de la enfermedad en 2 pacientes sucesivos en una cadena de transmisión es de 2-4 días. Los niños en edad preescolar y escolar pueden amplificar la transmisión al igual que cualquier grupo que viva en proximidad (1,9). Se han observado manifestaciones clínicas menores como conjuntivitis leve (principalmente con la H7N7 aviar) hasta neumonía grave con falla multiorgánica (principalmente con la H5N1). La edad promedio de presentación es en la segunda década de vida. Otros síntomas que pueden presentarse son la hemorragia pulmonar, náuseas, vómitos y diarrea. Los hallazgos de

laboratorio incluyen trombocitopenia y linfopenia, elevación en la creatinina y aminotransferasas. En los estudios radiológicos de tórax se pueden evidenciar infiltrados intersticiales, consolidación lobar y broncogramas aéreos (1,8,9).

En los casos no complicados, la enfermedad se resuelve en 1-2 semanas. Un 68 % de los pacientes con H5N1 evolucionan a síndrome de distress respiratorio del adulto y a falla multiorgánica dentro de los 6 días de aparición de la enfermedad. La mortalidad alcanza 33 %-59 % a los 9-10 de inicio de la enfermedad en promedio (1,8,9).

La influenza es capaz de ocasionar la muerte por diferentes mecanismos, como la neumonía viral primaria, neumonía bacteriana secundaria en pulmones previamente afectados por el virus y mediante un síndrome similar al de la dificultad respiratoria aguda posiblemente asociado con una respuesta inmune exagerada. Además puede haber exacerbación de enfermedades crónicas, como la diabetes mellitus, enfermedades renales e insuficiencia cardiaca congestiva (1,8,9).

Otras complicaciones son: neumonía bacteriana secundaria, exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y de las crisis asmáticas, miositis, complicaciones cardíacas tipo miocarditis y pericarditis, síndrome de shock tóxico, síndrome de Guillain-Barré, encefalitis, mielitis transversa y síndrome de Reye (1).

Influenza AH1N1

La influenza AH1N1, circulante desde marzo de 2009, es el producto de la recombinación genética de los virus de influenza porcina euroasiática, influenza porcina de Norteamérica, influenza aviar no H5, e influenza humana (10).

El período infeccioso para la influenza porcina en humano (H1N1) es desde 1 día previo a la aparición de la enfermedad hasta 7 días después. Los primeros casos fueron reportados en México en marzo del presente año, y rápidamente se diseminó a 116 países en los cinco continentes en menos de 3 meses (9).

La capacidad infectante se ha mantenido similar a otras pandemias, pero no la tasa de mortalidad, la cual ha sido menor.

Diagnóstico

El diagnóstico epidemiológico inicial se basó en las definiciones emanadas del CDC (11) para caso sospechoso influenza humana A (H1N1):

1. Paciente con enfermedad respiratoria aguda caracterizada por al menos dos de los siguientes: rinorrea o congestión nasal, dolor faríngeo, tos [con o sin fiebre o febrícula] quien

ha tenido un contacto cercano con un caso confirmado de influenza porcina en humano (H1N1) durante el período infeccioso del caso, o

2. Paciente con enfermedad respiratoria aguda que ha viajado o que reside en un área donde hay casos confirmados de influenza porcina en humanos.

En la actualidad esta definición ha sido modificada debido a la aparición de casos con epidemiología difícil de precisar y provenientes de zonas muy diversas a lo largo de todos los continentes.

El diagnóstico definitivo se realiza mediante el aislamiento del virus en los cultivos provenientes de muestras clínicas, o por PCR de tiempo real (RT-PCR) (11). Se requiere una toma adecuada de exudado nasal o faríngeo por hisopado, manteniendo la muestra en un medio adecuado para cultivo viral y procesándola en forma precoz, preferiblemente en las primeras 24 horas; de requerir traslado o mantenimiento, el mismo se debe realizar en nevera o hielo en ese período de tiempo, no en congelador (1).

Existe la posibilidad de realizar un diagnóstico rápido parcial, el cual toma aproximadamente 30 minutos, solo para determinar si se trata de un virus de Influenza A o B y de esta forma obtener una orientación diagnóstica más rápida, sobre todo en casos de pandemias. Entre estas pruebas se incluyen el Directigen Flu A + B (Becton-Dickenson); Flu OIA (BioStar) y Quick Vue Influenza A + B (Quindel Corporation). La muestra respiratoria se trata con un mucolítico y después se analiza, bien en un papel de filtro (Directigen), en un aparato óptico (Flu OIA) o con una varilla (Quick Vue); se desarrolla una reacción con un cambio de color si existen antígenos específicos. También se cuenta con otra variante denominada ZstatFlu (ZymeTx) en la que se detecta la actividad de neuroaminidasa viral de la muestra utilizando un sustrato cromogénico. La sensibilidad de estas pruebas con relación a los cultivos virales varía de 40 % a 80 % y especificidad de 85 % a 100 % (13-18).

El CDC establece como caso confirmado de influenza humana A H1N1 a la persona con enfermedad respiratoria aguda, con confirmación por laboratorio para H1N1 mediante RT-PCR en tiempo real y/o cultivo viral (12).

Tratamiento

Debido que, un 90 % de la influenza estacional humana, serotipos H1 y H3 tienen resistencia a los adamantanos (rimantidina y amantadina), la recomendación en las condiciones de pandemias

es el uso de los inhibidores de neuroaminidasa (oseltamivir y zanamivir) (1,2,6,9,19).

Estos antivirales actúan inhibiendo la función de la neuroaminidasa, quedando los nuevos viriones incapacitados para salir de la célula huésped. La tasa de resistencia hasta ahora ha sido muy baja, 1,5 % (20) y son pocos los efectos secundarios. El mecanismo de acción de ambos medicamentos es idéntica; el oseltamivir viene en presentación oral en tabletas de 75 mg, y el zanamivir viene en polvo para inhalar en presentación de 5 mg para obtener dosis efectiva por cápsula inhalada de 4 mg. Este último ha sido relacionado con hiperreactividad bronquial como efecto secundario (1). Las dosis recomendadas se observan en la Tabla 1.

Tabla 1
Profilaxis y tratamiento de influenza con inhibidores de neuraminidasa en niños y adultos

Agente y grupo		Tratamiento	Profilaxis
Oseltamivir	Adultos	75 mg 2 veces al día por 5 días	75 mg al día por 5 días
	Niños	60 mg al día (en 2 dosis)	30 mg al día
	>12 meses	90 mg al día (en 2 dosis)	45 mg al día
	12-23 kg	120 mg al día (en 2 dosis)	60 mg al día
	24-40 kg	150 mg al día (en 2 dosis)	75 mg al día
	>40 kg		
Zanamivir	Adultos	2 inhalaciones de 5 mg cada 12 horas	2 inhalaciones de 5 mg al día
	Niños	2 inhalaciones de 5 mg cada 12 horas	2 inhalaciones de 5 mg cada 12 horas
	años	> 7	

Existen grupos de alto riesgo para influenza estacional como los menores de 5 años y mayores de 60 años, pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica u otras patologías pulmonares crónicas, enfermedades cardíacas, diabetes mellitus, cáncer, otras enfermedades inmunodepresoras, embarazadas y personal de salud (12,21).

Oseltamivir, zanamivir, amantadina y rimantadina se consideran medicamentos categoría C. Debido a que se desconocen los efectos de estos medicamentos en las embarazadas y sus fetos solo deben usarse durante el embarazo si los beneficios potenciales justifican el riesgo para el embrión o feto. Sin embargo, no se han informado efectos adversos en mujeres que recibieron oseltamivir o zanamivir durante el embarazo o en sus bebés, hasta la presente fecha (12).

Prevención

Las recomendaciones hechas por la OMS están diseñadas para reducir la exposición a personas susceptibles a un agente infeccioso (12).

La prevención se basa en medidas farmacológicas y no farmacológicas. Las no farmacológicas se enfocan a limitar la diseminación del virus mediante tamizaje y restricciones; reducir la diseminación dentro de poblaciones mediante el aislamiento de personas enfermas, monitoreo y cuarentena de expuestos y medidas de distanciamiento social, como suspensión de reuniones en masa y cierre de escuelas; reducción del riesgo individual mediante higiene de las manos y la información de los riesgos al público.

Las medidas farmacológicas incluyen el tratamiento de los casos confirmados y sospechosos y la profilaxis a los contactos cercanos (12).

Inmunización: La estrategia de inmunizaciones busca mantener la integridad del sistema de salud, reducir la morbilidad, la mortalidad y la transmisión del virus pandémico a las comunidades (21,22). A comienzos de junio 2009, la OMS realizó consultas con expertos en relación con las sustancias adicionadas a la vacuna para hacerla más eficaz, encontrando que parece ser segura. Sin embargo, se debe realizar una vigilancia estricta de la misma una vez salga al mercado. El riesgo potencial de presentarse síndrome de Guillain-Barré como efecto adverso posterior a la vacuna, no puede ser excluido totalmente; la razón de su aparición no se conoce con certeza. No obstante, las vacunas contra la influenza A H1N1 han sido elaboradas cumpliendo los estándares y se seguirá una vigilancia rigurosa (22). Las vacunas contra la influenza estacional probablemente no den protección contra la cepa pandémica, pero se están desarrollando vacunas contra el virus H1N1, de virus inactivado, a virus muerto y vacunas con virus vivo atenuado, con o sin adyuvantes o aditivos, las cuales estarán disponibles en corto plazo. Los grupos que deben ser vacunados incluyen a las embarazadas, los

trabajadores de salud, los contactos y cuidadores de niños menores de 6 años de edad, niños entre 6 y 18 años de edad, adultos sanos entre 19 y 24 años de edad y adultos con comorbilidades entre 25 y 64 años de edad (26).

Situación actual

Hasta el 13 de septiembre del presente año la OMS ha notificado la aparición de más de 296 471 casos y al menos 3 486 defunciones. En la región de América se informa de más de 124 126 casos con 2 625 defunciones (23,24). La OMS sugiere a los países del hemisferio norte estar preparados para una segunda oleada de la pandemia y en los países donde la misma llegó posteriormente a prepararse para un aumento de los casos. Esta pandemia H1N1 se diferencia notablemente de la influenza estacional: afecta pacientes más jóvenes; la mayoría de los casos severos y muertes han ocurrido en pacientes menores de 50 años, siendo menores en los ancianos. El virus compromete severamente al pulmón, causando insuficiencia respiratoria; se evidencia un riesgo aumentado en embarazadas y pacientes con asma, diabetes, obesidad, enfermedad cardiovascular e inmunocompromiso. En pacientes viviendo con el VIH la enfermedad ha sido leve cuando el paciente está en tratamiento antirretroviral. La resistencia a oseltamivir hasta ahora no ha sido importante a pesar de la administración de millones de cursos de tratamiento a nivel mundial (25). La temida pandemia ha llegado y parece que nos acompañará por algún tiempo.

REFERENCIAS

1. Mandell G, Bennett J, Dolin R. Enfermedades infecciosas principios y prácticas. 6ª edición. 2:2060- 2085.
2. Straus St. Influenza and its virus. En: Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G, editores. Mechanisms of microbial disease. 3ª edición. Williams & Wilkins. 1998.
3. Sandrock C, Kelly T. Clinical review: Update of avian influenza A infections in humans. Crit Care. 2007;11:209. Ta-1 Taubenberger JK, Morens DM. Influenza revisited. Emerg Infect Dis. 2006;12:1-2.
4. Acuña G. Influenza: Historia y amenazas. Rev Chil Infect. 2004;21(2):162-164.
5. Guadalupe A. Influenza: Historia de una enfermedad. Rev Biomed. 1999;10:57-61.
6. Straus St. Influenza and its virus. En: Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G, editores. Mechanisms of microbial disease. 3ª edición. Williams & Wilkins. 1998.
7. Lekcharoensuk P, Lager KM, Vemulapalli R, Woodruff M, Vincent AL, Richt JA. Novel swine influenza virus subtype H3N1, United States. Emerg Infect Dis. 2006;12:787-794.
8. Navas T, Calatroni MI. Estado actual de la vacunación

- en adulto y grupos especiales. *Méd Caracas*. 2008;116: 524-530.
9. Murphy B, Nelson D, Wright P. Secretory and systemic immunology response in children infected with live attenuated influenza A virus. *Infect Immun*. 1982;36:1102-1108.
 10. Influenza A H1N1: Situation Update. World Health Organization. Communicable Disease Newsletter. May 2009;6(1):1-4. URL: http://www.searo.who.int/LinkFiles/CDS_News_letter_vol-6_issue-1.pdf
 11. Cox RJ, Brokstad KA, Ogra P. Influenza virus: Immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol*. 2004;59:1-15.
 12. World Health Organization Writing Group. Non-pharmaceutical interventions for pandemic influenza, international measures. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:81-87.
 13. Covalciuc K, Webb K, Carlson C. Comparison of four clinical specimen types for detection of influenza A and B viruses by optical immunoassay (Flu OIA test) and cell culture methods. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3971-3974.
 14. Noyola D, Clark B, O'Donnell. Comparison of a new neuraminidase detection assay with an enzyme immunoassay, immunofluorescence, culture for rapid detection of influenza A and B viruses in nasal wash specimens. *J Clin Microbiol*. 2000;38:1161-1165.
 15. Boivin G, Hardy I, Kress A. Evaluation of a rapid optical immunoassay for influenza viruses (Flu OIA test) in comparison with cell culture and reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39:730-732.
 16. Herrmann B, Larsson C, Zweyberg B. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR. Comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (Flu OIA test). *J Clin Microbiol*. 2001;39:134-138.
 17. Landry M, Ferguson D. Suboptimal detection of influenza virus in adults by the Directigen A + B enzyme immunoassay with the number of antigen-positive cells detected by cytospin immunofluorescence. *J Clin Microbiol*. 2003;41:3407-3409.
 18. Cazacu A, Greer J, Taherrivand M, Demmler G. Comparison of lateral flow immunoassay and enzyme immunoassay with viral culture for rapid detection of influenza viruses in nasal wash specimens from children. *J Clin Microbiol*. 2003;41:2132-2134.
 19. Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidance on antiviral recommendations for patients with confirmed or suspected swine influenza A (H1N1) virus infection and close contacts. URL: <http://www.cdc.gov/swineflu/recommendations.htm>.
 20. Tamura D, Mitamura K, Yamazaki M, Fujino M, Nirasawa M, Kimura K, et al. Oseltamivir-resistant influenza A viruses circulating in Japan. *J Clin Microbiol*. 2009;47:1424-1427.
 21. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Novel influenza A (H1N1) virus infections in three pregnant women — United States, April–May 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009 May 15; 58:497. (URL: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm58d0512a1.htm>)
 22. World Health Organization. Vaccines for Pandemic Influenza A (H1N1). 2009. URL: http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/h1n1_vaccine_20090713/en/index.html
 23. World Health Organization. Vaccines for Pandemic Influenza A (H1N1). 2009. URL: http://www.who.int/csr/disease/swineflu/frequently_asked_questions/vaccine_preparedness/en/index.html
 24. World Health Organization: Pandemic (H1N1) 2009 - update 66. URL: http://www.who.int/csr/don/2009_09_18/en/index.html
 25. World Health Organization. Preparing for the second wave: lessons for current outbreaks. 28 August 2009. URL: http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/h1n1_second_wave_20090828/en/index.html
 26. CDC H1N1 flu. 2009 H1N1 Vaccine. URL: <http://www.cdc.gov/h1n1flu/vaccination/acip.htm>