

Artículo Especial

Sección Latinoamericana - Región Cono Sur

Implementación del método rápido de diagnóstico de virus por inmunofluorescencia en niños hospitalizados por infecciones respiratorias agudas[#]

Dres. C.M. PORTILLO* y J. CRUZ**

RESUMEN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) constituyen una causa importante de morbimortalidad en pediatría donde los virus tienen un papel relevante, pudiendo ser diagnosticados por la inmunofluorescencia directa (IFD) con sensibilidad similar al aislamiento en cultivos. El objetivo del estudio fue evaluar la frecuencia de agentes virales asociados a IRA en niños internados por esta causa en diferentes hospitales del país y conocer el aspecto clínico-epidemiológico. Se realizó un estudio de corte transversal donde se analizaron por inmunofluorescencia, aspirados nasofaríngeos, secreciones traqueales, nasales y lavados bronquiales.

Entre enero y octubre de 1997, se estudiaron 111 muestras de niños de 15 días a 10 años, identificándose un agente viral en 59 de ellos. Los agentes hallados fueron virus sincicial respiratorio (VSR) (47%), parainfluenza 1,2,3, (5,4%), adenovirus (3,6%), influenza A (5,4%), influenza B (1,8%). Los patrones clínicos fueron bronquiolitis (49%), neumonías (42%) y croup (8,5%). Los VSR se identificaron con mayor frecuencia con pico en agosto (63%) en lactantes menores. El virus de influenza A se presentó con temporalidad similar y se relacionó con casos severos en niños mayores de 5 años en el Chaco. El parainfluenza se observó en menores de 1 año. El adenovirus fue más esporádico pero uno de ellos se relacionó a un caso fatal. Se observaron asociaciones de agentes virales. Con esta técnica de diagnóstico útil se dispone del primer dato sobre la epidemiología de las afecciones respiratorias agudas de probable etiología viral en la población infantil del país que requirió hospitalización, siendo similar a lo observado en otros países.

Palabras clave: infección respiratoria aguda, inmunofluorescencia, virus respiratorio.

SUMMARY

Acute respiratory tract infections are a very important cause of mortality in Pediatrics, and viruses have a relevant role. They can be detected by the rapid method of immunofluorescence indirect assay with similar sensitivity than cell culture. The objective of this study was to evaluate viral frequency in children who were hospitalized with acute respiratory infections in different hospitals of the country and to determine their clinical and epidemiologic aspects. In this transversal study, from January to December 1997, 111 nasopharyngeal aspirates, swabs and bronchoalveolar lavage samples from children with an age range from 15 days to 10 years old were analyzed. From the sample analyzed, the viral antigens were identified in 59 samples (53%), corresponding to respiratory syncytial virus (47%), adenovirus (3.6%), influenza A virus (5.4%), influenza B virus (1.8%), parainfluenza virus (5.4%). The clinical patterns included bronchiolitis (49%), pneumonia (42%), croup (8.5%). Infections by respiratory syncytial virus were found in a high frequency during the winter with a peak in August (63%) in infants. Influenza A virus showed a similar seasonal frequency, with severe cases in children above 5 years old. The cases caused by adenovirus were sporadic but one was fatal. Parainfluenza virus was present in children less than 1 year old. Mixed associations of virus were observed. This useful diagnostic technique showed preliminary data about the epidemiology of IRA with a viral etiology associated in pediatric population of the country that needed hospitalization and were similar to that observed in other countries.

Key words: acute respiratory tract infection, immunofluorescence, respiratory virus.

Arch. argent. pediatr 2000; 98(2): 99

INTRODUCCION

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) constituyen una causa importante de morbimortalidad en la población infantil, especialmente en los países en vías de desarrollo.¹ En países del primer mundo existen numerosos estudios epidemiológicos referentes a la etiología, observándose un predominio de los agentes virales con respecto a los agentes bacterianos² en los

niños menores de un año. En países en vías de desarrollo, los escasos estudios de esta área sugieren un patrón etiológico similar.^{3,4,5}

En nuestro país, los datos son escasos, aunque la mortalidad por IRA registrada en los últimos años ha sido elevada, según lo reportado por la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social.

Entre los agentes etiológicos posibles, en la actualidad se conoce el papel de las *Chlamydias* en las neumonías intersticiales así como del *S. pneumoniae*, *H. Influenza* tipo b y *S. aureus* en las neumonías no complicadas.^{6,7}

Publicado en: Pediatría. Organó oficial de la Sociedad Paraguaya de Pediatría, 1998.

* Laboratorio Central de Salud Pública.

** Asesoría Regional de Laboratorios OMS. República del Paraguay.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 1977, inició un programa en los países en vías de desarrollo con el objetivo de identificar la etiología de las IRA a fin de racionalizar recursos a través del fortalecimiento de los laboratorios por medio de una red de éstos para la vigilancia de virus respiratorios que permita un abordaje correcto de estas infecciones.⁸

Los recursos para estudios virológicos no siempre se hallan disponibles en la mayoría de los laboratorios, pero con el advenimiento de las técnicas rápidas es posible contar con una herramienta adecuada para fines asistenciales y epidemiológicos.⁹

La inmunofluorescencia indirecta, descrita por Gardner y Mc Quillin en 1980, está siendo ampliamente utilizada gracias a su rapidez, bajo costo, sencillez, buena especificidad y sensibilidad. Ello permite identificar la mayoría de los virus respiratorios que están normalmente asociados a las IRA.^{10,11}

El objetivo de este primer trabajo en el país fue conocer la asociación de agentes virales con IRA en niños hospitalizados por afecciones respiratorias agudas en diferentes hospitales del país.

MATERIAL Y METODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio Central de Salud Pública con muestras de aspirado nasofaríngeo obtenidas durante el período comprendido entre enero y octubre de 1997 a partir de 111 niños menores de 5 años de edad hospitalizados por infecciones respiratorias agudas, de acuerdo a los criterios de clasificación clínicos y radiológicos de la OMS. Las muestras provinieron de servicios de pediatría del Instituto de Medicina Tropical, Hospital de Clínicas, Gran Hospital Nacional, Hospital de Policía, Hospital de Filadelfia, Instituto de Previsión Social (IPS) y centros privados. Los aspirados nasofaríngeos fueron obtenidos en los primeros 5 días de internación y remitidos al laboratorio con una ficha epidemiológica.

Detección de antígenos virales

Las muestras de secreción nasofaríngea se obtuvieron con sondas nasogástricas K 33-30 introducidas a través de las narinas y fueron colocadas en tubos colectores con solución de Hanks como medio de transporte. Para la detección de los antígenos en las células de aspirados se utilizó el método de diagnóstico rápido por inmunofluorescencia indirecta recomendado por el CDC con anticuerpos monoclonales que reconocen a los virus sincicial respiratorio, adenovirus, influenza A,

influenza B y parainfluenza serotipos 1,2,3, de procedencia comercial Chemicon (EE.UU.) cedidos por OMS/CDC. Las muestras fueron analizadas en duplicado junto con los controles positivos y negativos provistos por el equipo. La lectura se realizó con microscopio de epiiluminación Nikkon con lámpara de halógeno. Se consideraron positivas aquellas células que presentaron fluorescencia compatible con la biología del virus identificado.

RESULTADOS

En el período de estudio comprendido entre enero y octubre de 1997 se analizaron 111 muestras respiratorias de pacientes internados por infecciones respiratorias agudas en los diferentes centros asistenciales del país. Las características del grupo estudiado se resumen en la *Tabla 1*, donde se observa el mayor número de muestras analizadas de pacientes menores de un año y en las estaciones de otoño e invierno. Se analizó un mayor número de muestras de pacientes de sexo masculino y procedentes de la región central del país.

En el grupo analizado hemos identificado el agente viral por la inmunofluorescencia indirecta en 53 muestras, que constituyó un 59%, siendo la sensibilidad reportada del 87,5% y la especificidad del 95%.

En cuanto a los agentes identificados, el virus sincicial respiratorio se observó en 52 muestras (49%), los virus de parainfluenza 1,2,3 en 6 (5,4%), el influenza A en 6 (5,4%), influenza B en 2 muestras (1,8%), adenovirus en 4 (3,6%). Se constataron asociaciones virales, siendo la más frecuente VSR y parainfluenza.

Los cuadros clínicos estudiados correspondieron

TABLA 1
Características generales del grupo de estudio

	nº casos	(%)
Edad		
< 1 año	83	75
1-5 años	25	22,5
6-10 años	3	27
Sexo		
Masc./Fem.	69/42	
Procedencia		
Depto. Central	109	98
Depto. Boquerón	2	1,8
Estaciones		
Verano	13	11,7
Otoño	42	38,7
Invierno	42	38,7
Primavera	14	12,6

Fuente: Laboratorio Central de Salud Pública, 1997.

a bronquiolitis, 29 muestras (49%) predominante en lactantes menores debidas al VSR; neumonías, 25 muestras (42%) en menores de un año por influenza A y croup, 5 muestras (8,5%) asociadas al parainfluenza, como se observa en la *Tabla 2*.

La distribución por edad mostró que la mayoría de las muestras con agente viral identificado correspondieron al grupo de menores de un año con 45 muestras (76%).

Las estaciones con mayor número de casos fueron otoño con 32% e invierno con un 63%. Los meses en que predominaron fueron los de frío con pico en julio y agosto. En cuanto a la distribución por sexo, se observó un mayor predominio de varones 41/18. En el grupo etario de 1 a 5 años se observó una marcada disminución en cuanto al número de muestras estudiadas (*Tabla 3*).

La mayoría de las muestras provinieron de la región central con 57 casos (96,6%) y sólo 2 casos de la región occidental.

DISCUSION

Las técnicas rápidas de diagnóstico para el estudio de las IRA fueron propuestas por la OMS a partir de 1981 por considerarlas un método preciso, esencial para el cuidado inmediato del paciente, posibilitando la introducción de medidas profilácticas en salud pública, prevención de la diseminación de los virus en los hospitales y control en el manejo de los antibióticos.¹² Por ello, la inmunofluorescencia con una sensibilidad mayor que los inmunoensayos por el mayor número de células presentes en la muestra, es habitualmente utilizada en la mayoría de los países ofreciendo datos bastante orientadores en los estudios etiológicos y epidemiológicos de las IRA.¹³

Aunque el aislamiento del virus por cultivo sea el estándar de oro para el diagnóstico de las afecciones virales, su costo, la infraestructura y el tiempo requeridos limitan su aplicación en la mayoría de los laboratorios.¹⁴

En el diagnóstico de virus sincicial respiratorio se ha demostrado que la inmunofluorescencia constituye un método con una sensibilidad comparable al cultivo celular, razón por la cual no se requiere de

mayor infraestructura para un diagnóstico correcto. En nuestro estudio pudimos confirmar las bronquiolitis, que constituyeron un 49% de los casos de IRA, identificándose al VSR como agente causal.¹⁵ Este porcentaje es coincidente con el reporte de Nascimento y col., donde se afirma que las salas de emergencias son las mejores fuentes de datos para la vigilancia de VSR; allí el número de casos positivos corresponde al número total de casos internados por IRA.¹⁶

En cuanto a los demás virus, como el influenza y el adenovirus, la sensibilidad de la inmunofluorescencia es menor; sin embargo, en caso de buena toma de muestra en tiempo correcto puede resultar útil. Así, las neumonías, que en nuestra serie fueron 25 (42%) de las IRA, se debieron al influenza A en un 5,4% y al influenza B un 1,8%. Las causadas por adenovirus fueron un 5,4 %, resultando un caso fatal en esta serie sin que se pudiera identificar el serotipo.

Este dato coincide con lo reportado por Hortal y col. pero difiere de lo descrito por A. Mistchenko y col., quienes describen un predominio de casos de internados de infecciones respiratorias debidas al adenovirus.¹⁷

Con respecto a la calidad de la muestra en esta primera experiencia, hemos obtenido mejores resultados con los aspirados nasofaríngeos y secreciones traqueales que con los hisopados y más recuperación en muestras de pocos días de evolución y con buena cantidad de material que las muy diluidas con la solución de transporte.

Otros virus, como los rinovirus y citomegalovirus, con afinidad por el tracto respiratorio no se identifican por la inmunofluorescencia; es por ello que para

TABLA 2
Cuadros clínicos observados de los casos positivos

	nº de muestras = 59	(%)
Bronquiolitis	29	49,0
Neumonías	25	42,0
Croup	5	8,5

Fuente: Laboratorio Central de Salud Pública, 1997.

TABLA 3
Características epidemiológicas de los casos positivos

	nº casos	(%)
Edad		
< 1 año	45	76
1-5 años	10	17
6-10 años	4	6,7
Sexo		
Masc./Fem.	41/18	
Procedencia		
Depto. Central	57	96,6
Depto. Boquerón	2	3,4
Estaciones		
Verano	19	32
Otoño	37	63
Invierno	8	13,5
Primavera	3	5

Fuente: Laboratorio Central de Salud Pública, 1997.

afianzar el diagnóstico virológico de las afecciones respiratorias se debería implementar el aislamiento en cultivos celulares, sobre todo en el caso del virus de influenza y el adenovirus, que tienen afinidad por líneas celulares específicas.¹⁸

El patrón etiológico observado en el corto período estudiado fue similar a otras casuísticas, siendo el VSR el más frecuente en las bronquiolitis, sobre todo en lactantes menores, mostrando un pico en el número de casos en el invierno, a diferencia del número de casos durante el resto del año. Los virus de influenza A en las neumonías en menores de un año (5,4%), también con más casos en invierno, los parainfluenza 1,2,3 en los mayores de 1 año asociados a casos de croup.

Hemos constatado asociaciones de virus sincicial respiratorio con parainfluenza 3 en menores de 6 meses y un caso de VSR con adenovirus.

El patrón estacional de la presente serie, la distribución etaria en los casos en que se identificaron los agentes virales y los cuadros clínicos estudiados fueron bastante similares a lo descripto tanto en países industrializados como en vías de desarrollo.^{19,20}

El mayor número de casos se registró en los meses de más frío –julio y agosto– coincidente con lo observado en todas las casuísticas reportadas a nivel mundial.²¹

Los resultados observados en este primer estudio en nuestro país, sugieren consolidar el espectro diagnóstico debido al número de muestras que en esta serie fue estudiada, con una clínica compatible con cuadro viral donde, sin embargo, no hemos podido identificar el agente causal (47%).

Se debería complementar con el aislamiento viral a fin de constituirse en un apoyo aún más eficaz del manejo de las IRA, tan frecuentes en la población infantil de nuestro país. Esta serie de datos epidemiológicos muestra que nuestra realidad, en cuanto a las infecciones respiratorias agudas, principalmente en la población infantil que requirió internación, en su mayoría de escasos recursos, tiene el mismo comportamiento informado en otras bibliografías y que con este diagnóstico rápido, de relativo bajo costo y buena sensibilidad, es posible adoptar medidas terapéuticas que disminuyan de manera significativa el costo que implica en salud pública.

BIBLIOGRAFIA

- Denny FW, Clide W. Respiratory tract infections and Overview. Workshop on acute respiratory diseases among children of the world. Chapel Hill North 1983: 1026-39.
- Leowski J. Mortality from acute respiratory infections in children under 5 years of age: global estimates. World Health 1986; 39: 138-44.
- Yin BY, Kim MR, Park JY, Choi EH, Lec H, Yun C. Viral aetiology and epidemiology of acute respiratory tract infection in Korean children. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 1054-9.
- Avila M, Salomon H, Carballal G, Elekian B, Woyskorski N, Cerqueiro C, and Weissenbach M. Isolation and identification of viral agents in Argentinian children with acute lower respiratory tract infections. *Rev Of Inf D* 1990; 12 (Suppl 8): 974-81.
- Steinhoff M, John T. Acute respiratory infections of children in India. *Pediatr Rev* 1983; 17: 1032-5.
- Portillo C, Lovera D, Arbo A. *Chlamydia trachomatis* como agente etiológico de las neumonías en el Paraguay. *Pediatría* 1996; 23: 6-11.
- Lovera D, Moreira V, Arbo A. Pneumonia complicated with empyema pleural effusion in children. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 924.
- OPS. Infecciones Respiratorias Agudas en las Américas. Magnitud, tendencia y avances en el control. 1992.
- WHO. Rapid laboratory techniques for the diagnosis of viral infections. Report of WHO Scientific Group Technical report series. 1981: 661.
- WHO. Organization Report on decisions of the 32nd World Health Assembly 1979. WHO. Chronicle 33.203.
- Greenberg S, Krilov L. Laboratory of diagnosis of viral respiratory disease. Cumitech 21. American Society for Microbiology. Washington D.C. 1994.
- Carballal G, Oubiña J. *Virología clínica*. 21^a ed. Buenos Aires. 1996.
- Hortal M, Arbiza JR, Alondra E, Russi J, Modgasy C, Muñoz M. Antígenos virales en células de aspirados nasofaríngeos de niños hospitalizados por infecciones respiratorias agudas. *Act Pediatr* 1986; 57: 34-137.
- Sequeira MM, Nascimento J. Respiratory syncytial occurrence of subgroup A and B strains in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990; 85: 483-4.
- Sutmoller F, Nascimento J, Chaves J, Ferreira V, Pereira M. Viral aetiology of acute respiratory diseases in Rio, first two years of longitudinal study. *Bull WHO* 1983; 84: 52.
- Sequeira MM. Comparación de métodos de detección de virus sincicial respiratorio en secreción nasofaríngea. Tesis doctoral. Instituto Oswaldo Cruz. R.J. 1983.
- Hortal M, Ruoco G, Russi, Cahil J. Studies of children respiratory infections in Uruguay, past and the future opportunities. *Pediatr Res* 1983; 17: 1043-5.
- Weissebacher M, Carballal G, Avila M, Salomon H, Haradisiadi, Catalano, Cerqueiro, Murtagh. Etiology and Clinical evaluation of acute lower respiratory tract infections in young Argentinian children, an overview. *Rev Inf Dis* 1990; 12 (Suppl 8): 974-81.
- Berman C, Duenas A, Bedoya A, Constain V, Leon S, Borrero I, Murphy J. Acute lower respiratory tract illness in Cali, Colombia: a two years ambulatory study. *Pediatrics* 1993; 71: 210-81.
- Berman C, McIntosh K. Selective primary health care, strategies for control of diseases in developing world. XXI. Acute respiratory Infections. *Rev Infect Dis* 1995; 7: 674-91.
- Celadilla ML, Winocur D, Cohen A, Nejamkis MR, Carballal G. Virus sincicial respiratorio en menores de 5 años hospitalizados con IRA baja. *Infect Microbiol Clin* 1992; 4: 231-5.