

Gerardo Arrevillaga Boni
Beatriz Gómez García

Clinical and laboratory, correlatiom from cere-
brospinal fluid procoagulant activity in bacterial
meningoencephalytis

Aspectos moleculares de coinfecciones de virus respiratorios con bacterias

Fecha de aceptación: mayo 2006

Resumen

Estudios epidemiológicos, así como modelos experimentales, sugieren que cuadros clínicos por infecciones virales respiratorias, frecuentemente se complican por infecciones bacterianas secundarias. Los mecanismos moleculares y bioquímicos responsables de la coinfección no están aclarados del todo, a pesar de que estudios sobre la interacción entre virus respiratorios y bacterias datan desde los años veinte del siglo pasado. Las alteraciones por el virus en las células infectadas modifican directa y/o indirectamente las actividades microbicidas de la célula. Los procesos bactericidas de la célula son iniciados en respuesta al reconocimiento del hospedero de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), a través de sensores membranales o intracelulares como los receptores tipo toll (TLR). La interacción del receptor con PAMPs activa vías de transducción de señales que inducen la expresión de genes involucrados en el control de la respuesta celular contra la bacteria. El control de la infección primaria viral y secundaria bacteriana depende de un balance fino y multifactorial entre célula, bacteria y virus, el cual es seriamente perturbado por la coinfección. En esta revisión se analizan los cambios en la célula hospedera originados por virus respiratorios y bacterias que favorecen la coinfección.

Palabras clave: *interacción hospedero, bacteria, virus.*

Abstract

Epidemiological, clinical and in animal models studies associate primary viral infection with secondary bacterial infections. Biochemical and molecular mechanisms involved on viral bacterial interactions are not well understood, albeit studies on respiratory virus and bacteria co-infections date from the twenty years of last century. Alterations in the infected cell by the virus direct and/or indirect modify the host bactericidal activities. Host cell bactericidal processes start as response to the host recognition of microbial components, known as pathogen associated molecular patterns ((PAMPs) through membrane recognition receptors such as toll like (TLR). PAMPs and TLR interactions activate transduction signals which induce the expression of genes involved in the immune response against bacteria. Control of viral primary infection and the secondary bacterial infection is a multifactor process and requires in tune interaction between host cell, bacteria and virus which easily can be disturbed by co-infection. Here we review cell host changes due to respiratory virus and bacteria that favors co-infection.

Keywords: *bacteria, virus, host cell interaction.*

Introducción

El sistema respiratorio está constantemente amenazado por distintos agentes patógenos, principalmente virus y bacterias.^{4,16} El efecto que tiene una infección viral sobre los mecanismos de las células infectadas

puede predisponer a infecciones secundarias severas con bacterias comensales que frecuentemente no ocasionan mayor daño, como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.¹⁶ La infec-

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, D.F., C.P. 04510 Email begomez@servidor.unam.mx FAX 55 562323 82, 86

ción bacteriana es un fenómeno que se desarrolla en varias etapas: inicia con la adhesión a la célula hospedera seguida de la colonización de tejidos; en casos de bacterias intracelulares además de adherirse a la célula, la invaden, se multiplican, se diseminan intracelularmente y en algunos casos persisten.²⁸ La interacción de la bacteria con la célula es un proceso en el que intervienen componentes de la superficie celular del hospedero que hacen posible la adhesión y colonización a distintos nichos del cuerpo humano. Para tal efecto las bacterias utilizan estructuras de adhesión caracterizadas como la fimbria, sistemas de secreción tipo III, glicoproteínas adhesivas como vitronectina, fibrinógeno y fibronectina, además de estructuras que mimetizan ligandos celulares.³² Por su parte la célula cuenta con moléculas especializadas en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs): los más destacados son los receptores tipo Toll (TLR) y tipo dominio de oligomerización nuclear (NOD).^{13, 43} La respuesta de la célula a la infección depende evidentemente de su estirpe, así como de los factores solubles del ambiente que la rodea, entre los que se encuentran citocinas, defensinas, así como reactivos intermediarios del oxígeno y el nitrógeno (ROIs, NOIs).¹³ Los datos sugieren que distintos mecanismos favorecen las infecciones bacterianas secundarias; sin embargo, los conocimientos y estudios al respecto son limitados; la infección viral altera directa e indirectamente la actividad microbida de la célula. Las resoluciones de la infección primaria viral y la secundaria bacteriana dependen de una respuesta adecuada contra el patógeno que puede resultar ineficiente durante la coinfección.

Estudios epidemiológicos y de coinfecciones virales y bacterianas

Evidencias epidemiológicas y observaciones clínicas documentan coinfecciones entre virus respiratorios: influenza, parainfluenza, sincitial respiratorio (RSV), rinovirus, adenovirus, coronavirus y sarampión con diferentes bacterias: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*.^{16, 24, 28} La coinfección mejor estudiada es la del virus de influenza y *Streptococcus pneumoniae*; se le asocia a la alta tasa de mortalidad presentada en las epidemias virales y es la única

coinfección en la que se tienen modelos experimentales de sinergismo, la chinchilla y el ratón.²⁸

Las primeras sugerencias de que la infección con virus respiratorios favorece infecciones bacterianas posteriores, se obtuvieron de las pandemias de influenza de 1918 y de 1968-1969; durante estas pandemias aumentó la incidencia de neumonía bacteriana severa, principalmente la originada por *S. pneumoniae*.^{16, 24} La interacción virus respiratorios-bacteria se reporta desde 1920, inicialmente con la finalidad de comparar la población bacteriana en gargantas de pacientes con infección viral respecto a sujetos sanos. Los resultados mostraron la presencia en cantidades más altas de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en pacientes con infecciones virales respecto a sujetos sanos. En aquel estudio se encontró un aumento en las poblaciones bacterianas, además los sujetos con infección mixta presentaron los cuadros de neumonía severa.¹⁶ Entre los datos que implican la participación de infecciones virales en infecciones bacterianas secundarias se incluyen la asociación de casos severos de faringitis y otitis media con infecciones virales previas.^{30, 39, 45} La importancia de la prevención de la infección viral quedó de manifiesto durante la epidemia de influenza de 1998-1999, cuando la vacuna contra influenza protegió al 83% de la población contra otitis media bacteriana.¹⁷ La interpretación de que las infecciones con virus respiratorios favorecen las infecciones bacterianas secundarias severas se apoya en estudios dirigidos a identificar los agentes etiológicos. En estudios recientes con niños hospitalizados por neumonía se encontró que del 3 al 30% de los pacientes mostraron infección mixta e incluyeron los casos más severos, mientras que sólo del 0 al 14% de los niños tenían infección viral o bacteriana. En niños menores de 2 años de edad las infecciones mixtas fueron más frecuentes que en niños mayores. Virus sincitial respiratorio, *S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* fueron los agentes infectivos más frecuentes;^{9, 30, 39} en niños mayores la coinfección se debía además del respiratorio sincitial a otros virus respiratorios y a las bacterias *S. pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* o *Chlamydia pneumoniae*.²⁴ Sin embargo, los reportes que se tienen referentes a coinfecciones son localizados, se refieren a virus y bacterias específicos. Los datos se obtuvieron con distintas metodologías, por lo que no es posible hacer conclusiones globales.

Efecto del virus en la célula hospedera

La predisposición a la infección secundaria por bacterias es ocasionada en gran parte por el daño al epitelio, la disminución de la actividad ciliar, así como por alteraciones en la membrana y en el ambiente celular ocasionadas por la infección viral. Una vez sobrepasada la barrera epitelial, la infección bacteriana se ve favorecida.^{6, 16}

Daño físico

El epitelio respiratorio normalmente retira de manera eficiente las bacterias con las que hace contacto a través del movimiento ciliar y la producción de mucinas;¹⁶ este mecanismo puede alterarse por infección viral, como es el caso del virus de influenza y del RSV. La infección por estos virus en el modelo murino originó necrosis del epitelio bronquial y lesiones en alveolos.²⁰ En cambio la infección con adenovirus en el modelo de chinchilla redujo el ritmo ciliar del tubo de Eustaquio y favoreció la superinfección con *Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHi); es interesante notar que la infección en orden inverso tuvo un menor efecto en la disminución del ritmo ciliar.⁴⁴ La alteración en el ritmo ciliar y en el epitelio no son los únicos cambios que puede originar la infección viral; tejidos que normalmente son restrictivos a la adhesión bacteriana se hacen permisivos, tal es el caso de la infección del virus de la influenza en el modelo de ratón que daña las células de tráquea y permite la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa*.³⁴

Modificaciones de la actividad bactericida por la infección viral

La respuesta inmune contra patógenos incluye la producción de citocinas que dirigen la eliminación del agente infeccioso, así como el proceso de inflamación: defensinas que actúan directamente contra éste, actividad fagocítica, opsonización, activación de las vías del complemento y migración de distintas estirpes celulares al sitio de infección por efecto de las citocinas.^{1, 21, 29} Los mecanismos efectores celulares contra la infección viral o bacteriana dependen tanto de la estirpe celular infectada como de la especie y variedad del virus y/o bacteria en cuestión. La respuesta celular durante coinfecciones puede resultar ineficiente debido al efecto de la infección viral sobre los mecanismos microbicidas, los cuales

presentan respuestas diferenciadas dependientes del patrón molecular reconocido por los PAMPs, así como de los mecanismos de evasión propios del agente infeccioso.^{31, 45} En este contexto una infección bacteriana secundaria puede ser favorecida por la infección viral.

Adhesión bacteriana en infecciones virales

El establecimiento de la infección bacteriana depende de su capacidad de adhesión sobre la célula hospedera; en caso de bacterias intracelulares está en función de su internalización, multiplicación y, en algunas bacterias, de su persistencia.³²

Las bacterias han desarrollado distintos mecanismos que promueven su adhesión a la célula hospedera. Uno de estos mecanismos estudiados ampliamente es el de la estructura filamentosa fimbria, que se encuentra en la superficie bacteriana y está formada por una estructura tipo andamio (*scaffold-like rod*) en la membrana; en la punta del andamio hay una adhesina, que funge como puente de unión de la bacteria a la membrana del hospedero.³²

La capacidad de adhesión bacteriana en coinfecciones depende de la cepa bacteriana, del agente viral, del tiempo de infección, así como de la estirpe celular involucrada.^{3, 35, 36} El ejemplo clásico del efecto del tipo de virus y de la bacteria en su adhesión es el estudio realizado con *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus* en células epiteliales humanas (HeLa), infectadas con diferentes virus: rhino, adenovirus, sarampión o influenza. La adhesión de la bacteria se incrementó cuando la infección se hizo con rhino y adenovirus; con sarampión presentó el efecto contrario, disminuyó, y con influenza el porcentaje de bacterias adheridas se relacionó con el tiempo de infección.⁴⁰

La infección por virus respiratorios altera la unión de bacterias a la célula infectada directamente a través de sus proteínas virales y/o indirecta al inducir cambios en la composición de la superficie celular.^{3, 16, 28} El efecto directo mejor documentado es el descrito por la infección con influenza en células epiteliales donde la proteína viral neuraminidasa favorece la adhesión de bacterias.^{26, 28} Estudios epidemiológicos demuestran que la infección con el virus de influenza y parainfluenza predispone a infecciones secundarias con *S. pneumoniae*; en el

caso de influenza esta interacción contribuye al incremento de la tasa de mortalidad; a este fenómeno se le conoce como *sinergismo letal*. El mecanismo propuesto se fundamenta en la acción enzimática de las neuraminidasas, tanto las que produce la bacteria (NanA y NanB), como la codificada por el virus de influenza (NA), que actúan sobre el ácido siálico de la membrana celular y exponen el residuo de carbohidratos que utiliza la bacteria como receptor; de esa manera se favorece la infección secundaria.^{26, 28}

La infección por virus con envoltura altera los componentes proteicos de la membrana celular.^{3, 4, 6} Estos cambios influyen en la adhesión bacteriana, la disminuyen o la incrementan. La disminución se relaciona con cambios en los componentes celulares utilizados por las bacterias como receptores; el aumento se debe a la inserción en la membrana celular de glicoproteínas virales que algunas bacterias usan como receptores.^{15, 37}

Las evidencias que se tienen respecto al incremento de la adhesión bacteriana por la infección viral son las obtenidas en el sistema RSV y la línea celular epitelial alveolar de origen humano (A549) coinfectadas con NTHi. El incremento reportado es del 39% y se relaciona con la unión de la bacteria a través de la fimbria. No obstante, esta interpretación debe tomarse con cuidado puesto que el mismo efecto se observó en la subpoblación no infectada, lo que sugiere que un mediador extracelular inducido por la infección participa en el incremento observado. En apoyo a la participación de la fimbria, se tiene que la adhesión disminuye al utilizar construcciones de NTHi no fimbriadas.²³

Adhesión de bacterias a proteínas virales expresadas en la superficie celular

Las bacterias pueden adherirse a proteínas virales presentes en la superficie de la célula infectada.^{15, 16} Los datos más convincentes de que las bacterias reconocen como receptores a las proteínas virales en la membrana celular son los reportados en células epiteliales infectadas con RSV. En este sistema se observó la unión de *Neisseria meningitidis* y *S. pneumoniae* a la glicoproteína viral G que se expresa en la membrana celular;^{15, 36} la adhesión bacteriana probablemente se deba a la unión del dominio de mucina de la proteína viral con la fimbria de la membrana de NTHi.

Mecanismos celulares que directa (ROIs y NOIs) o indirectamente (interferón) participan en la eliminación del virus y/o bacteria en la infección y coinfección

Los mecanismos microbicidas mejor estudiados son los que resultan en la producción de ROIs, NOIs e interferón (INF). Los INFs son citocinas producidas en respuesta a la infección viral, que inducen un estado celular de resistencia a la replicación viral. Durante la infección el virus origina productos de replicación que la célula identifica como extrañas por dos vías: la clásica y la de TLRs.^{14, 45} En la vía clásica participan helicasas de RNA (RIG-1 y MDA-5) que actúan como centinelas de detección de RNA de doble cadena; esta vía es dependiente de los factores de transcripción NF- κ B e IRF-3 (factor regulador de interferón), mientras que en la vía de TLR se recurre al IRF-7. Ambas vías resultan en la producción de INF;¹⁴ éste inactiva intermediarios de la multiplicación viral. La interacción del IFN con su ligando (INFr) promueve la activación de endoribonucleasas que degradan al RNA viral.^{8, 9} La producción de INF, a su vez, puede ser contrarrestada por distintos componentes virales. Este fenómeno es llamado *interferencia inversa* y está mediado por productos virales dirigidos a componentes de las vías de inducción del interferón.⁴⁷

Un ejemplo que muestra la interferencia en la respuesta celular en coinfecciones, es el que resulta del tratamiento de macrófagos con INF- γ y lipopolisacárido (LPS); juntos promueven una alta producción de NO, el cual posee un importante efecto microbicida.⁴⁷ La disminución en la producción de NO por el fenómeno de interferencia reversa, podría funcionar como un facilitador de una infección bacteriana secundaria, ya que esta molécula de vida corta tiene alto poder bactericida.

El NO está implicado en múltiples procesos fisiológicos y patofisiológicos del sistema respiratorio, donde desempeña un papel en la proliferación y supervivencia celular, en la modulación de síntesis de citocinas inflamatorias y en la actividad microbicida.⁸ El NO es sintetizado por la acción catalítica de una familia de enzimas, conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS), que transforman al aminoácido L-arginina y al oxígeno en L-citrulina y NO.⁸ La inducción de las NOS depende de la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) de transcripción.¹¹ Existen tres isoformas de NOS, dos de las cuales son constitutivas dependientes de calcio (cNOS), las tipos 1 y 3 (nNOS y eNOS, respectivamente),^{2, 8} y la isoforma inducible (iNOS) o

tipo 2. En el sistema respiratorio se expresa la tipo 2 en células epiteliales, fibroblastos, endoteliales, troncales, neutrófilos y macrófagos, entre otras; en macrófagos alveolares se encuentra como proteína citosólica que responde a estímulos inmunológicos de productos virales y bacterianos como LPS, así como a citocinas y mediadores lipídicos.^{2, 8, 38}

Las vías iNOS y nicotianmida-adenina dinucleotido fosfato (NAPD) oxidasa son los dos sistemas microbicidas más importantes. NADP oxidasa tiene potencial reductor y produce especies reactivas del oxígeno, formadas a partir de la reducción enzimática de éste, dando lugar a superóxido en respuesta a estímulos microbianos, el cual funciona como precursor de radicales de oxígeno.^{7, 15} Las vías de las enzimas iNOS y NADP, componen los dos sistemas antimicrobianos más importantes de fagocitos profesionales. Los ROIs y NOIs, resultado de las vías iNOS y NADP oxidasa, respectivamente, se combinan para formar peroxinitrito y ácido peroxinitroso, que potencian la actividad bactericida.^{6, 12} Un ejemplo de la modulación del NO por virus es el del gen E1A de adenovirus, el cual suprime la producción de NO en una línea celular de epitelio alveolar a través del control transcripcional del gen de iNOS, lo cual le facilita un proceso de persistencia;¹⁸ la disminución en las concentraciones de NO en la célula podrían facilitar la colonización de bacterias oportunistas.

Inmunomodulación causada por virus puede favorecer superinfecciones virales

La infección por el virus del sarampión tiene la capacidad de inhibir al sistema inmune en su respuesta innata y adaptativa. En modelos experimentales de ratón, los ratones infectados con este virus tienen defectos en su producción de INF- γ en las células T CD4 y en la proliferación de macrófagos CD11b, lo cual permite el desarrollo de infecciones persistentes de *Listeria monocytogenes*.⁴² El RSV en un modelo *in vitro* también causa supresión en la proliferación de células T CD4 en respuesta a la enterotoxina B de *Staphylococcus*, aparentemente por el efecto sinérgico de los INFs α y λ producidos por las células dendríticas derivadas de monocitos infectados por el virus.¹⁰ Las proteínas no estructurales del RSV (NS1 y NS2) suprimen la inducción de la activación y traslocación nuclear del IRF-3, bloqueando la

respuesta río arriba por el decremento en los niveles de STAT-1 de los INFs tipo I (α , β) y 3 (λ) en células epiteliales y macrófagos, contrarrestando la actividad antiviral intracelular inducida por estos factores.¹⁴ El resultado aparentemente contradictorio en la regulación de los INFs en las células dendríticas respecto al efecto en macrófagos y células epiteliales por consecuencia del mismo agente infeccioso, supone una modulación diferencial que depende del contexto en el que se desarrolla la infección, que puede favorecer infecciones secundarias bacterianas.

Coinfección del virus de la influenza y *S. pneumoniae* (el caso más estudiado)

Dentro de las asociaciones cooperativas mencionadas, la correspondiente a la coinfección entre el virus de la influenza y *S. pneumoniae* es la mejor estudiada.

La mortalidad durante la pandemia de influenza de 1918 calculada en alrededor de 50 millones de personas, fue en gran medida resultado del sinergismo letal entre el virus de la influenza y *S. pneumoniae*.^{16, 26}

El virus de la influenza causante de la gripe pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. Se compone de un genoma segmentado de RNA de cadena sencilla. Se reconocen tres tipos de virus de la influenza: A, B y C. El tipo A tiene como reservorio a las aves y representa un alto riesgo pandémico estacional; se subclasifica según las diferencias antigénicas de sus glicoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), las cuales determinan la virulencia.¹⁹

Por su parte, *S. pneumoniae* es una bacteria Gram-positiva comensal de la nasofaringe en humanos, causante de enfermedades respiratorias como neumonía y sinusitis, así como meningitis y septicemia.^{22, 27}

Los primeros estudios controlados que abordaron la infección secundaria bacteriana, precedida por infección viral primaria, se desarrollaron en 1945 con un modelo de ratón adaptado a la cepa del virus de la influenza A/Puerto Rico/8/34 (PR8), en el cual *Haemophilus influenza*, *S. aureus* y *S. pneumoniae* causaron neumonía fatal. Se considera que el daño al epitelio causado por el virus aumentó el número de sitios de unión de la bacteria al hospedero, ya que

la carga viral se vio incrementada en las áreas del tracto respiratorio afectadas por la infección; en estudios realizados con cepas de baja patogenicidad no se observó daño en el árbol bronquial.²⁸ Sin embargo, en temporadas donde la virulencia del virus es baja *per se*, se mantiene una mortalidad y morbilidad relativamente alta;²⁵ esto podría explicarse como el resultado del proceso inflamatorio en el cual hay un aumento en la producción de mucinas y fibrina que propician un medio adecuado para el crecimiento de la bacteria.^{27, 33}

Ambos agentes patógenos participan en la exacerbación del proceso inflamatorio durante las coinfecciones. La alta mortalidad presentada por las epidemias de influenza del 1918 y 1957 probablemente se relaciona con la acumulación de neutrófilos y severa inflamación en pulmón, ocasionada por el sinergismo del virus y pneumococcus.^{20, 27} El virus induce la síntesis de citocinas pro-inflamatorias; por su parte, componentes de la bacteria, como la pared celular, la citotoxina neumolisina y la piruvato oxidasa SpxB, responsable de la producción endógena de H_2O_2 , contribuye al daño celular e inflamación.⁵ A la proteína viral proapoptótica PB1-F2²⁸ se le asigna participación importante en la virulencia. Esta interpretación se fundamenta en las diferencias en las secuencias de las cepas H1N1 y H3N2; la más virulenta (H1N1) tiene carencia de la proteína PB1-F2. Es posible que la mutación origina una respuesta inflamatoria ineficiente contra la bacterias.²⁸

Cooperación bidireccional

Los mecanismos hasta ahora mencionados parecen ser de naturaleza unidireccional, es decir, sólo favorecen a la infección bacteriana; sin embargo, proteasas de *S. pneumoniae* pueden llevar a la HA viral de su forma inactiva HA0 a su forma activa HA1 sin utilizar proteasas específicas de tejido a las cuales la HA0 debe acceder.³³ En modelo de ratón se observó aumento en la carga viral posterior a la infección secundaria con *S. pneumoniae*. Lo anterior implica que la coinfección del virus de la influenza y *S. pneumoniae* es una asociación cooperativa (mutualista) de los mecanismos de infección propios de cada patógeno, con resultados fatales.

Consideraciones finales

La propensión al establecimiento de infecciones secundarias bacterianas, por efecto de infecciones respiratorias virales previas, no ha sido estudiada con profundidad, no obstante la inequívoca relación que guardan, tanto por evidencias clínicas como experimentales. La comprensión de los mecanismos involucrados en las coinfecciones es esencial para el manejo y la prevención de infecciones respiratorias, tomando en cuenta la resistencia a antibióticos.⁶ Como se señala en este artículo, son múltiples los factores que predisponen a una infección bacteriana secundaria con respuestas diferenciadas según los agentes virales y bacterianos, así como el tipo y estadio de la célula hospedera. La unión del virus y la bacteria, o sus componentes, a la célula, determinan el tipo de respuesta de ésta; la interferencia de la respuesta microbicida provocada por el virus puede ser directa o indirecta. Proteínas virales en membrana o bien la expresión de proteínas en membrana inducidas por la infección viral, con afinidad a componentes bacterianos, podrían modificar el índice de adhesión y en su caso de ingestión, compartimentalización intracelular, así como la respuesta microbicida.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Celia Alpuche Aranda y al Dr. Luis Manuel Terán Juárez sus valiosos comentarios. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (donativo 42867-M) y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (donativo PAPIIT IN203303) su apoyo.

Bibliografía

1. Abas AK y Lichtman AH. *Inmunología celular y molecular*. Elsevier, Madrid, 2004, pp. 241-345.
2. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004; 75: 639-653.
3. Avadhanula V, Rodríguez CA, Devincenzo JP, Wang Y, Webby RJ, Ulett GC, Adderson EE. *Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner*. *J. Virol* 2006; 80: 1629-1636.
4. Avadhanula V, Rodríguez CA, Klett GC, Bakaletz LO, Adderson EE. *Nontypeable Haemophilus influenzae adheres to intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on respiratory epithelial cells and upregulates ICAM-1 expression*. *J. Virol* 2006; 74: 830-838.
5. Beadling C, Cundell DR, Sandros J, Pearce BJ, Idanpaan-Heikkilä I, Rosenow C, Masure HR. *Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in Streptococcus pneumoniae*. *Spellerberg. Mol. Microbiol* 1996; 19: 803-813.
6. Beadling C, Slifka MK. *How do viral infections predispose patients to bacterial infections?* *Curr Opin Infect Dis* 2004, 17: 185-191.
7. Bernard M y Babior JM. *NADPH oxidase: An Update*. *Blood* 1999; 93: 1464-1476.
8. Bogdan C. *Nitric oxide and the immune response*. *Nat Immunol* 2001; 2: 907-916.
9. Bulut Y, Guven M, Otlu B, Yenisehirli G, Aladag I, Eyibilen A, Dogru S. *Acute otitis media and respiratory viruses*. *Eur. J. Pediatr* 2006 (en prensa).
10. Chi B et al. *Alpha and lambda interferon together mediate suppression of CD4 T cells induced by respiratory syncytial virus*. *Virology* 2006; 80: 5032-5040.
11. Conron M, Andreacos E, Pantelidis P, Smith C, Beynon HL, Dubois RM, Foxwel BM. *Nuclear factor-kappaB activation in alveolar macrophages requires IkappaB kinase-beta, but not nuclear factor-kappaB inducing kinase*. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med* 2002; 165: 996-1000.
12. Fang FC. *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies*. *Nat. Rev. Microbiol* 2004; 10: 820-832.
13. Fritz JH y Girardin SE. *How Toll-like receptors and Nod-like receptors contribute to innate immunity in mammals*. *J. Endotoxin Res* 2005; 11: 390-394.
14. Haller O, Kochs G, Weber F. *The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses*. *Virology* 2006; 344: 119-130.
15. Hament JM, Aerts PC, Fleer A, van Dijk H, Harmsen T, Kimpen JL, Wolfs TF. *Direct binding of respiratory syncytial virus to pneumococci: a phenomenon that enhances both pneumococcal adherence to human epithelial cells and pneumococcal invasiveness in a murine model*. *Pediatr. Res* 2005; 58: 1198-1203.
16. Hament JM, Kimpen JL, Fleer A, Wolfs TF. *Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review*. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol* 1999; 26: 189-195.
17. Heikkinen T, Ruuskanen O, Waris M, Ziegler T, Arola M, Halonen P. *Influenza vaccination in the prevention of acute otitis media in children*. *Am. J. Dis. Child* 1991; 146: 1018-1019.
18. Higashimoto Y et al. *Effect of the adenovirus E1A gene on nitric oxide production in alveolar epithelial cells*. *Clin. Microbiol. Infect* 2005; 11: 644-650.
19. Hilleman MR. *Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control*. *Vaccine* 2002; 20: 3068-3087.
20. Janew WL, Dietlein F, Low G, Burch and W Mogabgab. *Bronchotracheal response in human influenza*. *Arch. Intern. Med* 1960; 108: 376-388.
21. Janeway CA Jr. *How the immune system protects the host from infection*. *Microbes Infect* 2001; 13: 1167-1171.
22. Jansen HM, Lutter R, van der Poll T. *Involvement of the platelet-activating factor receptor in host defense against Streptococcus pneumoniae during postinfluenza pneumonia*. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol* 2005; 290: L194-199.
23. Jiang Z, Nagata N, Molina E, Bakaletz LO, Hawkins H, Patel JA. *Fimbria-mediated enhanced attachment of nontypeable Haemophilus influenzae to respiratory syncytial virus-infected respiratory epithelial cells*. *Infect. Immun* 1999; 67:187-192.
24. Lehtinen P, Jartti T, Virkki R, Vuorinen T, Leinonen M, Peltola V, Ruohola A, Ruuskanen O. *Bacterial coinfections in children with viral wheezing*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.* 2006; 25: 463-469.
25. Loosli CG. *Influenza and the interaction of viruses and bacteria in respiratory infections*. *Medicine (Baltimore)* 1973; 52: 369-384.
26. McCullers JA, Bartmess KC. *Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis* 2003; 187: 1000-1009.
27. McCullers JA, Tuomanen EI. *Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia*. *Front. Biosci* 2001; 6: D877-889.
28. McCullers. JA. *Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus*. *Clin. Microbiol. Rev* 2006; 19: 571-582.
29. Medzhitov R y Janeway CA Jr. *Innate immunity: impact on the adaptive immune response*. *Curr. Opin. Immunol* 1997; 9: 4- 9.
30. Monobe H, Ishibashi T, Nombra Y, Shinogami M, Yano J. *Role of respiratory viruses in children with acute otitis media* *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003; 67: 8016.
31. Netea MG, van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. *Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system*. *J. Leukoc. Biol* 2004; 75: 749-755.
32. Pizarro-Cerda J, Cossart P. *Bacterial adhesion and entry into host cells*. *Cell*. 2006; 124: 715-727.
33. Plotkowski MC, Bajolet-Laudinat O y Puchelle E. *Cellular mechanisms of bacterial adhesion to respiratory mucosa*. *Eur. Respir. J.* 1993 ; 6: 903-916.
34. Ramphal R, Small P, Shands J, Fischschweiger W y Small P. *Adherence of Pseudomonas aeruginosa to tracheal cells injured by influenza infection or endotracheal*

intubation. Infect. Immun 1980; 27: 614-619.

35. Raza MW, Blackwell CC, Elton RA, Weir DM. *Bactericidal activity of a monocytic cell line (THP-1) against common respiratory tract bacterial pathogens is depressed after infection with respiratory syncytial virus*. J. Med. Microbiol 2000; 49: 227-233.

36. Raza MW, El Ahmer OR, Ogilvie MM, Blackwell CC, Saadi AT, Elton RA, Weir DM. *Infection with respiratory syncytial virus enhances expression of native receptors for non-pilate Neisseria meningitidis on HEp-2 cells*. FEMS Immunol. Med. Microbiol 1999; 23: 115-124.

37. Reddy MS, Bernstein JM, Murphy TF, Faden HS. *Binding between outer membrane proteins of nontypeable Haemophilus influenzae and human nasopharyngeal mucin*. Infect. Immun 1996; 64: 1477-1479.

38. Ricciardolo FL, Di Stefano A, Sabatini F, Folkerts G. *Reactive nitrogen species in the respiratory tract*. Eur. J. Pharmacol 2006; 533: 240-252.

39. Sagai S et al. *Relationship between respiratory syncytial virus infection and acute otitis media in children*. Auris. Nasus. Larynx 2004; 31: 341-345.

40. Selinger DS, Reed WP, McLaren LC. *Model for studying bacterial adherence to epithelial cells infected with viruses*. Infect. Immun 1981; 32: 941-944.

41. Sinaniotis CA. *Viral pneumonia in children: incidence and etiology*. Paediatr. Respir. Rev 2004; 5 Suppl A: S197-200.

42. Slifka MK, Homann D, Tishon A, Pagarigan R, Oldstone MB. *Measles virus infection results in suppression of both innate and adaptive immune responses to secondary bacterial infection*. J. Clin. Invest 2003; 111: 805-810.

43. Spann KM, Tran KC, Chi B, Rabin RL, Collins PL. *Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages* [corrected]. J. Virol 2004; 78: 4363-4369. Erratum in: J. Virol 2005; 78: 6705.

44. Suzuki K, Bakaletz LO. *Synergistic effect of adenovirus type 1 and nontypeable Haemophilus influenzae in a chinchilla model of experimental otitis media*. Infect. Immun 1994; 62: 1710-1718.

45. Uematsu S, Akira S. *Toll-like receptors and innate immunity*. Mol. Med 2006; Aug 10 (en prensa).

46. Van der Sluijs KF et al. *Involvement of the platelet-activating factor receptor in host defense against Streptococcus pneumoniae during postinfluenza pneumonia*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol 2006; 290: L194-199.

47. Weber F, Kochs G, Haller O. *Inverse interference: how viruses fight the interferon system*. Viral. Immunol 2004; 17: 498-515.

48. Wright PF, Thompson J and Karzon DT. *Differing virulence of H1N1 and H3N2 influenza strains*. Am. J. Epidemiol 1980; 112: 814-819.