



CAPÍTULO 5

LOS VIRUS COMO CAUSA DE IRA ALTA Y BAJA EN NIÑOS: CARACTERÍSTICAS GENERALES Y DIAGNÓSTICO

Profesora Mercedes C. Weissenbacher y Dra. María M. Ávila

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) del tracto respiratorio inferior son una de las principales causas de mortalidad de niños en el mundo, particularmente en países en desarrollo, causando aproximadamente un tercio de todas las muertes estimadas en niños menores de 5 años (1).

Entre los numerosos agentes etiológicos descritos, los virus se reconocen como los agentes etiológicos predominantes en las IRA (2), tanto en niños como adultos, ya sea en países en desarrollo o en países industrializados (3).

Si bien se postulaba que en países en vías de desarrollo, la etiología bacteriana era la predominante en las IRA (4), en un estudio multicéntrico internacional coordinado por el *Board on Science and Technology for International Development* de la *National Academy of Sciences* de Estados Unidos, se determinó que la etiología viral está presente en mayor proporción que la bacteriana (5), variando los porcentajes de identificación viral según el país entre 17 y 44% de las IRA en niños menores de 5 años. Los virus aislados más frecuentemente fueron el virus sincitial respiratorio (VSR), entre 11 y 37% del total de los casos estudiados; el adenovirus, entre 1 y 7%; los parainfluenza 1 y 3, entre 1 y 11%; y los influenza A y B, entre 1,4 y 4,3% (6-9).

Se ha demostrado que el mismo cuadro clínico puede ser causado por diferentes agentes y el mismo agente es capaz de causar una amplia gama de síndromes. Los virus más comunes en las IRA altas son los rino y los corona; y en las IRA bajas, los influenza, parainfluenza, VSR y adenovirus (Cuadro 1). Sin embargo, otros virus además de los mencionados pueden causar afecciones respiratorias altas o bajas en niños; entre ellos puede mencionarse el *Herpes simplex*, el Epstein Barr (EBV), el virus del sarampión y el de la parotiditis. La infección viral

puede causar por sí misma una enfermedad leve o grave o puede complicarse favoreciendo una posterior infección bacteriana (10). La neumonía viral es más común que la neumonía bacteriana, pero el riesgo de muerte es considerablemente menor (11).

II. DIAGNÓSTICO DE LAS IRA VIRALES

El diagnóstico etiológico de las infecciones respiratorias virales se realiza tradicionalmente mediante de la detección del agente etiológico durante la enfermedad o por la determinación de un aumento del título de anticuerpos durante la convalecencia. Dicho diagnóstico es complejo debido a la gran variedad de agentes que causan las IRA pero se ha simplificado grandemente con las metodologías existentes para la detección directa del virus en el aspirado nasofaríngeo (12).

El aislamiento en cultivos celulares más la identificación por técnicas inmunoquímicas se considera el método de elección o patrón para el diagnóstico virológico. Sin embargo, es un método costoso y relativamente lento (a veces toma más de una semana). Un acortamiento del tiempo de obtención de resultados del cultivo viral se ha obtenido con la centrifugación a baja velocidad de los cultivos celulares inoculados con la muestra más la identificación posterior por inmunofluorescencia.

La tecnología ha avanzado rápidamente en lo concerniente al diagnóstico de las infecciones respiratorias virales, más aun que para las bacterianas, conduciendo al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico viral suficientemente rápidas, sensibles y específicas. Además, como resultado del desarrollo de quimioterápicos antivirales como la amantadina contra la influenza, el ribavirín contra el VSR y otros bajo experimentación, se hace cada día más necesario un diagnóstico etiológico acertado y rápido para el manejo del paciente.

En los últimos años se han desarrollado métodos de diagnóstico directo que permiten detectar en pocas horas la presencia de virus en muestras clínicas. Estos procedimientos son la inmunofluorescencia (IF), tanto directa como indirecta; el inmunoensayo enzimático (ELISA) de similar sensibilidad; el inmunofluoroensayo de resolución por tiempo (TR-FIA); la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y la hibridación de ácidos nucleicos. Estos métodos pueden dar un diagnóstico entre las cuatro y 24 horas posteriores a la extracción de la muestra.

Los métodos serológicos de detección de anticuerpos antivirales no son los de elección para el diagnóstico de infecciones respiratorias debido a su baja sensibilidad y al hecho de que la respuesta inmune humoral a estos virus que no producen viremia, es por lo general de escasa magnitud. Por otro lado, la necesidad de usar muestras pareadas de suero (o sea muestras del período agudo y del período de convalecencia) hace que el resultado no influya en el manejo terapéutico del paciente. De todas maneras, el diagnóstico serológico es útil en estudios epidemiológicos, en la evaluación de vacunas y en ensayos clínicos de nuevos antivirales, en los cuales es importante detectar tanto infecciones clínicas como subclínicas. En general, la técnica de ELISA para detectar anticuerpos IgG en sueros pareados es el método serológico más sensible para diagnosticar las IRA de origen viral.

a) Muestras clínicas para el diagnóstico

Para la obtención de un diagnóstico virológico acertado, es esencial la selección adecuada de la muestra y su correcta extracción, envío, conservación y procesamiento. Dado que la duración de la excreción del virus suele ser breve, es importante recoger las muestras en los primeros días de la enfermedad. Una muestra tardía puede llevar a un resultado falso negativo. Por otro lado, debido a la relativa frecuencia de las infecciones contraídas en el hospital con estos virus, la muestra en el paciente hospitalizado debe obtenerse en el momento de la admisión, a fin de evitar el dilema de atribuir el virus encontrado a la enfermedad que originó la hospitalización o a una infección nosocomial.

El aspirado nasofaríngeo (ANF) es la muestra de elección para la identificación de los virus causantes de las IRA ya que provee un número apropiado de células infectadas. Los ANF se obtienen introduciendo una sonda estéril en las fosas nasales del paciente, y usando una bomba de vacío o jeringa para realizar la aspiración de la secreción nasofaríngea que se coloca en un tubo cónico estéril. La muestra, encerrada herméticamente y en baño de hielo, se envía al laboratorio de virología para su procesamiento. No debe congelarse.

Otras muestras que pueden utilizarse son los lavados broncoalveolares, nasales o faríngeos. Los hisopados generalmente contienen menor número de células, lo cual los hace poco apropiados para el diagnóstico. Sin embargo, se pueden utilizar juntos el hisopado de fauces y nasal y de esta manera aumentar su rendimiento.

b) Procesamiento de las muestras

El objetivo de un buen procesamiento de las muestras es optimizar el aislamiento o la identificación de cualquier virus presente en la misma (FIGURA 1). En primer lugar se procede a una disgregación cuidadosa del moco. Para la detección de antígenos virales por el método ELISA o de ácidos nucleicos virales por reacción de la polimerasa en cadena (PCR) o hibridación molecular, es conveniente la utilización del ANF sin centrifugar. Para detección del virus por inmunofluorescencia indirecta (IF) o por aislamiento en cultivos celulares, se centrifuga la muestra a 4° C durante 10 a 15 minutos a 3.000 g (3.000 veces la gravedad). El sobrenadante se utiliza para el aislamiento viral en cultivo de células. Por otro lado, las células en el sedimento se lavan y se depositan sobre portaobjetos que se fijan en acetona fría por 10 minutos y se procesan para IF.

A continuación, se describen brevemente, por separado, los métodos mencionados para la identificación de los virus que causan las IRA altas y bajas en los niños.

b.1) Aislamiento en cultivos celulares

El uso de este método se recomienda cuando está disponible en el laboratorio, ya que es el método de elección cuando los posibles agentes etiológicos son diversos virus. Las muestras deben mantenerse entre 4° y 6° C, sin congelar. El material residual debe guardarse fraccionado a -70° C o menos en el caso que se deba recurrir nuevamente a la muestra original.

Como se observa en la figura 1, la técnica consiste en inocular una alícuota¹ de 0,2 ml del sobrenadante del ANF en los distintos cultivos celulares en monocapa, a los que previamente se les extrajo el medio de crecimiento. Después de la inoculación, se agrega el medio de mantenimiento (sin suero fetal bovino y con el agregado de tripsina en las células sensibles al crecimiento de virus influenza y parainfluenza) y se incuban entre 34° y 35° C. Los cultivos deben observarse diariamente durante 11 días para detectar la aparición de acción citopática (ACP) sobre la monocapa. Entre los cuatro a siete días después de la infección, para la detección de virus influenza y parainfluenza, se realiza sobre los cultivos específicos (MDCK, LLC-MK2 y otros), una hemadsorción (Had) con glóbulos rojos de cobayo. Aquellos cultivos en los cuales se observa ACP y/o Had, se procesan para la identificación del virus por medio de IE. Los cultivos celulares primarios o líneas establecidas que permiten el aislamiento de los distintos virus respiratorios son numerosos y se mencionarán más adelante en la descripción de cada virus.

Se ha obtenido un aumento en la infectividad viral y un acortamiento del tiempo de obtención de los resultados con la centrifugación a baja velocidad de los cultivos celulares inoculados con la muestra del paciente, lo cual aumenta la sensibilidad del cultivo. Después de una incubación corta a fin de permitir la replicación, se realiza la tinción por IF para la identificación del agente viral presente. La combinación de ambas técnicas ha demostrado tener una especificidad y sensibilidad equivalentes al aislamiento tradicional en cultivos celulares en tubos, con una reducción en el tiempo de 10 a dos o tres días (13-17).

b.2) Inmunofluorescencia (IF)

La IE, tanto directa como indirecta, es una técnica simple que permite la identificación rápida de numerosos virus. En la prueba directa, el suero antiviral específico se marca con fluoresceína. En la prueba indirecta, se hace reaccionar un suero específico contra el antígeno del virus a detectar (producido en animales) y luego se agrega un anticuerpo dirigido contra la inmunoglobulina de la especie animal empleada en el paso anterior, marcado con fluoresceína.

La OMS coordinó estudios multicéntricos para el desarrollo y la utilización de anticuerpos monoclonales en el diagnóstico de IRA virales por IE. Se realizaron ensayos con estuches de diagnóstico de IF en 16 laboratorios diferentes que demostraron su eficacia (18).

Actualmente, se puede obtener comercialmente los antisueros específicos, policlonales o monoclonales, para la identificación de la mayoría de los virus respiratorios (19). Se ha demostrado que las mezclas de anticuerpos monoclonales tienen alta sensi-

1 Una parte o proporción de algo

bilidad y especificidad para identificar antígenos virales en muestras clínicas, comparable a cualquier método de referencia. Se puede esperar una pérdida mínima de sensibilidad cuando se les compara con anticuerpos policlonales de alta calidad, pero los monoclonales permiten una lectura más sencilla y de calidad muy superior (18).

b.3) Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Los métodos inmunoenzimáticos para la identificación de virus respiratorios se han desarrollado en los últimos años con resultados variados y se utilizan para la detección de antígenos en muestras clínicas. Se emplea el principio del *sandwich*, agregándose las muestras a tubos o placas de plástico especial en los que se ha pegado el anticuerpo de “captura”, dirigido contra el antígeno buscado. Se agrega luego otro anticuerpo específico contra el antígeno, pero marcado con una enzima (las más usadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina). La actividad enzimática se detecta al agregar el sustrato, por un cambio de coloración que puede leerse visualmente o con un lector de ELISA. Los anticuerpos monoclonales han mejorado la sensibilidad y especificidad de estos métodos y han contribuido a extender el empleo del ELISA como método de diagnóstico (20-23). Este método se puede utilizar también para la detección de anticuerpos en el suero.

b.4) Hibridación con sondas

Un enfoque diagnóstico más reciente se ha dirigido hacia la detección de genomas virales por hibridación con sondas de ácidos nucleicos específicos para la detección de virus. La sonda marcada se aplica a la muestra clínica y si existe una cadena complementaria de ácido nucleico viral ocurre la hibridación que se detecta según el sistema de marcación empleado (sondas radiactivas o biotiniladas). Estas sondas pueden prepararse por métodos diferentes que dependen fundamentalmente del virus a investigar. En los últimos tiempos se ha tendido a utilizar clones de ácidos nucleicos recombinantes u oligonucleótidos sintéticos que representen secuencias específicas del genoma viral de interés (3, 24, 25).

b.5) Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

Este método permite detectar cantidades muy pequeñas de virus, mediante de la amplificación de secuencias del ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico viral presente en la muestra. El proceso requiere el uso de oligonucleótidos complementarios de secuencias genómicas conservadas del virus denominadas *primers* y de una enzima ADN polimerasa termoestable. Como resultado de la reacción, se obtiene millones de copias a partir de una secuencia única del ADN viral que luego pueden detectarse a simple vista (por medio de la tinción con bromuro de etidio) o por medio de hibridación (radiactiva o enzimática). La utilización de la misma es aún experimental, especialmente para el virus de la influenza, el VSR y el enterovirus (3).

b.6) Inmunofluorescencia de resolución por tiempo (TR-FIA)

Este método que se ha desarrollado recientemente para la detección de virus respiratorios, es hasta el momento el ensayo en fase sólida más sensible. Ha permitido aumentar la sensibilidad de la fluorescencia al eliminar la fluorescencia inespecífica de fondo y lograr una fluorescencia de mayor intensidad y tiempo de decaimiento con el uso de quelato de europio. Su simplicidad y rapidez derivan del hecho de que la muestra se incuba simultáneamente durante solo una hora, con el anticuerpo de captura y el anticuerpo específico marcado con quelato de europio. El alto costo del equipo requerido ha limitado su uso a los laboratorios de referencia (3).

III. VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO (VSR)

Virus de la familia Paramixoviridae, del género *pneumovirus*. El virión es pleomórfico, tiene envoltura y su diámetro varía entre 150 a 300 nm (26). El ácido nucleico del VSR es una cadena simple de ARN de polaridad negativa. No posee actividad de hemaglutinación, ni de hemadsorción, hemolítica o neuraminidasa. Es muy sensible a los cambios de temperatura, lo cual debe tomarse en cuenta cuando se le quiere aislar en cultivos celulares.

Hasta el momento, hay descrito un serotipo de VSR y por lo menos dos variantes antigénicas o subgrupos (A o 1 y B o 2). La diferencia mayor entre los subgrupos reside en la glicoproteína G. Ambos circulan simultáneamente en la población y no es clara la importancia clínica o epidemiológica de estas variantes antigénicas (27-29). Probablemente la diversidad antigénica de los dos subgrupos de VSR tenga alguna influencia en la susceptibilidad de los niños a la infección secuencial con los mismos. En algunos países se demostraron recientemente patrones epidémicos que alternan los subgrupos A y B en ciclos de dos años (3).

El periodo de incubación de la enfermedad respiratoria es de cuatro a cinco días. El virus se replica en la nasofaringe y puede permanecer hasta tres semanas en el niño infectado. El mecanismo por el cual el virus se extiende desde las vías altas al tracto respiratorio podría ser a través del epitelio respiratorio o por la aspiración de las secreciones infectadas. Hasta ahora, no se ha detectado viremia (26). Parece ser necesario un sistema inmunológico intacto para terminar con la infección, a pesar de que la infección en niños puede ocurrir incluso en presencia de anticuerpos maternos. Son comunes las reinfecciones en todas las edades, ocurriendo algunas veces, a pocas semanas una de la otra (30).

Se ha encontrado evidencia de infección por VSR en todas las áreas geográficas estudiadas. Ocurren epidemias anuales comúnmente durante los meses fríos. Durante las epidemias hay un aumento del número de casos de bronquiolitis y neumonías y un aumento de internación de niños pequeños por infección de vías respiratorias bajas. Antes de comenzar la etapa escolar (entre los 4 y 5 años), la mayoría de los niños ya se ha infectado con VSR. La edad, el sexo y las condiciones socioeconómicas influyen en la gravedad de la enfermedad, pero no en la tasa de ataque.

La bronquiolitis es la entidad más común causada por este virus, siendo más frecuentes entre las 6 semanas y los 6 meses de edad. Esta enfermedad es poco frecuente durante las primeras 6 semanas de vida (31). La infección primaria con VSR puede manifestarse como una infección respiratoria baja, como neumonía, bronquiolitis, traqueobronquitis o infección respiratoria, alta a menudo acompañada por fiebre u otitis media. La infección es rara vez asintomática. La neumonía y bronquiolitis pueden resultar difíciles de diferenciar y muchos lactantes parecen tener ambos síndromes (32). El VSR causa epidemias que afectan a una proporción muy alta de niños, algunos de los cuales deben ser hospitalizados. Estos niños excretan altos títulos de virus durante varios días, lo cual provoca frecuentes infecciones nosocomiales, especialmente en salas de lactantes. Estas pueden manifestarse desde la forma de enfermedad febril leve de vías aéreas altas, hasta un cuadro con grave compromiso respiratorio bajo y muerte subsecuente (32). En adultos infectados con VSR, la enfermedad puede manifestarse en vías aéreas altas o bajas y en ancianos puede causar bronconeumonías.

El VSR crece en una gran variedad de células de origen humano y animal. Las líneas en las cuales puede aislarse el VSR son Hep-2, Hela, Vero, LLC-MK2, MRC-5, BSC-1 y CV-1 y también en cultivos primarios de riñón bovino o de riñón de embrión humano. El virus induce la formación de sincicios característicos en células Hep-2 (23, 26).

La inmunofluorescencia directa e indirecta con anticuerpos poli o monoclonales ha demostrado ser de gran utilidad para la detección de antígenos del virus en las células de descamación nasofaríngea (17, 18, 33).

El método de ELISA, ha permitido identificar muestras positivas demostrando una eficiencia semejante a la de la inmunofluorescencia. Esta prueba puede detectar entre 20 y 30 ng de proteína viral (20). Actualmente existen estuches comerciales que, al ser evaluados, han dado distintos valores de sensibilidad y especificidad (21, 23). Se realizan ensayos utilizando la reacción de la polimerasa en cadena y sondas de ácidos nucleicos para detectar VSR en muestras clínicas, así como la detección de la nucleoproteína viral mediante la aplicación de anticuerpos monoclonales con la técnica TR-FIA (3).

IV. ADENOVIRUS

La familia *Adenoviridae* comprende un gran número de especies de origen humano y animal que están ampliamente distribuidas en la naturaleza. La clasificación actual ha agrupado a los numerosos miembros de la familia en dos géneros: mastadenovirus y aviadenovirus. El género mastadenovirus incluye a los adenovirus humanos y a muchos otros aislados de diversos animales. Todos ellos se caracterizan por ser específicos de su especie huésped y por presentar una gran variabilidad genética. Por lo general infectan a sus huéspedes a través de la conjuntiva ocular o de la mucosa digestiva. Hasta el presente se han reconocido 47 especies o serotipos diferentes de adenovirus humanos (34).

Desde su descubrimiento por Rowe en 1953 (35), se ha utilizado distintos criterios para la

clasificación de estos agentes, quedando agrupados finalmente en seis subgéneros (del A al F). Todos los adenovirus presentan la misma estructura general: partículas virales de simetría icosaédrica, sin envoltura y con un diámetro promedio de 80 nm. El genoma viral es ADN bicatenario. La replicación del ADN y la transcripción y maduración de los adenovirus se realiza en el núcleo celular, dentro del cual ocurre una acumulación de proteínas estructurales “en cuerpos de inclusión”, característicos en células alveolares durante las neumonías por adenovirus (36, 37).

Los adenovirus se encuentran distribuidos en todo el mundo. Los distintos serotipos causan enfermedad en diferentes grupos de edad y la gravedad varía según el área geográfica. Las infecciones son por lo general autolimitantes y las características clínicas de la enfermedad dependen tanto del huésped como del serotipo involucrado. Aproximadamente 65% de los aislamientos de adenovirus provienen de niños menores de 4 años (36, 38).

Los adenovirus son responsables de 5% de los casos de infección respiratoria en niños menores de 4 años de edad y de 10% de las infecciones respiratorias que requieren hospitalización en el mismo grupo de edad (37). Pueden causar faringitis, conjuntivitis, laringotraqueobronquitis y bronquiolitis, pero las neumonías agudas son, sin lugar a dudas, las manifestaciones clínicas más graves, sobre todo en los niños pequeños en los que pueden ser fatales (36). Los tipos más frecuentemente asociados a estos cuadros son Ad3, Ad4, Ad7 y Ad21, así como Ad2 y Ad5 (37). Se ha descrito las secuelas de daño pulmonar residual importante como bronquiectasias y bronquiolitis obliterante (39).

La infección por ciertos serotipos puede causar también un síndrome clínico “tipo pertussis” que no se puede diferenciar del de etiología bacteriana, salvo mediante la detección del agente viral o bacteriano (40).

Estos serotipos representan un problema cada vez más frecuente en los huéspedes con el sistema inmune comprometido. Últimamente se ha descrito cinco serotipos nuevos, del 42 al 47, asociados a casos de SIDA (34).

Los adenovirus son virus estables que pueden recuperarse de muestras clínicas con relativa facilidad. El aspirado nasofaríngeo, los hisopados nasales y el material de biopsia o necropsia, son muestras adecuadas para su aislamiento. La recuperación del virus puede considerarse un signo de infección reciente y frecuentemente está asociada a enfermedad sintomática.

Los cultivos primarios, las líneas diploides y las líneas continuas de células humanas (células A-549, Hep-2, HeLa, Kb), pueden emplearse para diagnosticar la infección con adenovirus, los cuales producen un efecto citopático característico con redondeamiento y agrupamiento celular en racimos y formación de cuerpos de inclusión intranucleares (37). La identificación del aislamiento puede realizarse por inmunofluorescencia.

La detección de genomas virales por hibridación con sondas de ácidos nucleicos específicos es una técnica que se usa actualmente para el diagnóstico de adenovirus (24, 25).

Un aumento de cuatro veces o más del título de anticuerpos entre una muestra de período agudo y otra de convalecencia por fijación de complemento o ELISA, es una señal significativa de la presencia de infección por adenovirus. Actualmente se considera que el ELISA es superior para la detección de la respuesta inmune en niños (37).

V. VIRUS PARAINFLUENZA

Los virus parainfluenza se clasifican dentro del género *paramyxovirus*, familia *Paramyxoviridae*. Son virus que contienen ARN en una nucleocápside con envoltura que deriva de la membrana de la célula huésped. Son pleomorfos, de 100 a 200 nm, con espículas que tienen funciones de hemaglutinina y neuraminidasa (proteína HN), actividades que no se pueden separar. Poseen también otras espículas responsables de la acción hemolítica y de fusión (proteína F), lo cual los hace capaces de fusionar células y hemolizar ciertos tipos de eritrocitos (41), lo cual los diferencia de los virus influenza.

Se ha identificado los tipos 1, 2, 3 y 4. Estos virus se reconocen por la acción citopática en las células infectadas o por las reacciones de hemadsorción con glóbulos rojos de cobayo en monocapas de células infectadas.

Estos virus causan infecciones respiratorias frecuentes y de gravedad variable, que dependen del tipo de virus y sobre todo de la edad del huésped, en relación directa con la producción de primoinfecciones o reinfecciones. Los tipos 1, 2 y 3 se reconocen como los principales agentes causales del crup, aunque también pueden causar neumonías y bronquiolitis (42).

Los virus parainfluenza, especialmente los tipos 1 y 2 son responsables de más de 50% de los casos de crup o laringitis obstructiva. Las bronquiolitis asociadas al tipo 3, pueden presentarse a partir del primer mes de vida, ocurren durante todo el año y aparecen en brotes epidémicos. Los virus parainfluenza tienen una distribución geográfica mundial. En general, la enfermedad que causan es leve. Los cuatro tipos son capaces de causar infecciones respiratorias habiéndose demostrado reinfecciones en adultos y niños, particularmente causadas por el serotipo 3. Estos agentes generalmente infectan a individuos de corta edad. Los tipos 1 y 2 causan epidemias en otoño. El tipo 3 causa enfermedad todo el año. En un estudio serológico se indica que 60% de los niños se infecta por parainfluenza 3 en el transcurso de los 2 primeros años de vida y aproximadamente 80% se infecta antes de los 4 años, la mayoría en forma asintomática (43). La alta tasa de infección sugiere una diseminación rápida. Puede causar enfermedad grave en lactantes como lo hace el VSR, pero esa gravedad disminuye a partir de los 3 años (44). Es poco frecuente una enfermedad tan grave que requiera internación hospitalaria (42).

Por lo general la excreción de virus es de corta duración, por lo cual estos virus deben aislarse de aspirados traqueales o nasofaríngeos tomados tempranamente. La muestra clínica se inocula en diferentes líneas celulares, especialmente líneas primarias de riñón de mono (aunque también pueden usarse líneas establecidas LLC-MK2 o MDCK), manteniendo las células en medio libre de suero. Algunas veces pueden presentar efecto citopático y en otras es necesario reconocer la presencia viral en los cultivos con pruebas de hemadsorción (Had), con eritrocitos de cobayo a 4° C (45). La identificación del virus puede realizarse por IF, inhibición de la hemadsorción o neutralización con antisueros específicos.

La técnica de IF se aplica con éxito para la detección directa del antígeno viral en células nasofaríngeas (33, 46). La reacción cruzada entre los distintos tipos de este virus y el de las

paperas es frecuente y complica el diagnóstico serológico, tanto por inhibición de la hemaglutinación como por fijación del complemento.

VI. VIRUS INFLUENZA

Los virus influenza pertenecen a la familia Orthomyxoviridae y al género *influenzavirus*. Determinantes antigénicos específicos permiten diferenciar tres tipos: A, B y C, los cuales pueden causar enfermedad respiratoria aguda.

El virión es filamentososo o esférico, de 80 a 120 nm, con una envoltura de doble capa lipídica derivada de la célula huésped modificada por la presencia de proyecciones a modo de espículas que son las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA).

La nucleocápside es de simetría helicoidal constituida por ocho fragmentos de ARN monocatenario asociados a la nucleoproteína y a tres polimerasas. La estructura segmentada del ácido nucleico explica la labilidad genética y la facilidad con que ocurren las reagrupaciones genómicas en estos virus. Los virus influenza A y B están distribuidos ampliamente y son estacionales en climas templados. El virus tipo A fue aislado en 1933 y el tipo B en 1940, aunque hay evidencias de epidemias causadas por este agente hace 200 años (47).

La infección se presenta en forma de epidemias explosivas y con una diseminación rápida del virus en una región geográfica. La causa fundamental de la ocurrencia de las epidemias de influenza es la continua aparición de nuevas cepas antigénicamente diferentes, derivadas de cepas anteriores, las cuales desconocen la inmunidad de los individuos y causan enfermedad en personas de todas las edades. Estas variaciones antigénicas son más frecuentes en el influenza A. Durante algunos años estas epidemias son causadas predominantemente por un tipo de virus, pero es frecuente que circule más de un tipo, ya sea en forma simultánea o en secuencia.

El virus de influenza presenta dos patrones de diseminación diferenciables. Uno representado por un cambio antigénico mayor (*antigenic shift*) ocurre cuando aparece un subtipo antigénico nuevo o que no ha circulado en muchos años, induce pandemias por influenza A a intervalos irregulares e impredecibles. Se calcula que en 1918 murieron aproximadamente 20 millones de personas en todo el mundo, a causa de la infección por un virus tipo A que se cree fue el subtipo H1N1. Las pandemias mejor documentadas ocurrieron en 1918, 1957, 1968 y 1977.

El otro patrón de diseminación se debe a una tendencia o variación antigénica menor (*antigenic drift*), con cambios relativamente menores y frecuentes (cada año o cada pocos años) en un subtipo de influenza. La evolución de los virus de influenza no es simple y predecible como se creía en un principio; actualmente se considera que una "nueva" cepa no es, necesariamente, es la que causa una pandemia; se ha comprobado por ejemplo, que la cepa A/H1N1 que apareció en 1977, era genéticamente idéntica a una circulante en 1950 (3).

Los virus influenza A y B pueden causar enfermedad respiratoria alta y baja tales como traqueobronquitis o neumonías. Muchas veces la infección es subclínica o se presenta con sín-

tomas leves. El virus que se disemina de persona a persona, tiene un período de incubación de uno a cuatro días. La infección por influenza C esta asociada a infecciones subclínicas o resfrios comunes moderados; no causan epidemias y la mortalidad es infrecuente (47).

El diagnóstico del virus influenza puede realizarse por inoculación de secreciones nasofaríngeas en cultivos primarios de células de riñón de diversas especies o de pulmón de embriones de pollo, o bien en huevos embrionados. Se ha demostrado que el empleo de enzimas proteolíticas, habitualmente de tripsina, puede incrementar la replicación en líneas continuas de células como la MDCK (48). A 48 horas de inoculadas las células, se puede detectar la presencia del virus por hemadsorción con eritrocitos de cobayo (45). Si ésta es negativa, el procedimiento debe repetirse dos veces por semana. Si el resultado es positivo o se observa acción citopática, la identificación debe realizarse por IF con anticuerpos específicos. También se puede proceder a realizar hemaglutinación en el sobrenadante.

La detección del antígeno en células epiteliales por IF se ha usado desde hace muchos años y actualmente es un método empleado comúnmente (33, 49). La técnica de TR-FIA también se ha utilizado con éxito desde hace unos años (50).

La técnica de PCR se ha utilizado para la identificación del virus de influenza en muestras clínicas (51), así como para la diferenciación de los distintos tipos del virus (52).

El diagnóstico serológico por fijación de complemento o por inhibición de la hemaglutinación es útil cuando se tienen sueros pareados, ya que la infección aguda está acompañada de un aumento importante del título de anticuerpos séricos.

VII. RINOVIRUS

Los rinovirus pertenecen a la familia *Picornaviridae*. Se caracterizan por su susceptibilidad a los ácidos. Se conoce hasta el momento 100 inmunotipos (53). Tienen de 20 a 27 nm y contienen cuatro proteínas estructurales que forman una cápside no envuelta de simetría icosaédrica. La síntesis y maduración del virus ocurren en el citoplasma.

Constituyen la causa conocida principal del resfrió común. Infectan sólo a seres humanos y primates superiores y crecen en cultivos celulares derivados de estas especies. La temperatura óptima de replicación es de 33 a 35° C, la temperatura que se encuentra en la nariz y en las vías respiratorias superiores.

Los rinovirus tienen distribución mundial y tienden a ser epidémicos en otoño y primavera. Los diferentes tipos antigénicos circulan al azar. Los serotipos actuales son reemplazados lentamente por diferentes tipos antigénicos.

Las infecciones comienzan en la infancia temprana y continúan durante toda la vida. Las tasas de infección varían entre una y dos infecciones por persona por año en niños menores de 1 año, a 0,7 infecciones en adultos. La diseminación ocurre por medio de secreciones, de mano a mano, o por intermedio de aerosoles (54). La duración media de la enfermedad que habitualmente es leve, es de siete días.

Es poco frecuente que se solicite un diagnóstico de rinovirus, pero cuando es necesario, el diagnóstico se hace fundamentalmente por aislamiento en células de pulmón embrionario humano (WI-38, MRC5) y en células HeLa. El efecto citopático es característico y aparece entre los dos y los seis días. La identificación estricta se realiza por demostración de la labilidad a los ácidos (a un pH de 2,9) y por neutralización con anticuerpos específicos (se realiza en muy pocos laboratorios y raramente se hace necesaria). La detección del genoma viral con técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y PCR se comenzó a utilizar en estos virus, en los cuales la detección de antígenos no es posible debido a la multiplicidad de serotipos (55, 3).

VIII. CORONAVIRUS

Los coronavirus pertenecen a la familia *Coronaviridae*, género *coronavirus*. Son partículas pleomórficas de 80 a 150 nm, con proyecciones superficiales en forma de pétalo que le dan el aspecto de una corona. Son virus ARN y todos se desarrollan en forma exclusiva en el citoplasma de las células infectadas.

Los coronavirus causan resfríos en niños y adultos. Se ha observado que las distintas cepas causan enfermedad con características semejantes. El período de incubación es más prolongado y su duración más breve que en el caso de los rinovirus, pero los síntomas son similares. Con poca frecuencia causan una enfermedad respiratoria baja más seria.

Estos virus se encuentran distribuidos mundialmente, y son más frecuentes en invierno y primavera. Pueden llegar a constituir 35% del total de las infecciones respiratorias virales de las vías aéreas superiores en épocas de alza. La reinfección es común. La infección puede ocurrir edad, si bien es más frecuente en los niños.

Actualmente se puede aplicar métodos de detección de antígenos del virus por inmunofluorescencia o ELISA (56). La recuperación del virus de muestras clínicas es difícil. El cultivo se realiza especialmente en tejidos animales. Hay algunas cepas que se han adaptado a crecer en cultivos de células fibroblásticas diploides humanas (56).

La forma de diagnóstico más utilizada hasta el momento, ha sido el aumento en cuatro veces o más del título de anticuerpos en muestras pareadas, especialmente por fijación de complemento (57).

IX. VIRUS ECHO Y COXSACKIE

Ambos virus pertenecen al género *enterovirus*, familia *Picornaviridae*. Comparten muchas de las características morfológicas, estructurales y fisicoquímicas de los rinovirus. Poseen una cápside icosaédrica desnuda de 20 a 30 nm, con un genoma ARN no segmentado. Tienen distinta cantidad de serotipos: 34 los ECHO; los Coxsackie A, 24 y los Coxsackie B, seis serotipos.

Todos ellos pueden causar enfermedad febril con síntomas respiratorios, y más de 90% de las infecciones causadas por este grupo es asintomático. Una vez infectado el huésped, permanecen presentes en el tracto respiratorio por una a dos semanas.

Ambos géneros, con su gran variedad de serotipos, presentan problemas para el diagnóstico de laboratorio. El hecho de que crezcan muy lentamente en cultivos celulares, hace que su identificación sea compleja.

En términos generales, no existen por el momento métodos rápidos accesibles para detectar los antígenos de todos estos virus y la serología es en general difícil y costosa (58), por lo cual, el diagnóstico de estos agentes en las infecciones respiratorias agudas no se hace de rutina.

X. REFERENCIAS

1. Gwatkin DR. *How many die? A set of demographic estimates of the annual number of infant and child deaths in the world.* Am J Public Health 1989; 70:1286-89.
2. Organización Panamericana de la Salud OPS/OMS. *Infecciones respiratorias agudas en los niños.* Publicación Científica No. 493, 1985.
3. McIntosh K, Halonen P, Ruuskanen O. *Report of a workshop on respiratory viral infections: epidemiology, diagnosis, treatment and prevention.* Clin Infect Dis 1993; 16: 151-64.
4. Pio A, Leowski G, Luelmo F. *Programa de la OMS de infecciones respiratorias agudas en la infancia.* Bol Sanit Panam 1984; 96:283-95.
5. Selwyn B. *The epidemiology of acute respiratory tract infection in young children: Comparison of findings from several developing countries.* Rev Infect Dis 1990; 12:870-88.
6. Avila M, Salomón H, Carballal G et al. *Isolation and identification of viral agents in Argentinian children with acute lower respiratory tract infection.* Rev Infect Dis 1990; 12(supl 8):974-81.
7. Hug F, Rahman M, Nahar N et al. *Acute respiratory tract infection due to virus among hospitalized children in Dhaka, Bangladesh.* Rev Infect Dis 1990; 12(supl 8):982-87.
8. Puthavathana P, Wasi C, Kositanont U et al. *A hospital-based study of acute viral infections of the respiratory tract in Thai children, with emphasis on laboratory diagnosis.* Rev Infect Dis 1990; 12(supl 8):988-94.
9. Hortal M, Russi JC, Arbiza JR, Canepa E, Chiparelli H, Illarramandi A. *Identification of viruses in a study of acute respiratory tract infection in children from Uruguay.* Rev Infect Dis 1990; 12(supl 8):995-97.
10. Downham, Mars Gardner PS, Mc Quillin J et al. *Role of respiratory viruses in childhood mortality.* Br Med J 1975; 1:235-39.
11. Berman S. *Acute respiratory infections.* Infect Dis Clin North Am 1991; 5.
12. Weissenbacher M, Carballal G, Avila M et al. *Etiologic and clinical evaluation of acute lower respiratory tract infections in young Argentinian children: An overview.* Rev Infect Dis 1990. 12(supl 8):889-98.
13. Hudson JB, Misra V, Mosmann TR. *Cytomegalovirus infectivity: analysis of the phenomenon of centrifugal enhancement of infectivity.* Virology 1976; 72:235-43.

14. West PGB, Aldrich R, Hartwig R, and Haller GJ. *Increased detection rate for varicella-zoster virus with combination of two techniques.* J Clin Microbiol 1988; 26:2680-81
15. Matthey S, Nicholson D, Ruhs S et al. *Rapid detection of respiratory viruses by shell vial culture and direct staining by using pooled and individual monoclonal antibodies.* J Clin Microbiol 1992; 30:40-44.
16. Rabalais GP, Stout GG, Ladd KL, Cost KM. *Rapid diagnosis of respiratory viral infections by using a shell vial assay and monoclonal antibody pool.* J Clin Microbiol 1992; 30:1505-08.
17. Johnston SLG, Siegel CS. *Evaluation of direct immunofluorescence, enzyme immunoassay centrifugation culture, and conventional culture for the detection of respiratory syncytial virus.* J Clin Microbiol 1990; 2394-97.
18. *Use of monoclonal antibodies for rapid diagnosis of respiratory viruses: Memorandum from a WHO meeting.* Bulletin of the World Health Organization. 1992; 70 (6):699-703.
19. Stout C, Murphy MD, Lawrence S, Julian S. *Evaluation of a monoclonal antibody pool for rapid diagnosis of respiratory viral infections.* J Clin Microbiol 1989; 448-52.
20. Chao RK, Fishaut M, Schwartzman JD, McIntosh K. *An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of respiratory syncytial virus in human nasal secretions.* J Infect Dis 1979; 2:483-86.
21. Salomon H, Grandien M, Avila MM, Pettersson CA, Weissenbacher MC. *Comparison of three techniques for detection of respiratory viruses in nasopharyngeal aspirates from children with lower acute respiratory infections.* J Med Virol 1989; 28:159-62.
22. Doller G, Schuy W, Tjhen KY, Stekeller B, Gerth HJ. *Direct detection of influenza virus antigen in nasopharyngeal specimens by direct enzyme immunoassay in comparison with quantitating virus shedding.* J Clin Microbiol 1992; 866-69.
23. Halstead D, Todd S, Fritch G. *Evaluation of five methods for respiratory syncytial virus detection.* J Clin Microbiol 1990; 1021-25.
24. Hyypia T. *Detection of Adenovirus in nasopharyngeal specimens by radioactive and non-radioactive DNA probes.* J Clin Microbiol 1985; 21:730-33.
25. Gomes SA, Nascimento JP, Siqueira MM, Krawczuk MM, Pereira HG, Russell WC. *In situ hybridization with biotinylated DNA probes: A rapid diagnostic test for adenovirus upper respiratory infections.* J Virol Methods 1985; 12:105-10.
26. McIntosh K, Chanock RM. *Respiratory syncytial virus.* Virology, edited by B.N. Fields et. al. Raven Press, New York 1985.
27. Hendry RM, Talis AL, Godfrey E et al. *Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks.* J Infect Dis 1986; 153:291-97.
28. Mufson MA, Belshe RB, Orvell C. *Respiratory syncytial virus epidemics: Variable dominance of subgroups A and B strains among children, 1981-1986.* J Infect Dis 1988; 157:143-48.
29. Salomon H, Avila MM, Cerqueiro MC, Orvell C, Weissenbacher MC. *Clinical and epidemiologic aspects of respiratory syncytial virus antigenic variants in Argentinian children.* J Infect Dis 1991; 163:67.
30. Beem M. *Repeated infections with respiratory syncytial virus.* J Immunol 1967; 98:1115-22.

31. Parrot RH, Kim HW, Arrobio JO et al. *Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington DC. II infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex.* Am J Epidemiol 1973; 98:289-300.
32. Hall CB. *Virus sincitial respiratorio. Enfermedades infecciosas, Principios y práctica.* II Mandell/Douglas/Bennett. 3a. Edición, Editorial Medica Panamericana. 1991; 1334-349.
33. Ray CG, Minnich LL. *Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses.* J Clin Microbiol 1987; 355-57.
34. Hierholzer JC, Wigand R, Anderson LJ, Adrian T, Gold JW. *Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of 5 new serotypes of subgenus D (types 43-47).* J Infect Dis 1988; 158:804-13.
35. Rowe, Huebner WPRJ, Gillmore LK, Parrot RH, Ward TG. *Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture.* Proc Soc Exp Biol Med 1953; 84:570.
36. Hierholzer JC. *Adenovirus.* Manual of Clinical Microbiology, Fifth Edition. 1991; Chapter 86. Balows A, Hausler WJ Jr., Hermann KL, Isenberg HD and Shadomy HJ.
37. Wadell G. *Adenoviridae: The adenoviruses.* p 284-300. Lennette EH, Halonen P and Murphy FA. (ed). Laboratory diagnosis of infectious diseases: principles and practice, Vol II. Viral, rickettsial, and chlamydial diseases. Springer-Verlag, New York.
38. Schmitz HR, Wigand R, Heinrich W. *World-wide epidemiology of human adenovirus infections.* Am J Epidemiol 1985; 117:455-66.
39. Becroft DMO. *Pulmonary sequelae of epidemic type 21 adenovirus infection: 1-13 year follow-up.* Arch Dis Child 1979; 54:155-56.
40. Hierholzer JC. *Adenoviruses.* Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, 6th ed. En N.J. Schmidt and R.W. Emmons (ed). American Public Health Association, Inc. Washington, DC. 1989; 219-64.
41. Chanock RM, McIntosh K. *Parainfluenza viruses.* Virology. Second Edition, Edited by N. Fields, D.M. Knipe et al. Raven Press, Ltd., New York 1990; 963-988.
42. Hendley JO. *Virus parainfluenza.* Mandell/Douglas/Bennett. Enfermedades Infecciosas, Principios y Prácticas. 3a. Edición, Ed. Medica Panamericana. 1991; 1323-28.
43. Parrot RH, Vargosko AJ, Kim HW, Bell JA, Chanock RM. *Myxoviruses: parainfluenza.* Am J Public Health 1962; 52:907-17.
44. Glezen WP, Frank AL, Taber LH, Kasel JA. *Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children.* J Infect Dis 1984; 150:851-57.
45. Minnich LL, Ray CG. *Early testing of cell cultures for detection of hemadsorbing viruses.* J Clin Microbiol 1987; 25:421-22.
46. Minnich LL, Ray CG. *Comparison of direct immunofluorescence staining of clinical specimens for respiratory virus antigens with conventional isolation techniques.* J Clin Microbiol 1980; 12:391-194.
47. Kendal A, Harmon MW. *Orthomyxoviridae: The Influenza Viruses.* Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases (Principles and Practices). Lennette EH, Halonen P and Murphy FA. Editors Vol II, Springer-Verlag, New York, 1988; 602-625.

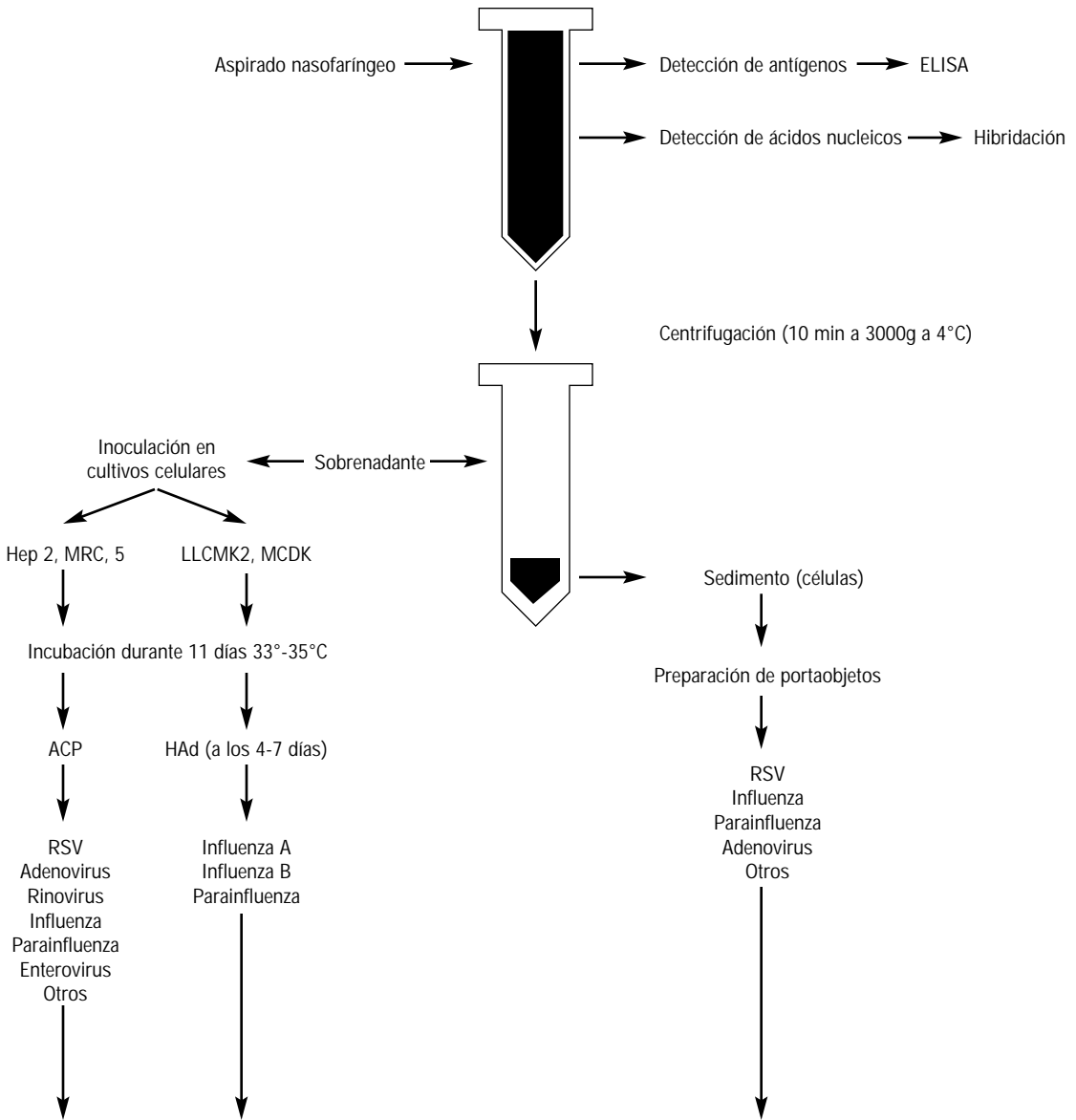
48. Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blodorn J. *Activation of influenza A virus by trypsin treatment.* Virology 1975; 68:426-39.
49. Walls HH, Harmon MW, Slage JJ, Stocksdales C, Kendal AP. *Characterization and evaluation of monoclonal antibodies developed for typing influenza A and influenza B viruses.* J Clin Microbiol 1986; 23:240-45.
50. Walls HH, Johansson KH, Harmon MW, Halonen PE, Kendal AP. *Time-resolved fluoroimmunoassay with monoclonal antibodies for rapid diagnosis of influenza infections.* J Clin Microbiol 1986; 24:907-12.
51. Yamada A, Imanishi J, Nakajima E, Nakajima N, Nakajima S. *Detection of influenza viruses in throat swab by using polymerase chain reaction.* Microbiol Immunol 1991; 35:259-65.
52. Claas ECJ, Sprenger MJW, Kleter GEM, Van Beek R, Quint WGV, Masurel N. *Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction.* J Virol Methods 1992; 1-13.
53. Hamparian VV, Colonno RJ, Cooney MK, Dick EC et al. *A collaborative report: rhinoviruses extension of the numbering system from 89 to 100.* Virology 1987; 159:191-92.
54. Dick EC, Jennings LC, Mink KA, Wartgow CD, Inhorn SL. *Aerosol transmission of rhinovirus colds.* J Infect Dis 1987; 156:442-48.
55. Landry ML. *Rhinoviruses.* Manual of Clinical Microbiology. Fifth Edition. 1991; Chapter 84. Balows A, Hausler WJ Jr., Hermann KL, Isenberg HD and Shadomy HJ.
56. Fleming JO, El Zaatari FAK, Gilmore W, Berne JD, Burks JS, Stohlman SA, Tourtellotte WW, Weiner LP. *Antigenic assessment of coronaviruses isolated from patients with multiple sclerosis.* Arch Neurol 1988; 45:629-33.
57. Ray CG. *Coronaviruses.* Manual of Clinical Microbiology. Fifth Edition. 1991; Chapter 85. Balows A, Hausler WJ Jr., Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ.
58. Modlin JF. *Coxsackievirus, echovirus y nuevos enterovirus.* Mandell/Douglas/Bennett. Enfermedades Infecciosas, Principios y Prácticas. 3a. Edición, Ed. Médica Panamericana 1991; 1442-59.

XI. ANEXOS

Cuadro 1: Los virus como causa de infecciones respiratorias agudas

Síndrome	Agente etiológico viral	
	Más frecuente	Menos frecuente
Infección de vías respiratorias altas (resfrío común)	Rinovirus Coronavirus Adenovirus Parainfluenza 3	Influenza A o B Parainfluenza 1 ó 2 VSR Enterovirus
Faringitis	Adenovirus Enterovirus	Influenza A VSR Parainfluenza 1 y 2 Rinovirus Coronavirus
Crup	Parainfluenza 1, 2 y 3	Influenza A VSR Sarampión Coronavirus
Bronquiolitis	VSR Parainfluenza 3	Adenovirus Parainfluenza 1 y 2 Influenza A o B Rinovirus
Neumonía	VSR Parainfluenza 3 Adenovirus Influenza A	Parainfluenza 1 y 2 Rinovirus

Figura 1: Diagnóstico etiológico directo de IRA virales



Identificación de antígenos virales por la técnica de inmunofluorescencia (IF)