



**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO**

**CARRERA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**“Estudio retrospectivo de los virus respiratorios en muestras  
negativas a IF en pacientes pediátricos del Hospital  
Carlos Van Buren de Valparaíso”**

**Seminario de Grado  
presentado en conformidad a los requisitos para obtener  
el Grado Académico de  
“Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología y  
Citodiagnóstico”**

**Autor  
Yennifer Navarro Trincado**

**BQ. PhD. Ximena Collao Ferrada  
BQ. Cindy Peña Moreno**

# Índice de contenidos

<b>ABSTRACT</b> .....	IV
<b>RESUMEN</b> .....	V
<b>1.INTRODUCCIÓN</b> .....	1
• 1.1 Clasificación y estructura de los virus respiratorios .....	2
• 1.2 Características clínicas de las IR virales .....	4
• 1.3 Epidemiología de los Virus respiratorios causantes de IRAB .....	5
- 1.3.1 Epidemiología de los virus respiratorios en el mundo .....	5
- 1.3.2 Epidemiología de los virus respiratorios en Chile .....	7
• 1.4 Diagnóstico de los virus respiratorios .....	9
- 1.4.1 Cultivo celular .....	9
- 1.4.2 Inmunofluorescencia .....	9
- 1.4.3 Enzimoinmunoanálisis .....	10
- 1.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa .....	11
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	13
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	13
• General .....	13
• Específicos .....	13
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	13
• 4.1 Selección de las muestras .....	14
• 4.2 Extracción de ácidos nucleicos .....	14
• 4.3 Amplificación de ácidos nucleicos .....	14
<b>5. RESULTADOS</b> .....	17
• 5.1.1 Pesos Moleculares de los fragmentos amplificados .....	17

• 5.1.2 Resultados de Nested RT-PCR Múltiplex para BRQ.....	18
• 5.1.3. Coinfecciones detectadas .....	19
• 5.2. Características epidemiológicas de los virus detectados .....	20
• 5.2.1. Prevalencia de los virus detectados según grupos de edad .....	20
• 5.2.2. Prevalencia de cada tipo viral según grupos de edad.....	21
• 5.3 Virus detectados en los meses analizados .....	22
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>23</b>
• 6.1. Resultados falsos negativos .....	23
• 6.2. Detección de virus respiratorios del panel de BRQ .....	24
• 6.3. Coinfecciones detectadas .....	26
• 6.4. Relación entre el rango de edad y los virus detectados .....	28
• 6.5. Virus detectados en los meses analizados .....	31
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>34</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	
Tabla 1 .....	2
Tabla 2.....	4
<b>ANEXOS.....</b>	<b>40</b>
Tabla 1. N° de cada tipo de virus detectado.....	40

Tabla 2. N° muestras positivas detectadas en las 160 muestras analizadas por PCR .....	41
Tabla 3. N° casos positivos detectados por PCR, a partir de muestras negativas a la IFI en ANF .....	41
Tabla 4. N° Porcentajes de muestras positivas detectadas de las coinfecciones por la PCR para BRQ .....	41
Tabla 5. N° de casos positivos por grupos etarios detectados por PCR, a partir de muestras negativas a la IFI en ANF .....	42
Tabla 6. Prevalencia de cada tipo de virus según grupo de edad detectados por PCR, a partir de muestras negativas a la IFI en ANF.....	42
Tabla 7. N° de muestras positivas detectadas por grupos de edad y N° de casos totales analizados por grupos de edad .....	43
Tabla 8. Distribución de los virus respiratorios detectados por PCR en los meses de junio, julio y agosto del 2010 .....	43
<b>PROTOSCOLOS</b> .....	44

## ABSTRACT

Acute respiratory infections are a priority worldwide health problem, generating most of primary care visits and hospitalizations for children during winter season. Viruses are the main causes of these diseases, bronchiolitis and pneumonia are primarily associated with respiratory syncytial virus, then emerging viruses adenovirus and metapneumovirus and bocavirus. Hypothesis: It is proposed that metapneumovirus and bocavirus were circulate in the pediatric population during the winter of 2010 at the region of Valparaiso and a 40% of this results are false negatives for adenovirus after the analysis by indirect Immunofluorescence. Objective: To identify respiratory viruses wich are causing low acute respiratory failure on negative samples by immunofluorescence in resident children of Carlos Van Buren Hospital in Valparaiso. 160 nasopharyngeal aspirates samples from patients with respiratory symptoms were analyzed since June to August of 2010 by technique of reverse transcription and multiple polymerase chain reaction nested for bronchiolitis. Results: 65/160 (40.6%) positive cases, 32/160 (20%) were adenovirus, 25/160 (15.6%) bocavirus, 5/160 (3.1%) metapneumovirus, 9/160 (5.6%) and 10/160 (6.3%) were respiratory syncytial virus A and B respectively. At the same time was founded evidence of coinfections by highlighting presence of respiratory syncytial virus, adenovirus and bocavirus. Also 95/160 samples (59.3%) were negative. The results obtained confirm the diagnostic utility of this technique, highlighting the contribution about identifying the etiologic agent in previously diagnosed negative samples, with additional information as metapneumovirus and bocavirus agents routinely unintended at the hospital.

Keywords: respiratory failure, respiratory viruses, coinfections and reverse transcription of multiple nested polymerase chain reaction, bronchiolitis, adenovirus, bocavirus, metapneumovirus and respiratory syncytial virus.

## RESUMEN

Las infecciones respiratorias agudas son un problema prioritario de salud a nivel mundial, generando la mayoría de las consultas de atención primaria y hospitalizaciones infantiles en período invernal. Los virus son los principales causantes de ellas, las bronquiolitis y neumonías se asocian principalmente con virus respiratorio sincicial, luego adenovirus y los virus emergentes metapneumovirus y bocavirus. Hipótesis: Se propone que el metapneumovirus y bocavirus se presentaron en la población pediátrica durante el invierno del 2010 en la región de Valparaíso y, que una gran cantidad de los resultados son falsos negativos para adenovirus tras el análisis por inmunofluorescencia indirecta. Objetivo: identificar virus respiratorios causantes de insuficiencias respiratorias agudas bajas en muestras negativas por inmunofluorescencia en niños del Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso. Se analizaron 160 muestras de aspirados nasofaríngeos de pacientes con síntomas respiratorios, desde junio a agosto del 2010, por la técnica transcripción reversa y reacción de polimerasa en cadena anidada múltiple para bronquiolitis. Resultados: 65/160 (40.6%) de casos positivos, 32/160 (20%) corresponden a adenovirus, 25/160 (15.6%) bocavirus, 5/160 (3.1%) metapneumovirus, 9/160 (5.6%) y 10/160 (6.3%) a virus respiratorio sincicial A y B respectivamente. Se evidenció además presencia de coinfecciones entre las que se destacan virus respiratorio sincicial, bocavirus y adenovirus. Además 95/160 muestras (59.3%) obtuvieron resultado negativo. Los resultados obtenidos avalan la utilidad diagnóstica de la técnica, destacando el aporte en identificar el agente etiológico en muestras diagnosticadas previamente negativas, con información adicional de agentes como metapneumovirus y bocavirus, rutinariamente no diagnosticados en el hospital.

Palabras Claves: insuficiencias respiratorias, virus respiratorios, coinfecciones, transcripción reversa y reacción de polimerasa en cadena anidada múltiple, bronquiolitis, adenovirus, bocavirus, metapneumovirus y virus respiratorio sincicial.

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son un problema prioritario de Salud a nivel mundial, ya que son causa de la mayoría de las consultas de atención primaria y hospitalizaciones infantiles en período invernal, siendo incluso la causa de muerte en lactantes y niños menores de 5 años (Palomino y Avendaño, 2008).

Según la ubicación de los síntomas clínicos de las IRA estas se definen como: IRA altas (IRAA) cuando producen inflamación del aparato respiratorio superior (nasofaringitis, sinusitis, faringitis, amigdalitis, laringitis, traqueítis y epiglotitis). IRA bajas (IRAB), son más severas causando bronquitis, bronquiolitis, neumonía incluso exacerbación del asma y EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica) (Eiros Bouza et al., 2009).

Se han identificado más de 200 virus diferentes (Eiros Bouza et al., 2009), causantes del 70 a 90% de las IRA, dependiendo del perfil estacional que tengan en cada país. La principal característica de éstos es, que varios agentes virales pueden causar el mismo cuadro clínico y el mismo agente puede originar una variedad de síndromes. (Weissenbasher et al., 1997)

Entre los principales agentes causantes de las IRA altas se encuentran el Rinovirus (RnVh) y Coronavirus (CoVh); mientras que en las IRA bajas el Virus Respiratorio Sincial (VRS), el Virus Influenza A y B (FLU A y B), Adenovirus (ADV), Parainfluenza (PI) tipos 1, 2 y 3, y los virus emergentes Metapneumovirus humano (MpVh) en el año 2001(Avendaño, L.F et al., 2011) y Bocavirus (BoVh) en el 2005 (Avendaño, L.F et al., 2011).

A continuación se describen los principales agentes causantes de las IRAB en el mundo que son de interés en este estudio. Se comentará su relevancia en Chile, además de las principales características estructurales y epidemiológicas de cada uno de los virus.

## 1.1 Clasificación y Estructura de los Virus Respiratorios

La clasificación de los virus respiratorios se basa en distintos criterios establecidos en un sistema universal de Taxonomía de los Virus, según su: fenotipo, morfología, estructura y tipo de genoma (virus ARN y virus ADN), propiedades antigénicas y clínicas en: familias, subfamilias, géneros y especies (ver tabla 1). La secuenciación de sus genomas ha permitido profundizar en el estudio de características funcionales y estructurales de los virus, agrupándolos también en diferentes tipos y subtipos.

**Tabla 1. Clasificación y características de los virus respiratorios (ICTV, 2011).**

<b>Familia</b>	<b>Virus</b>	<b>Genoma</b>	<b>Población afectada</b>
<b><i>Orthomixoviridae</i></b>	<b>FLU</b>	ssARN-	Adultos, jóvenes y niños < de 5 años
<b><i>Paramixoviridae</i></b>	<b>VRS</b>	ssARN-	Lactantes < 6 meses, prematuros
	<b>MpVh</b>		Lactantes < 1 año y niños < 2 años
	<b>PI</b>		Niños < 5 años
<b><i>Picornaviridae</i></b>	<b>EV</b>	ssARN+	Niños en general
	<b>Coxsackie y ECHO</b>		Todas las edades desde lactantes hasta adultos
	<b>RnVh</b>		
<b><i>Coronaviridae</i></b>	<b>CoVh</b>	ssARN+	Toda la población desde lactantes a ancianos
<b><i>Parvoviridae</i></b>	<b>BoVh</b>	ssADN+/-	Lactantes y niños menores de 5 años



A continuación se describen los virus de interés en este estudio:

El VRS, pertenece la familia *Paramyxoviridae* y al género *Pneumovirus* (Weissenbasher et al.,1997) se distinguen los tipos A y B, posee un genoma de ARN envuelto por una nucleocápside helicoidal que codifica 9 proteínas estructurales y 2 no estructurales (NS1 y NS2) (Jawetz, et al., 2005). Posee una bicapa lipídica donde se encuentran sus antígenos de superficie en forma de espículas, las glicoproteínas G y F que permiten la adhesión y fusión del virus respectivamente a la célula huésped. (Pinto., 2007)

El MpVh, es similar al VRS pertenecen a la misma familia y género (Jofré, 2005). Solo difieren en que no posee las proteínas no estructurales NS1 y NS2, varía el orden en que se disponen sus genes y codifican otro virus con características distintas al VRS, pero de igual estructura (Abara, 2006). Según la proteína F se distinguen los tipos A, B y por análisis génico subtipos A1, A2 y B1 y B2 (Broor et al., 2008).

El ADV humano, pertenece a la familia *Adenoviridae* y al género *Mastadenovirus*. Se han identificado 55 serotipos distintos, agrupados en 6 subgéneros de A-F (Mateos, S., 2005). Su genoma es de ADN y codifica 11 proteínas, cubierto por una nucleocápside icosaédrica con caras triangulares formada por 252 capsómeros. Los capsómeros contienen hexones y pentones (constituyen 12 vértices) (Murtagh, 2004), cada pentón contiene una base de la que se proyecta una fibra hacia fuera con un botón terminal que permite la adsorción viral y es la responsable de la infectividad del virus (Jawetz et al., 2005.).

El BoVh, pertenece a la familia *Parvoviridae* y género *Bocavirus*; hasta el momento se han descubierto los tipos 1, 2, 3 y 4. Su genoma es ADN envuelto por una nucleocápside icosaédrica sin envoltura que codifica para proteínas estructurales (regiones conservadas) y no estructurales (regiones de mayor variabilidad) (Aguirre,2006).Las proteínas estructurales virales VP1 y VP2, son

idénticas en secuencia solo difieren en la región amino-terminal de VP1 (región única de VP1), responsable de la infectividad viral (Jofré, 2005).

## 1.2 Características clínicas de las IRA virales

Las IRA tienen distintas manifestaciones clínicas y gravedad dependiendo de la zona de la vía aérea comprometida. La infección puede variar desde asintomática subclínica hasta cuadros que produzcan la muerte, aunque la mayoría de ellas pueden ser leves y autolimitadas dependiendo del estado inmunológico, edad y la interacción con el ambiente del huésped. El VRS, PI, MpVh, ADV y BoVh tienen afinidad por el tracto respiratorio inferior produciendo bronquiolitis y neumonías, además de reactivación de enfermedades base como asma y EPOC. Según variados estudios se acepta que muchos tipos de virus distintos pueden ocasionar la misma enfermedad respiratoria y, al mismo tiempo uno de ellos puede causar varios síndromes distintos, debido a esto, no siempre los diagnósticos clínicos etiológicos podrían ser del todo certeros y, se hace urgente la necesidad de identificar el agente etiológico para aplicar un tratamiento eficaz al paciente (Avendaño, L.F et al., 2011).

**Tabla 2. Virus que infectan en distintos niveles el aparato respiratorio** (Avendaño, L.F et al., 2011)

Síndrome	Virus Responsable
Faringitis	ADV +++, FLU ++, PI ++
Bronquiolitis	VRS +++, MpVh ++, PI ++
Neumonía	VRS +++, FLU ++, MpVh ++, PI 3 ++, ADV +, SARS
Infección Subclínica	Cualquiera de los mencionados
Cualquiera de los síndromes anteriores	Cualquiera de los mencionados, en forma epidémica o esporádica en distintas proporciones.

### **1.3 Epidemiología de los virus respiratorios causantes de IRAB**

Los estudios epidemiológicos son muy necesarios para prevenir las enfermedades respiratorias, ya que permiten detectar el momento en el cual está empezando un brote infeccioso para alertar a la población de mayor riesgo y preparar los servicios de salud, para que tomen medidas y evitar el contagio.(ISP Chile, 2003)

Desde 1968 el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP Chile, 2003) forma parte de la Red de Laboratorios de la Organización Mundial de la Salud para la vigilancia de Influenza como Centro Nacional de Referencia de Influenza. Esta vigilancia se realiza conjuntamente con otros virus respiratorios, mediante una red que está formada por laboratorios clínicos de hospitales de los Servicios de Salud (SS) desde Arica a Punta Arenas que han sido adiestrados por el ISP en la técnica de Inmunofluorescencia (IF) y que son considerados centros sensores.

Los laboratorios envían semanalmente su información etiológica al ISP, identificando los casos analizados, y los resultados positivos para VRS, ADV, PI, FLU A e FLU B. Para estos fines realizan la técnica de IFI con anticuerpos monoclonales que son específicos para cada virus. (ISP Chile, 2003)

La mayor parte de las muestras estudiadas en Chile por la red del ISP, corresponden a pacientes pediátricos hospitalizados por Infección Respiratoria Aguda Baja (IRAB) provenientes principalmente de hospitales, teniendo acceso también a la información de algunas clínicas privadas y/o consultorios de Santiago.

#### **1.3.1. Epidemiología de los virus respiratorios en el mundo.**

En EE.UU se han reportado 125.000 casos al año por VRS, de ellos solo 96000 son población infantil y se estiman 160000 muertes al año a causa de él en todo el mundo (OMS, 2009).

En Asia, África y América del Sur señalan al VRS como el causante de alrededor del 45% de las IRAB en menores de 5 años asociado a las estaciones frías y lluviosas. (Lynette Pei-Chi Shek & Bee-Wah Lee, 2003).

El MpVh desde su detección en Holanda el 2001, se ha encontrado en Australia, Canadá, Estados Unidos, Francia, Reino Unido, España, Japón y en algunas regiones de Latinoamérica como Brasil, Argentina y Chile(López et al., 2006). Al año de vida, aproximadamente el 20% de los niños ha presentado una infección por MpVh y hacia los 5 años el 99% de los niños presentan anticuerpos contra él.(Maffey, 2008).

En Japón el 2011 de un total de 502 pacientes menores de 3 años se encontró MpVh en 43 de ellos (8.6%) (Yoshioka et al., 2012). En Italia se detectó una incidencia de MpVh de un 25.3% y una tasa de coinfección de 48.7% con VRS, los cuales desarrollaron neumonía con mayor frecuencia que los casos que solo tenían MpVh (Caracciolo et al., 2008).

El BoVh es de distribución universal, y se ha detectado en Alemania, Australia, Canadá, China, Corea del Sur, E.U.A., España, Francia, Japón, Jordania, Sudáfrica y Tailandia. (Jofré., 2005)

En Australia, se analizaron 324 muestras de pacientes entre 6 meses y 2 años de edad, encontrándose BoVh en 5,6% de los casos en monoinfección y asociado a otros virus respiratorios en un 50%.(Aguirre, 2006).En EE.UU, durante los inviernos del 2006-2008 se analizaron muestras de niños hasta 2 años con IRA y asintomáticos, encontrándose BoVh en un 33% de los afectados por las IRA y en un 44% de pacientes asintomáticos (Valdés y Pariasca, 2010).

Las infecciones por ADV, son de distribución mundial a veces se presenta en brotes epidémicos, y en todas las épocas del año (Avendaño, L.F et al., 2011). Los serotipos de mayor prevalencia en todo el mundo en las IRAB son el 3 y el 7, responsables del 5% de las IR en niños menores de 4 años (Weissenbasher et al., 1997). Se estima que todas las infecciones por ADV se

adquieren en la primera infancia (Mejía et al., 2007) y que tiene una incidencia de 55% en infecciones intrahospitalarias.(Jofré., 2005).

### **1.3.2. Epidemiología de los virus respiratorios en Chile.**

Los brotes epidémicos del VRS en Chile, ocurren todos los años en la época invernal (ISP, Chile 2003) la duración y magnitud de ellos dependen de los individuos susceptibles en la población y de las variaciones antigénicas que este posee (Avendaño et. al.,2003).

En Chile se considera el VRS como el principal responsable de las IRAB en lactantes (ISP, Chile 2003) el 100% de los niños hasta 2 años han tenido alguna infección o manifestación clínica por VRS, 1/3 de ellos con neumonía, bronquiolitis o crisis obstructivas. Alrededor del 2,5% de los infectados debe hospitalizarse y 0.1% fallece (PUC,2012).

La ausencia de un brote de influenza en el invierno del 2002 realzó el rol del VRS (Luchsinger et al., 2005). El ISP reportó el VRS en 49665 casos del 2000 al 2010, durante los meses de mayo a agosto, con un aumento en el mes de julio de 21606 casos en 10 años, con un promedio de 1900 casos al mes (ISP Chile, 2003).

En Chile se ha detectado el MpVh en variados estudios realizados en distintos servicios hospitalarios a lo largo del país. Se ha determinado que este “nuevo” virus respiratorio produce entre el 5-20% de los cuadros respiratorios en niños donde otro agente viral no ha podido ser encontrado. Se presenta a fines de invierno, primavera e inicios del verano, pero aumenta su circulación luego de desaparecer el VRS (PUC, 2012).

Durante los años 2002 y 2003 la Dra. Ferrés analizó en el Hospital Exequiel González Cortés, 100 muestras de ANF de niños menores de 2 años con IRAB negativas para el panel viral de rutina detectando un 9% de las muestras con MpVh (Abara, 2006). El equipo de Luchsinger lo detectó en 5,4% en menores de 2

años hospitalizados por IRA baja con panel viral negativo por IFI y aislamiento viral (Abara, 2006).

En la Clínica Santa María se analizaron muestras pediátricas de niños hospitalizados por IRAB desde mayo 2005 a mayo 2006 y se encontró MpVh en un 19.6% de los casos analizados, todos mayores de un año y principalmente con diagnóstico de neumonía, la circulación del MpVh se observó de abril a diciembre.(Lozano et al., 2009)

En el caso del BoVh la mayoría de los estudios publicados son retrospectivos, y utilizan muestras de ANF de pacientes pediátricos con edad promedio de 2 años que fueron negativos para ADV, FLU, VRS y MpVh, con un predominio estacional en invierno y primavera (Jofré, 2005)

En Santiago de Chile, entre marzo y noviembre del 2007 se recolectaron 362 muestras de niños menores de 5 años con síntomas respiratorios. Se detectó BoVh en 21,8% del total de los casos, de ellas 24% en monoinfección y 76% se asociaron a coinfección con VRS, FLU, MpVh y ADV. La mayoría de los casos positivos correspondieron a los meses invernales de junio y julio (Flores C et al., 2011).

El ADV en Chile, se ha reportado en niños hospitalizados por IRAB en sus serotipos 7(50%), 2(25%) y 1(20%). Existen casos que evolucionan de forma muy severa resultando fatales y dejando secuelas pulmonares importantes (Palomino y Avendaño 2008).

De 3825 lactantes hospitalizados por IRAB (1988-1998), un 11% de ellas era por ADV dejándolo como el agente causal más frecuente de IRAB después del VRS (Avendaño, L F et al., 2011).

## **1.4 Diagnóstico de los virus respiratorios**

### **1.4.1. Cultivo Celular**

Fue la primera técnica utilizada para detectar virus respiratorios. Hoy en día ha sido desplazada por la IF y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que tarda menos tiempo en la obtención de resultados, limitando su uso fundamentalmente a investigación (Eiros Bouza et al., 2009).

Las líneas celulares que se utilizan para cultivos celulares de virus respiratorios, son: MDCK (FLU), LLC-MK2 (PI) y HEP2 (VRS – ADV) (García et al., 2008). La infección viral se evidencia a través de cambios morfológicos que el virus produce sobre la célula lo que se, denomina efecto citopático viral y, la presencia del virus es confirmada con IF (Eiros Bouza et al., 2009).

En el caso del cultivo shell vial, las muestras son centrifugadas con células en cultivo en tubos especiales (shell vial). La centrifugación acelera la adherencia y entrada del virus a la monocapa celular, proveniente de líneas celulares comerciales lo que permite al cabo de 48 horas de incubación, identificar proteínas del virus. Esto beneficia el tiempo del resultado diagnóstico, ya que, el cultivo tradicional puede demorar hasta 7 días. La identificación de proteínas se hace mediante anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluoresceína dirigidos al antígeno de superficie viral. La sensibilidad del cultivo es aproximadamente un 50% menor al compararlo con una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Abreu et al., 2011). Variados estudios comparativos de estas técnicas muestran incrementos de virus respiratorios (FLU A, B, C; ADV, VRS A y B; PI 1, 2, 3 y 4; RV, CoVh ) en la detección por PCR que varían entre un 12 a un 25% (Abreu et al., 2011).

### **1.4.2 Inmunofluorescencia**

La técnica de Inmunofluorescencia ocupa anticuerpos conjugados con fluoróforos o fluorocromos, que al ser excitados con la energía de una determinada longitud de onda emiten una fluorescencia que puede ser visualizada

al microscopio. Su principio básico es la reacción antígeno anticuerpo, en el cual, si el antígeno está presente interacciona con el anticuerpo conjugado a la molécula fluorescente (Eiros Bouza et al., 2009).

Las muestras clínicas son colocadas sobre portaobjetos de vidrio donde se dejan secar y fijar. Luego se agregan los anticuerpos específicos marcados con la fluoresceína estos anticuerpos se unirán al antígeno viral si éste se encuentra presente infectando a las células (Sandin, 2008). La reacción antígeno anticuerpo es visualizada con el microscopio de fluorescencia, tras la excitación del fluoróforo que emite un color verde manzana característico.

La IF puede ser utilizada para una identificación rápida del virus directamente sobre la muestra (por ejemplo: células eluidas de un lavado nasal, o de un hisopado nasofaríngeo), o para confirmar el efecto citopático observado en cultivos celulares (Eiros Bouza et al., 2009).

#### **1.4.3. Enzimoinmunoanálisis (EIA)**

Es un método de detección indirecto, puesto que utiliza un anticuerpo secundario conjugado a enzima para detectar el antígeno. Se basa en el uso de anticuerpos específicos unidos a una fase sólida, en el pocillo de una microplaca o una pequeña esfera de plástico, que se unen al antígeno buscado. Esta reacción es revelada mediante la adición del anticuerpo secundario conjugado a una enzima que puede ser peroxidasa o fosfatasa alcalina, que al reaccionar con su sustrato hacen que este cambie de color, confirmando la presencia del antígeno (Sandin, 2008).

Los antígenos virales utilizados para el diagnóstico son las proteínas de superficie que también pueden encontrarse en las células infectadas (Eiros Bouza et al., 2009).

La EIA permite procesar varias muestras a la vez, de forma rápida y automatizada, ya que estos se leen en espectrofotómetros o lectores ELISA



especialmente diseñados, siendo entonces una técnica más objetiva, además de que el resultado no depende de la infectividad viral.

En un estudio comparativo entre IFD, Cultivo celular y EIA (Kit Biotrin) para MpVh se demostró que el cultivo celular es la técnica que posee menor sensibilidad y que, tanto la IFD como la EIA son útiles en el diagnóstico de la infección por MpVh, con la salvedad de que la IFD presenta una mayor sensibilidad en la fase inicial de la infección en comparación con la EIA que es útil tanto en el diagnóstico rápido como en el seguimiento del paciente (Calicó et al., 2009).

#### **1.4.4. Reacción en cadena de la Polimerasa PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa, amplifica material genético de una "secuencia blanco" (que es un gen o segmento de DNA) y genera muchas copias de esta secuencia en muy poco tiempo.

El proceso de PCR en general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2 – 3 pasos a diferentes temperaturas. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico, llamado "hold", a alta temperatura (> 90 °C), y seguido por otro hold al final del proceso para la extensión del producto final o el breve almacenaje (Mathews et al., 2003).

La amplificación se lleva a cabo en 3 etapas: Desnaturalización del ADN (separación de la doble hebra), alineamiento o unión del cebador (el fragmento a amplificar se une al partidor), extensión de la cadena (la enzima sintetiza la hebra complementaria del fragmento a amplificar) y elongación final.

Las temperaturas usadas en cada ciclo dependen en general de la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de los iones y dNTPS, las temperaturas de unión de los primers y el tamaño del fragmento que se pretende amplificar (Lam et al., 2007). Los productos son visualizados en geles de agarosa que los separa según el tamaño de los fragmentos.

Esta técnica posee las variantes Transcripción reversa PCR (RT-PCR), PCR anidada, PCR múltiple, PCR *in situ* y PCR en tiempo real siendo aún más específicas y sensibles (Coiras et al., 2004).

Para el desarrollo de esta tesis, se utilizó una PCR anidada y múltiple; esta PCR optimiza la detección de los virus respiratorios, ya que se incorporan múltiples cebadores que amplifican ARN o ADN de varios virus simultáneamente en una sola reacción, identificando el genoma viral del VRS (A y B), ADV, MpVh y BoVh, en dos amplificaciones sucesivas (anidada) con una mínima cantidad de muestra, siendo capaz de detectar cualquiera de ellos y además aportar información útil acerca de la significancia de las coinfecciones en el diagnóstico de las enfermedades respiratorias.

Debido a que las IR tienen un rol protagónico en las enfermedades entre los lactantes y niños < de 5 años, son el motivo de consulta más frecuente en los centros asistenciales durante la estación invernal, causan un alto porcentaje de muertes en recién nacidos y afectan también a pacientes inmunodeprimidos, es necesario estudiar su etiología. En base a la investigación realizada hasta el momento de las IR, se ha concluido que los principales responsables son los virus respiratorios por lo que es de gran importancia generar conocimiento acerca de cuáles agentes están presentes en la población, cual o cuáles son los periodos de mayor circulación y el grupo etario más afectado, para ello es que proponemos analizar un grupo de muestras con diagnóstico negativo por IFI del Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso, del período de invierno del año 2010 incluyendo en su detección un panel de virus más amplio que el utilizado en el Hospital, y que incluye a los causantes de las bronquiolitis y neumonías que son las IR con cuadros de mayor gravedad y más alta tasa de mortalidad.

## **2. Hipótesis**

Se propone que los virus emergentes MpVh y BoVh circularon en la población pediátrica en el período de invierno del 2010, y que además, existe un gran porcentaje de resultados falsos negativos para ADV, tras el análisis por IFI en el HCVB.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo General**

- Detectar e identificar virus respiratorios causantes de IRAB en muestras negativas por IFI en niños menores de 5 años del Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso, utilizando una técnica de amplificación genómica de formato múltiple.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Analizar las muestras a través de la técnica Nested RT- PCR Múltiple para la detección simultánea de VRS (A, B), ADV, MpVh y BoVh.
- Determinar grupo etario afectado para los virus detectados con mayor frecuencia.
- Determinar la circulación en los meses estudiados para los virus analizados.
- Identificar coinfecciones de MpVh y BoVh en las muestras analizadas

## **4. Materiales y métodos**

### **Aspectos éticos**

La realización del presente estudio fue aprobado por la Comisión Médica del HCVB de Valparaíso el año 2010.

#### **4.1. Selección de las muestras**

Se utilizaron muestras de aspirados nasofaríngeos (ANF) con células epiteliales del tracto respiratorio superior, del período de invierno del año 2010 (junio, julio, agosto), que cumplen con los siguientes criterios de inclusión:

- Muestras obtenidas de pacientes en su mayoría menores de 5 años y hospitalizados que ingresaron al HCVB con síntomas respiratorios.
- Muestras que resultaron negativas por la técnica de IFI para los virus FLU A y B, ADV, PI y VRS.

Estas muestras se enviaron al Laboratorio de Virología de la Universidad de Valparaíso, donde fueron resuspendidas en 500 µL de tampón PBS (Phosphate Buffering Saline) a pH 7,0 y alicuotadas en partes iguales, luego se almacenaron a -80°C para su posterior procesamiento. De ellas, se escogieron al azar de dos a tres muestras por día hasta obtener un total de 160.

#### **4.2. Extracción de ácidos nucleicos**

Se tomaron 500 µL de los ANF almacenados y se extrajeron los ácidos nucleicos virales (ARN/ADN) utilizando el Método de Boom y Col. (1990) utilizando el equipo NuclisensminiMag® de acuerdo a las instrucciones del fabricante Biomeriux. Esta técnica muestra un rendimiento del 50% en la recuperación de ácidos nucleicos (Boom et al., 1990). (ver protocolo de amplificación, anexos)

#### **4.3. Amplificación de ácidos nucleicos**

##### Nested RT-PCR Múltiplex

Esta reacción de amplificación diseñada por Casas y Col (2003), (Coiras et al., 2004) permite detectar simultáneamente VRS, ADV, MpVh y BoVh.

La secuencia específica del fragmento a amplificar para la cual se crean los partidores, se encuentra en las regiones más conservadas del genoma de los virus respiratorios estudiados, entre ellas; la proteína de fusión (F) de VRS, la

proteína hexón de ADV, la proteína matriz (M) de MpVh y las proteínas de la cápside VP1 y VP2 de BoVh.

En la primera reacción de amplificación se utilizó el Kit Promega AccessQuick™ RT-PCR System.

Se agregaron 5 µL de extracto contenido en el Buffer de Elución más 45 µL de la mezcla con los reactivos necesarios para la 1ª amplificación. Esta mezcla contiene los dNTPS (A, T, C, y G) que participan en la síntesis de la hebra complementaria a la secuencia a amplificar iones mono y divalentes MgCl<sub>2</sub> y K<sup>+</sup> (dNTPS+iones+H<sub>2</sub>O+buffer = 2X), H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, 5 unidades de la enzima AMV para retrotranscripción del RNA y los partidores o cebadores dirigidos a una secuencia específica del genoma viral a amplificar. Esta mezcla se somete a distintos ciclos de cambios de temperatura para realizar la 1° amplificación. Para esto se utiliza el termociclador (Applied Bio Systems). (ver protocolo de RT-PCR 1° amplificación, anexos)

Una vez terminada la primera amplificación, se prepararon los reactivos para la 2° amplificación y se agregaron 2µL del 1° amplificado con 48 µL de mezcla. Esta mezcla contiene dNTPS (A, T, C, y G) para la hebra complementaria, los iones mono y divalentes MgCl<sub>2</sub> y K<sup>+</sup> y buffer (5X), H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, la enzima Taq polimerasa para la transcripción del DNA y los partidores o cebadores. En la segunda reacción de amplificación se utilizaron los reactivos de laboratorios Invitrogen™ (ver protocolo Nested PCR 2° amplificación).

Los productos de la amplificación se visualizaron en un transiluminador mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 2% con buffer TBE y tinción de un agente intercalante no tóxico (gelred).

### **Controles**

Para validar los resultados se utilizaron controles positivos y negativos en cada reacción de amplificación. Los controles positivos para VRS A y B, ADV, MpVh y BoVh fueron aislados de las siguientes líneas celulares: PH, Hep y

LLCMK-2, estos virus son parte del registro de cepas virales del Laboratorio de Virología de la Universidad de Valparaíso. Los controles negativos correspondieron a agua libre de DNAsa/RNAsa.

### **Bioseguridad y Contaminación**

La manipulación de los virus respiratorios, hasta la extracción del material genético se realizó en una cabina de bioseguridad nivel 2. Posteriormente debido a la alta sensibilidad de los ensayos de Nested PCR, se tomaron precauciones en la preparación y amplificación de las muestras para prevenir la contaminación cruzada con ácidos nucleicos amplificados previamente, de otras muestras y/o controles positivos. Los procedimientos para la extracción de ARN viral, para la primera ronda de amplificación y para la PCR anidada se llevaron a cabo en habitaciones separadas físicamente, alejadas de la zona de análisis de los productos amplificados. Cada área contaba con un set independiente de reactivos, micropipetas, puntas con filtro y tubos de reacción estériles libres de nucleasas.

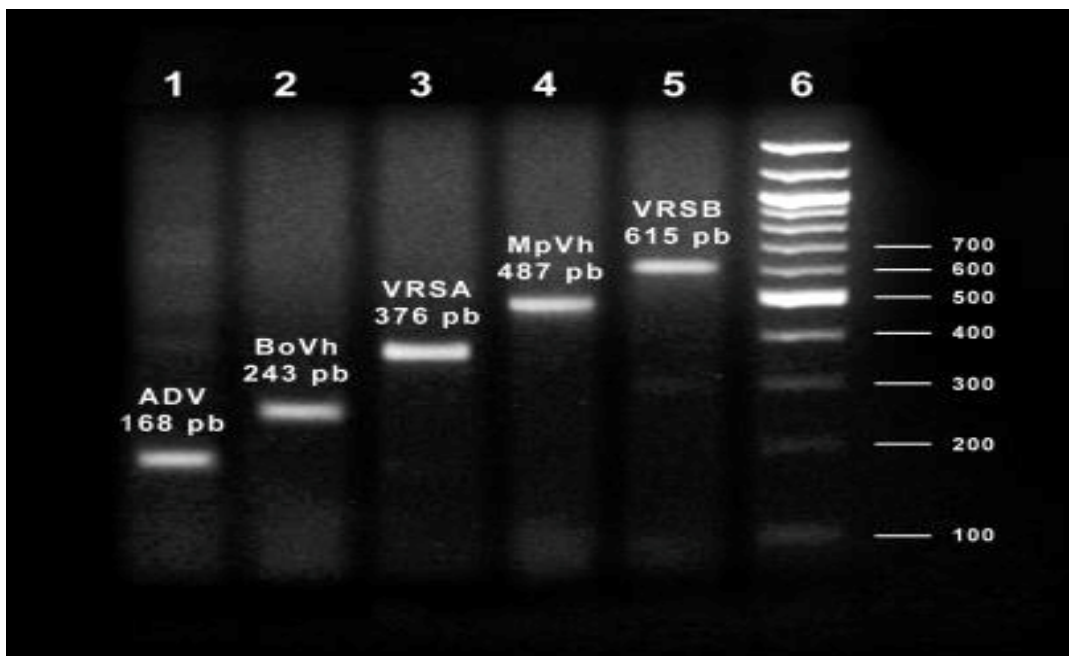
### **Análisis Estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa GraphPadPrism 5. A las variables discretas se les aplicó el Test no paramétrico de Kruskal-Wallis y para comparar todas las variables el Test Comparativo Múltiple de Dunn's. Las variables discretas se expresaron como números enteros y las continuas como porcentaje. Para establecer significancia estadística se consideró el valor de  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1.1. Pesos moleculares de los fragmentos amplificados

- Controles positivos en gel de agarosa al 2%



**Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio.**

- Sexto carril: marcador de tamaño para ADN de 100 pb
- Primer al quinto carril: Controles positivos obtenidos por la amplificación mediante la Nested RT-PCR Múltiplex:

Los fragmentos de material genético amplificado son: del gen de la proteína hexón de ADV, de los genes de las proteínas de la cápside VP1 y VP2 del BoVh, el gen de la proteína F de fusión del VRS A, el gen de la proteína matriz (M) de MpVh y por último el gen de la proteína F de fusión del VRS B.

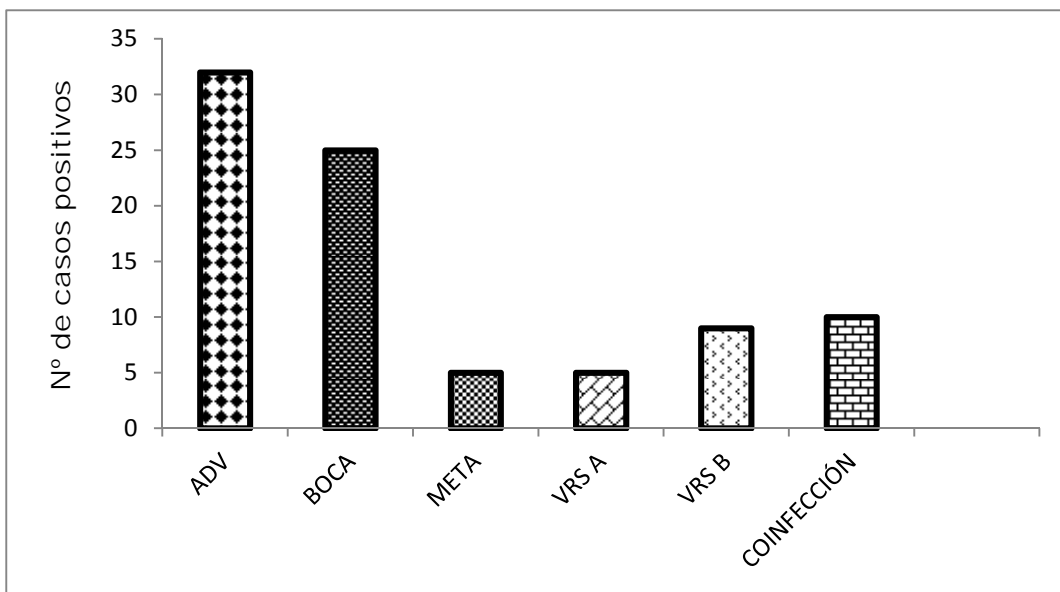
Los tamaños de los fragmentos son los siguientes: 168pb para ADV, 243 pb para BoVh, 376 pb para VRS A, 487pb para MpVh y 615 pb para VRSB.

Se analizaron por la Nested RT-PCR Múltiplex para BRQ 160 muestras pediátricas provenientes del HCVB de Valparaíso que fueron negativas para el panel de virus respiratorios por IFI.

### **5.1.2. Resultados de la técnica de amplificación Nested RT-PCR Múltiplex para BRQ**

De las 160 muestras analizadas, 65 fueron positivas a alguno de los virus respiratorios estudiados, esto corresponde al 40.6% del total y 95 fueron negativas, equivalente al 59,3%, del total de los casos analizados (tabla anexa n°3).

De las 65 muestras que resultaron positivas se obtuvo el siguiente detalle de agentes virales detectados: coinfecciones 6.3% (n=10), ADV 49,2% (n=32), BoVh 38,5% (n= 25), MpVh 7,7% (n=5), VRSA 7,7% (n=5) y VRSB 13,9% (n=9). (p=0.4) ( ver gráfico 1 y tabla anexa n°3).

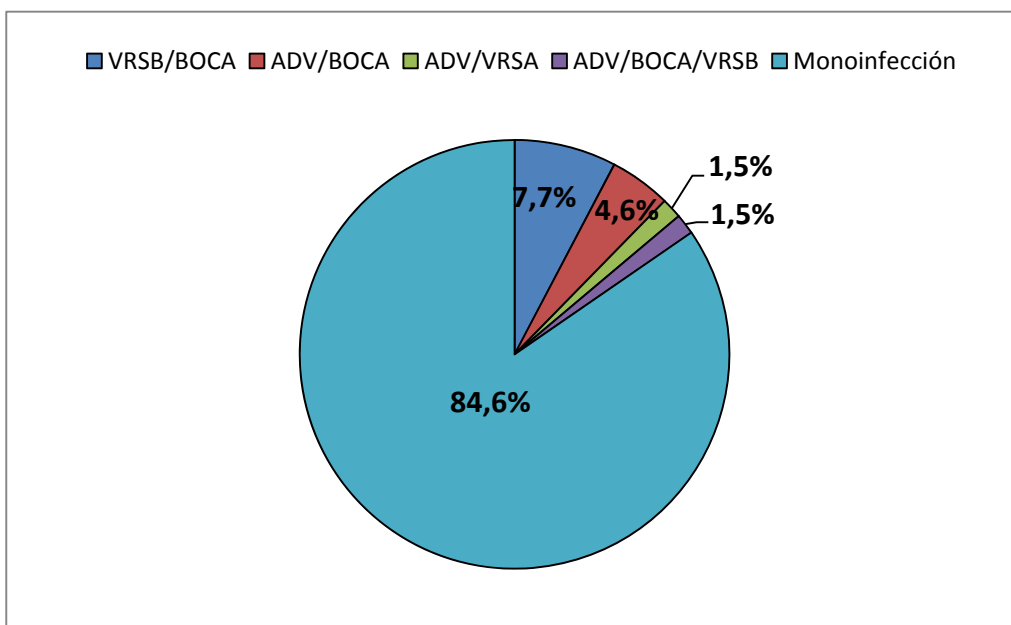


**Gráfico 1. Número de casos positivos detectados por PCR, a partir de muestras negativas por IFI en ANF.**



### **5.1.3. Coinfecciones detectadas**

Se detectó monoinfección en 55 casos correspondientes al 84,6% y en el 15,3% restante se detectó coinfección, de ellas, 5 son VRSB/BoVh correspondientes al 7,7%, 3 ADV/Boca un 4,6%, 1 ADV/VRSA un 1,5% y una triple infección con ADV/Boca/VRSB que también corresponde al 1,5%. (gráfico 2 y tabla anexa n°4)

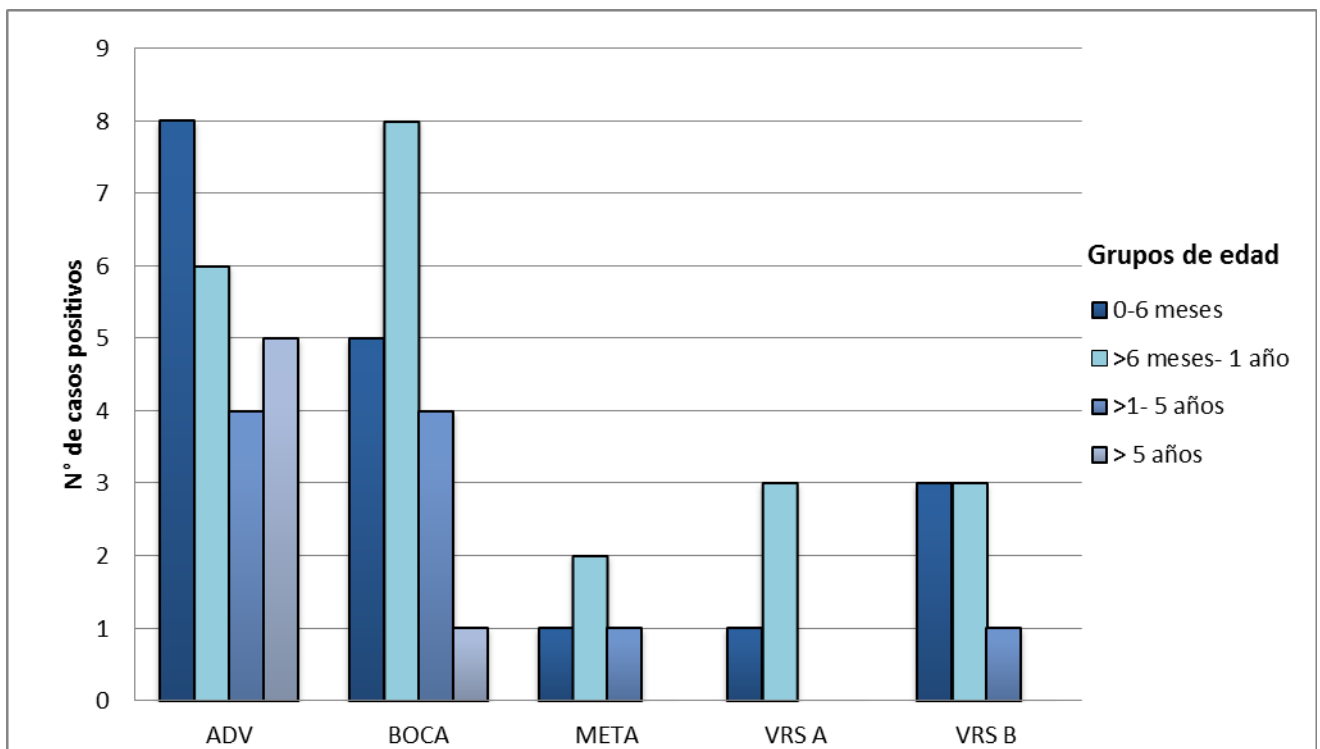


**Gráfico 2. Porcentajes de muestras positivas detectadas de las coinfecciones por la PCR para BRQ.**

## **5.2. Características epidemiológicas de los virus detectados**

### **5.2.1 Prevalencia de los virus según grupos de edad**

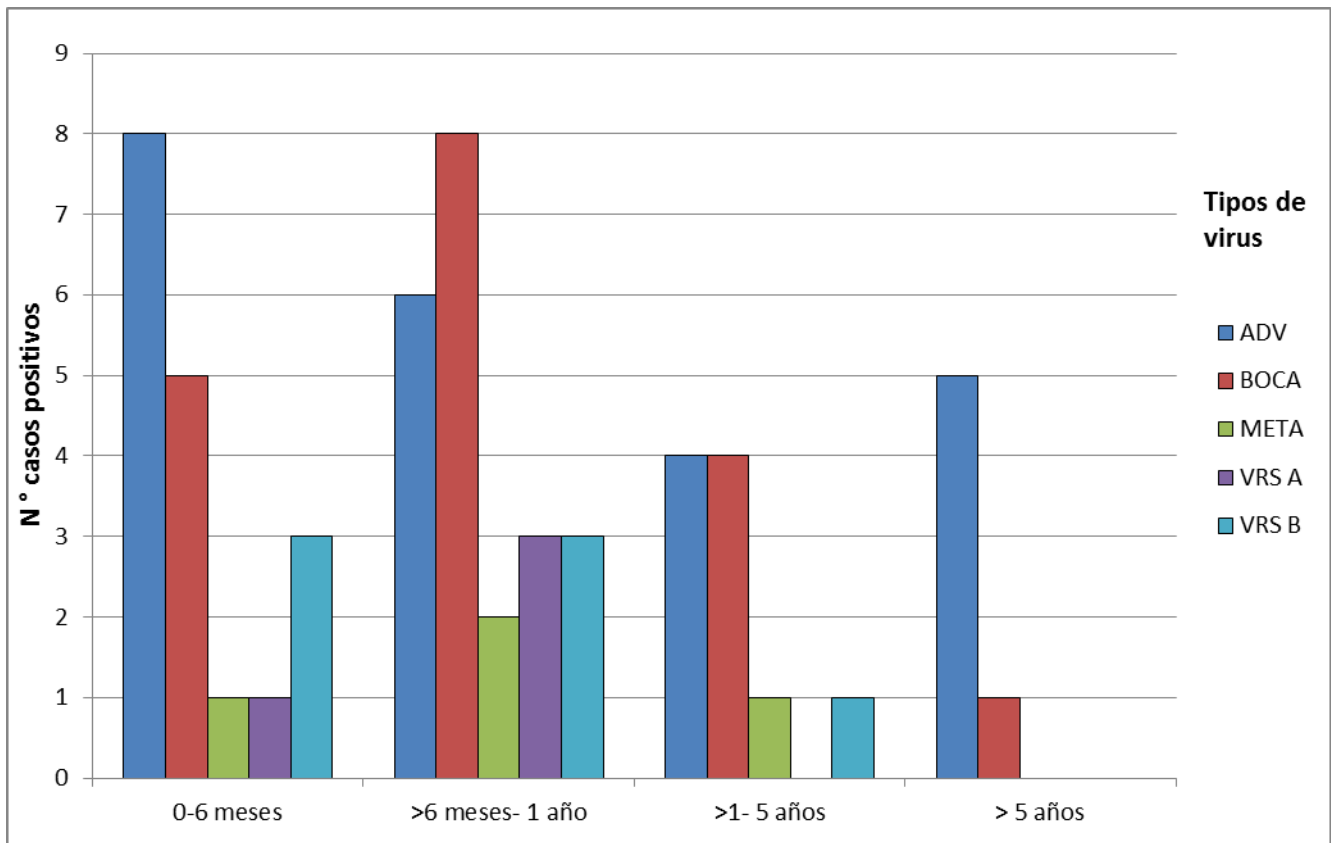
En el grupo de edad de 0-6 meses se obtuvieron 18 casos positivos, luego en el de >6 meses-1 año de edad 22 muestras positivas, siendo el grupo donde se encontraron un mayor número de casos positivos, a continuación el grupo de >1 año- 5 años 10 casos positivos y finalmente el de > 5 años 6 casos positivos. Según el test de Kruskal-Wallis de obtuvo un  $p=0,03$ , lo que nos indica que existiría una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos etarios analizados. (ver gráfico 3 y tabla anexa n°5)



**Gráfico 3. Número de casos positivos por grupos etarios detectados por PCR, a partir de muestras negativas a la IFI en ANF.**

### **5.2.2 Prevalencia de cada tipo viral según grupos de edad.**

Hubo una mayor prevalencia de ADV y BoVh en los 3 primeros grupos etarios analizados y la mayor circulación viral se detectó en el grupo de 6 meses-1 año de edad, este grupo es uno de los que concentra mayor número de niños, lo que explica en parte el mayor número de resultados. Según test de Dunn´s existe una diferencia estadística para ADV con los demás virus analizados en el grupo de 0-6 meses comparado con el grupo de mayores de 5 años y para BoVh la significancia estadística se da al compararlo con MpVh y VRSA en el grupo de 0-6 meses. Lo anterior significa que, entre estos grupos etarios los resultados obtenidos son significativamente distintos unos de otros para determinar qué grupo de edad se ve más afectado por los virus analizados ( $p=0.03$ ) (ver gráfico 4 y tabla anexa n°6)

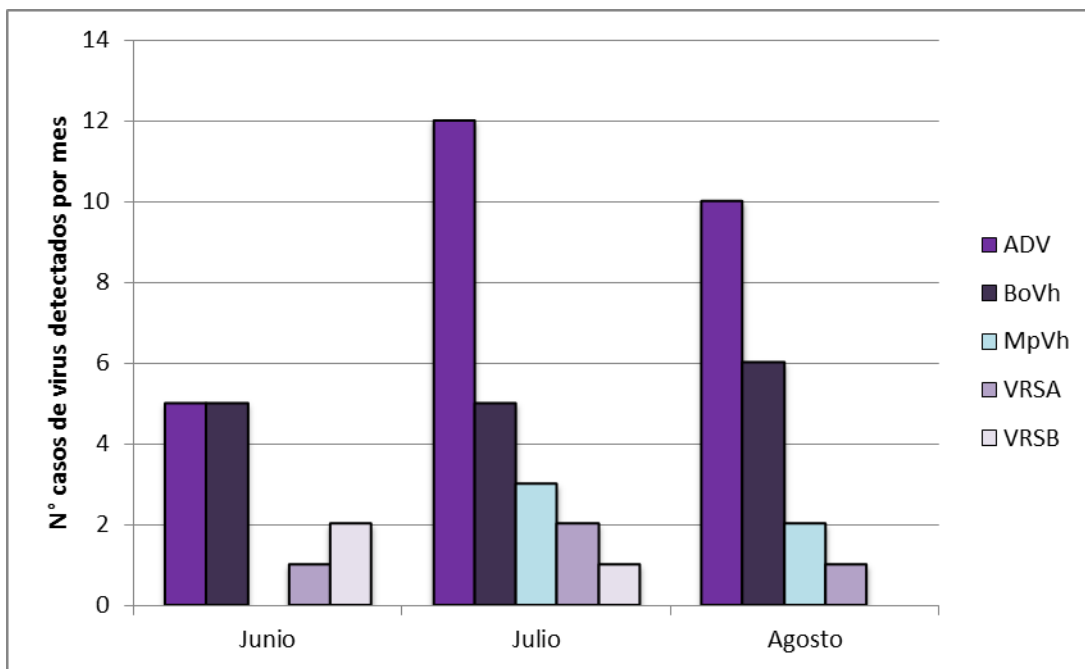


**Gráfico 4. Prevalencia de cada tipo de virus, según grupo de edad, detectados por PCR a partir de muestras negativas a la IFI en ANF.**

En el mes de julio en 23 casos no se disponía de la información de las edades de las muestras de estos, por lo tanto, no fue posible incluirlas en el análisis estadístico de las edades.

### **5.3 Virus detectados en los meses analizados.**

El ADV, se presenta en los 3 meses analizados en forma constante; BoVh y MpVh tienen una mayor circulación en los meses invernales de junio y julio pero a finales del mes de julio BoVh cae y se mantiene el MpVh, luego de bajar considerablemente la circulación de VRS. No hay significancia estadística entre los meses analizados y la circulación viral ( $p=0.3$ ) (ver gráfico 5 y tabla anexa n°8)



**Gráfico 5. Distribución de los virus respiratorios detectados por PCR, en muestras negativas a la IFI en ANF, durante el período de invierno del 2010.**

## 6. DISCUSIÓN

### 6. 1. Resultados falsos negativos

El objetivo principal de este estudio, fue detectar virus respiratorios del panel de BRQ (ADV, BoVh, MpVh, VRS A y B) mediante el uso de técnicas moleculares de Nested RT-PCR Múltiplex en muestras que, por la técnica de IFI del HCVB de Valparaíso, fueron negativas, esta última metodología incluye detección para los agentes ADV, VRS, PIV y Flu. Por lo tanto. Las muestras analizadas, en el Hospital fueron consideradas negativas para ADV y VRS.

Varios estudios, en los cuales se han comparado distintas variaciones en la técnica de IF y la RT-PCR en formato múltiple, validan la sensibilidad de ambas técnicas pero en distintos virus respiratorios, en la mayoría de los estudios que han utilizado IFD se describe una sensibilidad del 95% para la detección de VRS (PUC, 2012). Otros estudios han utilizado la PCR como técnica diagnóstica comparándola con la IFD y el cultivo Shell vial, en los cuales la PCR ha logrado aumentar en un 27,8% el diagnóstico de los resultados positivos.(Kuypers et al., 2006).

En el 2005, investigadores italianos, compararon los resultados obtenidos a través de la aplicación de 2 técnicas de detección viral, IFD y RT-PCR múltiplex. Este estudio arrojó una mayor sensibilidad a favor de la PCR, además de permitir la detección de una mayor cantidad de tipos de virus circulantes al mismo tiempo.(Caracciolo et al., 2008)

Los resultados obtenidos en nuestro estudio concuerdan con lo descrito en la literatura en relación a la utilidad de la técnica de PCR en formato múltiple como diagnóstico.

Del total de muestras analizadas (n=160), un 40.6% resultaron positivas a alguno o más de los agentes buscados sugiriendo que la técnica de IF, que está siendo utilizada por los centros asistenciales, presenta deficiencias al momento de entregar un diagnóstico certero, ya que estaría dejando muchos pacientes con

etiología desconocida. En un estudio realizado con muestras del HCVB en la primavera del año 2009 en el laboratorio de Virología de la Universidad de Valparaíso se analizaron 182 muestras negativas por IFI y de ellas 35.7% resultaron ser falsos negativos (n=65)(tesis Noguera M, 2010). Estos valores encontrados concuerdan con los resultados de este estudio, ya que el porcentaje que detectamos de casos positivos se asemejan a los encontrados en el año 2010, aunque los períodos de estudio son distintos.

## **6.2. Detección de virus respiratorios del panel de BRQ**

En este estudio se buscaron 4 tipos de virus respiratorios que producen bronquiolitis con la RT-PCR anidada múltiple. Se destaca la detección de un importante porcentaje de positividad para este panel de virus, lo que representa información diagnóstica y epidemiológica que antes no se tenía, por una parte se detectó en aquellas muestras, previamente diagnosticadas negativas por IFI, agentes que si estaban presentes, es el caso de VRS y ADV, y además, se detectó por primera vez en este tipo de muestras MpVh y BoVh, agentes que no se incluyen en el diagnóstico rutinario del Hospital. La técnica utilizada tiene una mayor especificidad y sensibilidad que la IFI, además que detecta más de un agente a la vez.

El ADV se encontró en 32/160 muestras analizadas que corresponde al 20% del total. En la hipótesis planteada en este estudio se postuló que un gran porcentaje de los falsos negativos corresponderían a ADV obteniéndose un 20% de positividad, el cual es un porcentaje importante que, por la IFI, queda sin diagnóstico y, supera notoriamente lo detectado en el período de primavera del 2009 en el que se obtuvo un 6.6% de positividad para ADV (Noguera M, 2010). Estos resultados validan lo que también han observado otros autores en que la IF no sería una técnica adecuada de *screening* en la pesquisa de ADV (Mejía & López, 2007).

Los autores describen la baja sensibilidad de la IF que no supera el 50% para ADV y subestiman la frecuencia detectada del ADV por IF (Murtagh,

2004). En Chile, la mayoría de los estudios realizados han sido por IF y de forma retrospectiva utilizando para el análisis de las muestras la técnica de PCR, aumentando de forma considerable los casos detectados de ADV que por la IF siguen quedando con etiología desconocida (Jofré, 2005).

En el caso del VRS se detectaron los tipos A y B en muy baja frecuencia 5/160 para VRSA y 9/160 para VRSB equivalente al 3% y al 5% respectivamente. Se podría confirmar que la sensibilidad de la IF para este virus es alta, ya que muy pocas muestras solo 14/160 quedaron negativas inicialmente por esta técnica, esto avalado también por otros estudios. En España en el año 1998 de 122 casos analizados con IRA un 82.5% fueron positivos solo para este virus utilizando la IF como técnica de detección (Orive et al., 1998). En otro estudio realizado en Francia también comparten esta conclusión (Freymuth et al., 2006).

La frecuencia de detección para el MpVh, fue 5/160 correspondiente al 3% del total de los casos analizados. Es importante mencionar que en este caso, no se puede comparar la sensibilidad de la IF con la técnica utilizada en este estudio ya que anteriormente este virus no forma parte del panel diagnóstico rutinario utilizado en el hospital.

En Brasil, el 2011 se realizó un estudio comparativo en 202 muestras respiratorias de niños menores de 5 años utilizando IFD y RT-PCR, de las 202 el 2% resultó positivo por IFD y el 4% por RT-PCR. Los resultados del estudio reflejan claramente que la técnica molecular posee una mayor sensibilidad por lo tanto, podemos decir que no sería recomendable usar la IF para su detección y validar la aplicación de RT-PCR, pero es importante mencionar que su detección no está implementada en todos los programas de vigilancia epidemiológica (Parmezan, et al, 2011). En Chile, solo en la PUC está incorporado el MpVh en los programas de vigilancia y aún se está validando el rol y la agresividad de este en las IR.

En nuestro estudio el BoVh se detectó en 25/160 muestras correspondiente a un 14% del total de los casos analizados para BRQ por la

Nested RT-PCR Múltiplex y en algunos casos se encontró coinfección de BoVh asociado a otros virus, es importante mencionar que BoVh no fue buscado anteriormente en el hospital. Los resultados obtenidos concuerdan con lo descrito en la literatura y otros autores, en que un porcentaje importante de casos queda con diagnóstico etiológico desconocido.

En Chile, durante el año 2007 se estudiaron 362 muestras de pacientes pediátricos con IR menores de 5 años junto a un grupo control de 16 pacientes asintomáticos utilizando la PCR. El BoVh se detectó en 79 de los 362 casos con IR correspondiente a un 21.8% del total y en 9 muestras del grupo control correspondiente a un 18.8% (Flores C et al., 2011). En este estudio las muestras solo fueron analizadas por PCR, concordando con otros estudios en que la prevalencia del BoVh va de 1.5% a 19% (Bastien, et al, 2006) siendo incluso mayor a lo reportado en nuestro estudio que es de un 14%, lo que nos permitiría destacar el rol patógeno del BoVh en las IRA.

### **6.3. Coinfecciones detectadas**

En los resultados obtenidos en este estudio y en otros similares se han encontrado en varios casos muestras infectadas con más de un virus, por lo que, la literatura de la etiología de las IR alude frecuentemente a la coinfección viral, que involucra principalmente al BoVh, VRS, ADV y MpVh, entre otros que no han sido analizados en este estudio. Los 10 casos con coinfección detectados que corresponden al 6.3% de los casos positivos, es comparable con el 9.2% (6 casos) encontrado en el del HCVB de Valparaíso en el 2010, aunque en distinto período (Noguera M, 2010).

En un estudio Coreano, la detección de BoVh fue de 58 casos en un 11.3%, y de ellos en 22 muestras el 37.9% se encontró infección con otros virus. Las infecciones mixtas encontradas fueron frecuentemente de BoVh junto a ADV, que correspondió el 37.1% de las coinfecciones (Choi et al., 2006).

En Chile se han realizado algunos estudios para la detección de BoVh, en los cuales se han obtenido resultados comparables al nuestro. De 256



muestras de ANF en 24.2% (62/256) se encontró BoVh, y de ellas un 26% (16/62) y un 74% (46/62) correspondieron a mono infección y coinfección, respectivamente (Moreno et al., 2009). La presencia en la vía aérea de BoVh junto a otros virus, se puede deber a una infección primaria que necesite la presencia de otro agente en forma simultánea para producir sintomatología, explicando el alto porcentaje de coinfección en la mayoría de los casos analizados.

Los casos anteriores respaldan lo obtenido en nuestro estudio, en que las coinfecciones con BoVh se encontraron en 9.2% y 4.6% de los casos con VRS y ADV, respectivamente. Podemos decir que, debido a la cantidad de casos en los que se asocia coinfección del BoVh, su rol como agente etiológico respiratorio podría ser cuestionable y no necesariamente ser responsable de la enfermedad, sino necesitar de otro patógeno que sea desencadenante y actuar como virus silente aumentando los síntomas de la enfermedad respiratoria base.

Para el caso del MpVh, no se encontró coinfección con VRS como lo describe la literatura y otros estudios; esto se puede deber al período estudiado además que solo el 8% (14/160) y el 3% (5/160) fueron positivos para VRS y MpVh, respectivamente. En el estudio anterior en el HCVB realizado de agosto del 2009 a enero del 2010 la presencia de MpVh fue de un 18.1% mucho mayor al encontrado en este estudio además de detectarse en 4.6% de los casos de coinfección (Noguera M, 2010). Se describe en la literatura un estudio realizado el año 2010 que demostró la presencia de VRS y MpVh en 21.9% (9/41) de un total de 110 casos analizados (Martínez et al., 2012). La presencia de co-infección no se relacionó con una mayor gravedad en la evolución clínica, aunque estudios sugieren que la co-infección viral es responsable de enfermedades respiratorias de curso más grave. (Martínez et al., 2012).

Según la literatura médica internacional la frecuencia de co-infecciones varía de un 17 a un 35%, dependiendo de las pruebas diagnósticas y la metodología utilizada para detectar la etiología viral. La detección múltiple de virus respiratorios aumenta al utilizar pruebas de diagnóstico molecular, demostrándose

que el uso de la PCR ha mejorado sustancialmente la detección de patógenos respiratorios. (Martínez et al., 2012)

#### **6.4. Relación entre el rango de edad y los virus detectados**

Según los grupos de edad analizados, existiría una significancia estadística ( $p=0.03$ ), en los distintos rangos de edad escogidos para analizar. Existiría diferencia entre: ADV comparado con MpVh, BoVh y VRS en los grupos de 0-6 meses y mayor a 5 años; BoVh comparado con MpVh y VRSA en el grupo de 0-6 meses.

El 61,5% del total de los casos positivos detectados en nuestro estudio se obtuvo en niños menores de un año, coincidiendo con lo descrito en la literatura y en otros estudios donde se afirma que los lactantes, son el grupo etario más afectado por las IRAB causadas por virus. Por ello, los estudios epidemiológicos de etiología viral son enfocados en infantes menores de 5 años, de preferencia desde recién nacidos.

Para ADV, a pesar de que la mayor cantidad de casos se concentra en menores de un año (14 casos), no hubo una diferencia significativa entre los grupos etarios analizados respecto a los casos detectados. Estos resultados coinciden con lo que afirman los autores que el ADV afecta en general a todos los infantes desde el primer año de vida hasta la etapa escolar. Según el estudio del año 2009, en el HCVB el ADV estuvo presente desde recién nacidos hasta los 18 años, con una distribución similar (Noguera M, 2010). En Argentina el ADV, tiene una frecuencia del 2.5 al 2.7% en infantes hospitalizados (Murtagh, 2004), se asocia con las bronquiolitis y neumonía en un 14.3 a 34% en el mismo grupo de edad (Videla, et al., 1999). En México, el ADV se encontró en un 22% de 118 casos analizados por IF y de ellos el 81% de los casos correspondió a lactantes y niños menores de 5 años. (López & Martínez, 2007), en Uruguay se detectó ADV en 28 niños menores de 2 años hospitalizados por IRAB (Dalmás et al., 2003) y en Chile la prevalencia del ADV en lactantes y preescolares, es del 3 a 5% en ese grupo etario (Palomino & Avendaño, 2008)

Según lo descrito anteriormente y lo obtenido en este estudio se estima que en Argentina, Chile y Uruguay, el ADV es el virus más frecuente identificado luego del VRS, (Dalmás et al., 2003).

Para MpVh la detección fue baja comparada con los otros virus, pero si coincide con la descripción del rango etario para MpVh que se concentra en lactantes y niños menores de 3 años, según lo descrito el 2009 en el HCVB, la mediana de los casos detectados fue de 10 meses (Noguera M, 2010) y en el nuestro fue de 8 meses. En Santiago de Chile el 2003, se obtuvo un 5.4% de casos con la presencia de MpVh que habían sido negativas para otros virus en pacientes hospitalizados por IRAB menores de 2 años (Luchsinger F et al., 2005), en Chile su detección varía de 5.4 a 12% en muestras respiratorias principalmente de lactantes (Jofré M, 2005).

Durante el año 2012, en Japón se detectaron 43 casos positivos para MpVh (8,6%) en muestras de pacientes de menos de 3 años de edad (Yoshioka et al., 2012). En Italia del 2006 al 2007 se detectó MpVh en 6.4% (9) en pacientes menores de 13 años, con una media de 2.5 años (Fabbiani et al., 2009).

Para el BoVh, los resultados encontrados coinciden con los descritos por los autores concentrando la mayor cantidad de casos en niños entre 6 meses y 5 años de edad, con un 14% de casos detectados en total, aunque la prevalencia en lactantes menores de 6 meses fue mayor que en el grupo de 6 meses y un año de edad. Flores y col. el 2011 detectaron BoVh en 21.8% de niños con IRA entre 6 meses y 2 años de edad (Flores C et al., 2011). La incidencia va de 1.5 a 18.3%, de preferencia en lactantes. El 2007 su detección fue de 14% y 37.5% en pacientes con y sin sintomatología respectivamente, en menores de 5 años (Moreno et al., 2009).

En Dinamarca, se encontró en muestras de pacientes en promedio de 10 meses de edad en un 8.2% de los casos con IRA y 8.6% de los pacientes asintomáticos (Von Linstow, et al, 2008), en España en 14.7% en muestras de niños desde 12 meses a 2 años hospitalizados por IRA (Calvo et al., 2010).

Los estudios nombrados anteriormente, respaldan nuestros resultados en cuanto a que la prevalencia del BoVh se da principalmente en pacientes con alguna afección respiratoria que puede ir desde recién nacidos hasta pasados los 5 años de edad, aunque se concentra principalmente a partir de los 6 meses hasta 2 a 3 años de edad, en este estudio no queda claro del todo, ya que precisamente ese rango etario no fue escogido para su análisis, pero si coincide con la literatura al sumar los resultados desde los 6 meses a los 5 años. Entonces podríamos decir que, el BoVh parece ser un virus respiratorio que infecta principalmente a edades tempranas, antes de los dos años, produciendo respuesta una inmune que podría proteger en edades mayores (Moreno et al., 2009).

Múltiples estudios epidemiológicos han demostrado que al menos la mitad de los niños ha tenido una infección por VRS desde recién nacido o durante su primer año de vida, y casi el 100% al cumplir los 2 años(PUC, 2012). Los resultados de nuestro estudio se puede correlacionar con los anteriores, ya que, el 92% de los casos en que se detectó VRS fue en recién nacidos hasta un año de edad, de ellos 3 y 3 niños tenían VRSA y VRSA, respectivamente, en el rango de >6 meses-1 año y, 3 tenían VRSA y 1 VRSA en el rango de 0-6 meses de edad.

En Chile, el 2002 se detectó VRS en un 52.7% utilizando muestras de niños menores de 2 años de edad, (Avendaño et al., 2003) en la mayoría de los estudios el VRS es el que registra una mayor prevalencia en lactantes hasta niños de 3 años, resultados comparables a los obtenidos en nuestro estudio. Del 1996-2000, se pretendía diferenciar la circulación entre las cepas virales A y B con lactantes menores a un año, y se observó una tendencia de predominio de A en lactantes de 3.5 meses y de B para 4 meses, concluyéndose que no hubo una diferencia clara de predominancia de la cepa viral en un grupo etario determinado (Palomino M., et al, 2004). En el caso de nuestro estudio, que no se haya detectado ningún caso de VRSA en el grupo de 0-6 meses, se atribuye al tamaño de la muestra.

## **6.5. Virus detectados en los meses analizados**

La circulación viral observada en este estudio en los meses de junio, julio y agosto es comparable con lo descrito por otros autores, afirmando que los 4 tipos virales analizados son responsables en distinto orden de prioridad de las Bronquiolititis y Neumonías, que se dan con mayor frecuencia en los meses de invierno. El ADV se encontró en una alta circulación en los meses de julio y agosto, siendo la mitad de los casos en junio, BoVh se observó con la misma frecuencia durante los 3 meses, el MpVh tuvo un mayor predominio en el mes de julio y el VRS se observó en los meses de junio y julio, lo que coincide con la literatura y estudios previos.

En el año 2008 en la región Metropolitana el VRS tuvo su máxima actividad en el mes de julio, en La Serena en junio se registraron alrededor de 30 casos y el peak fue en julio con más de 85 casos, en Valparaíso menos de 25 casos en junio, en Viña del Mar 55 y 90 casos en junio y julio respectivamente. En todo el país, el 2010 se detectaron 967, 2475 y 1050 casos en los meses de junio, julio y agosto respectivamente (ISP Chile,2003). Estos datos se condicen con nuestros resultados obtenidos para el VRS, que tiene un peak de circulación en el mes de julio en pleno invierno cuando más aumentan las IRA, afirmando que tiene su máxima actividad durante la época de invierno.

La circulación del ADV, en el 2008 fue de 1.2 mayor a 3.5 (n° de casos) casos en junio y julio, respectivamente en La Serena; en Valparaíso se detectaron 2.5 y 0.5 casos en junio y julio en Viña del Mar 18 en junio y 13 en julio. La circulación obtenida de ADV en nuestro estudio es regular en los 3 meses analizados, aunque con un aumento en julio y agosto del 2010 y coincide con la literatura en que se observa a fines de invierno principalmente y durante todo el año (López & Martínez, 2007) pero en general circula durante todo el año según lo descrito el 2009 en el HCVB (Noguera M, 2010).

Para el caso del MpVh, su circulación en este estudio se vio en julio que coincide con el inicio de su presentación en los meses invernales pero no

podemos decir más, ya que el peak de MpVh se da principalmente en los meses de primavera los cuales no fueron analizados. El 2004, según la vigilancia epidemiológica de la Universidad Católica en Santiago de Chile, en los meses de julio se detectaron alrededor de 3 casos aumentando en los meses de agosto y septiembre hasta 10 por mes (PUC, 2012), durante el 2003 los casos detectados en Santiago son similares al 2004, partiendo con 2 casos en julio y 5 en septiembre (Luchsinger F et al., 2005), según el estudio del 2009 en el HCVB, en octubre se detectó la mayor circulación de MpVh (Noguera M, 2010), por lo tanto, la baja circulación de MpVh detectada en este estudio se debe a, que en el período analizado existe una baja circulación, según lo que describen la mayoría de los autores en la literatura.

En la circulación detectada de BoVh no existe mayor diferencia entre los 3 meses analizados, aunque si se puede correlacionar atribuyéndole una mayor circulación en los meses de invierno, ya que, el 2007 en Chile se estudió su presentación de marzo a noviembre y se detectó principalmente en los meses de junio y julio con una prevalencia del 75% (Flores C et al., 2011), pero en el estudio del HCVB el 2009, su circulación se detectó durante todo el período de estudio con un aumento en septiembre (Noguera M, 2010).

En los estudios epidemiológicos y las pruebas de *screening* utilizadas para la detección de los virus respiratorios, influyen múltiples factores para determinar el virus circulante. Es importante destacar que el avance de la tecnología nos permite ir desarrollando técnicas de mayor sensibilidad y especificidad, y así disminuir cada vez más el error en el diagnóstico de las enfermedades respiratorias.

## 7. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos concuerdan con lo propuesto por otros autores en que, un gran porcentaje de muestras respiratorias a las que se les realiza IFI, quedan con etiología desconocida ya que son diagnosticadas como negativas.
2. La técnica de la PCR en formato múltiple, nos permitió aumentar el porcentaje de detección para ADV, similar a los resultados obtenidos en el estudio del año 2009 en el mismo hospital.
3. En cuanto a la presencia de MpVh, no se detectó una alta circulación, probablemente, debido a que el período analizado es previo al brote de este virus según lo descrito en la literatura.
4. Para el BoVh, se destaca su circulación durante el período analizado concordando con estudios previos donde se ha detectado en los meses invernales y en menores de 2 años y entre 2 y 5 años. También concuerdan con la descripción de coinfecciones, ya que se encontró en la mayoría de las muestras que se encontraban infectadas con más de un virus.
5. Se destaca la utilidad de la técnica de PCR formato múltiple en el diagnóstico de virus respiratorios, ya sea de aquellos tradicionalmente buscados como aquellos emergentes, pues de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio y otros, se puede concluir que se logra detección de agentes importantes en las IRA que, por otras metodología, no son buscados o tienen una sensibilidad limitada

## 8. REFERENCIAS

- Abara, S. (2006). *Metapneumovirus humano: un nuevo agente en IRA alta y baja*. Neumología Pediátrica 1(1), 11–3.
- Abreu T., Eiros, J., Bermejo-Martín, J. y Ortiz de Lejarazu, R. (2011). *Comparison of a shell vial and a multiple PCR technique in the diagnosis of viral respiratory infections*. Enfermedades Infecciosas Microbiológicas Clínicas; 29(4): 313–319.
- Aguirre C. A. (2006). *Human bocavirus: a new respiratory virus*. Iatreia, 19(1), 71–76.
- Avendaño L., Ferrés M., & Spencer E. (2011). *Virología Clínica* (1° ed.). Mediterráneo. Santiago, Chile.
- Avendaño L., Parra V., Padilla V., & Palomino M., (2003). *Impacto en salud infantil del invierno 2002: disociación entre factores ambientales y virus respiratorio sincicial, en Santiago*. Revista Médica de Chile 131(8), 902–908.
- Bastien N., Brandt K., Dust K., Ward D., & Li Y. (2006). *Human Bocavirus infection, Canada*. Emerging infectious diseases, 12(5), 848-850.
- Broor S., Bharaj, P., & Chahar, H. S. (2008). *Human metapneumovirus: a new respiratory pathogen*. Journal of Biosciences, 33(4), 483–493.
- Brooks G., Butel J., Morse S. (2005). *Microbiología Médica*. (23° ed). Manual moderno. Ciudad de México, México.
- Calicó I., Lowak M., Bas A., Betbesé M., Fuentes F., & Loaiza N. (2009). *Estudio comparativo de inmunofluorescencia directa, enzimo-inmunoanálisis y cultivo para el diagnóstico de las infecciones por metapneumovirus humano*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 27(6), 322–325.
- Calvo C., Pozo F., García L., Sanchez M., Lopez M., Pérez P., & Casas, I. (2010). *Detection of new respiratory viruses in hospitalized infants with*



*bronchiolitis: a three-year prospective study.* Acta Paediatrica, 99(6), 883–887

- Caracciolo S., Minini C., Colombrita D., Rossi D., Miglietti N., Vettore E., Fiorentini, S. (2008). *Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with acute respiratory tract disease: virologic and clinical features.* The Pediatric Infectious Disease Journal, 27(5), 406-412.
- Choi H., Lee J., Kim J., Eun W., Kim H., Lee A., Sung Y., (2006). *The Association of Newly Identified Respiratory Viruses with Lower Respiratory Tract Infections in Korean Children, 2000–2005.* Clinical Infectious Diseases, 43(5).
- Coiras T., Aguilar C., García L., Casas I., & Pérez-Breña P., (2004). *Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays.* Journal of Medical Virology, 72(3), 484-495.
- Dalmás S., Pereyra L., Pérez C., Mateos S., Varela A., Chiparelli H., Ferrari A. (2003). *Infección respiratoria aguda baja por adenovirus en niños hospitalizados menores de dos años.* Archivos de Pediatría del Uruguay, 74(1), 15-21.
- Eiros Bouza, J. M., Ortiz de Lejarazu Leonardo, R., Tenorio Abreu, A., Casas, I., Pozo, F., Ruiz, G., & Pérez Breña, P. (2009). *Diagnóstico microbiológico de las infecciones virales respiratorias.* Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 27(3), 168–177.)
- Fabbiani M., Terrosi C., Martorelli B., Valentini M., Bernini L., Cellesi C., & Cusi M. G. (2009). *Epidemiological and clinical study of viral respiratory tract infections in children from Italy.* Journal of Medical Virology, 81(4), 750–756.
- Flores C, Vizcaya A., Araos B., Montecinos P., Godoy M., Valiente F., Ferrés., M. (2011). *Bocavirus humano en Chile: características clínicas y epidemiológicas en niños con infecciones respiratorias.* Revista Chilena de Infectología, 28(6), 504-511.

- Freytmuth F., Vabret A., Cuvillon-Nimal D., Simon S., Dina J., Legrand L., Brouard J., (2006). *Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness*. Journal of Medical Virology, 78(11).
- ICTV. (2011). Discussion forum and file distribution for the International Committee on Taxonomy of Viruses master .Archivos. ICTV master species list 2011 actualizado.  
[http://talk.ictvonline.org/files/ictv\\_documents/m/msl/4090.aspx](http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/4090.aspx).
- ISP Chile. (2003). Instituto de Salud Pública de Chile. Sección Virus Respiratorios y Exantemáticos. *Vigilancia integrada Sarampión-Rubéola*. Consultado [3.12.11]. Disponible en: [www.ispch.cl/seccion-virus-respiratorios-y-exantematicos](http://www.ispch.cl/seccion-virus-respiratorios-y-exantematicos).
- Jofré M. Leonor. (2005). *Virus respiratorios emergentes*. Revista de Neumología Pediátrica. 24, 130-134.
- Kuypers J., Wright N., Ferrenberg J., Huang M., Cent A., Corey L., & Morrow R. (2006). *Comparison of Real-Time PCR Assays with Fluorescent-Antibody Assays for Diagnosis of Respiratory Virus Infections in Children*. Journal of Clinical Microbiology, 44(7)
- Lam Y., Yeung C., Tang, W., Chan C., Hui M., & Chan S., (2007). *Rapid Multiplex Nested PCR for Detection of Respiratory Viruses*. Journal of Clinical Microbiology, 45(11), 3631-3640.
- López H., Martínez I., (2007). *Adenovirus aislados de pacientes mexicanos con infección respiratoria aguda*. Revista Biomédica, 18 (3), 146-152.
- López M., Kuszniarz G., Imaz M., Cociglio R., Tedeschi F., & Zalazar F., (2006). *Metapneumovirus humano (MpVh) asociado con exacerbación de asma aguda bronquial severa*. Revista Argentina de Microbiología, 38(3), 140-142.
- Lozano J., Yáñez L., Lapadula M., Lafourcade M., Burgos F., Herrada L., Budnik I., (2009). *Infección por metapneumovirus humano en niños hospitalizados por una enfermedad respiratoria aguda grave: Descripción clínico-*

- epidemiológica*. Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias, 25(4), 211-217.
- Luchsinger V., Escobar C, & Avendaño L., (2005). *Detección de metapneumovirus humano en niños hospitalizados por infección respiratoria aguda baja en Santiago, Chile*. Revista Médica de Chile, 133(9), 1059–1064.
- Lynette Pei-Chi Shek, & Bee-Wah Lee. (2003). *Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics*. Paediatric Respiratory Reviews 4, 105–111.
- Maffey A., (2008). *Nuevos virus asociados a infecciones respiratorias en niños*. Archivos Argentinos de Pediatría. 106(4), 341-350.
- Mateos S, (2005). *Virus respiratorios. Temas de bacteriología y virología médica*. Serie de Monografías Instituto de la Higiene. Uruguay.25. 427-449.
- Martínez P., Cordero J., Valverde C., Unanue N., Dalmazzo R., Piemonte P., Torres J., (2012). *Co-infección viral respiratoria en niños hospitalizados por infección respiratoria aguda y su impacto en la gravedad clínica*. Revista Chilena de Infectología, 29(2), 169-174.
- Mathew K., Van Holde, K., & Ahern K.,(2003).*Bioquímica*3° ed. Prentica Hall. España.
- Moreno M., Solís O., &ORyan G. (2009). *Bocavirus humano: Estudios en la literatura médica y en Chile*. Revista Chilena de Infectología, 26(6), 504–510.
- Murtagh P., Álvarez A., (2004). *ADENOVIRUS, su importancia clínico-epidemiológica en las infecciones respiratorias bajas de nuestro medio*. Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires., Revista del Servicio de Neumología Hospital Nacional de Pediatría.
- Noguera M. (2010). *Estudio etiológico Prospectivo de los Virus Respiratorios en el Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso 2010*. Tesis Universidad de Valparaíso, Valparaíso.
- OMS. (2009). Organización Mundial de la Salud. Sección: *Temas de Salud Infecciones del tracto respiratorio. Infecciones Respiratorias Agudas*.

Consultado [12.10.12]. Disponible en:  
[www.who.int/vaccine\\_research/diseases/ari/en/index2.html#vaccine](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index2.html#vaccine).

Orive P., Casado Flores J., García T., Rodríguez A., Quiroga E., & Cambra F., (1998). *Infecciones respiratorias agudas en unidades de cuidados intensivos pediátricos. Estudio prospectivo multicéntrico. An Esp Pediatr*, 48(2), 138–42.

Palomino MA., Avendaño LF., (2003) *Infecciones respiratorias por VRS y adenovirus en Chile: que hemos aprendido en 14 años de vigilancia epidemiológica. Revista Chilena de Pediatría, Santiago 2003; 46: 38-47.*)

Palomino M., Larenas J., Moraga G., & Avendaño C. (2004). *Severidad clínica de la infección respiratoria aguda baja primaria por virus respiratorio sincicial grupos A y B. Revista Chilena de Pediatría, 75, 18-24.*

Parmezan N., Pasternak J., Dezene P., Martino V., & Souza V. (2011). *Comparative study of human metapneumovirus detection by PCR and direct immunofluorescence methods. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 47(4), 427-430.*

Pinto M, (2007). *Virus respiratorio sincicial, aún un misterio. Revista Médica Clínica Las Condes, 18(2), 155-164.*

PUC. (2012). Pontificia Universidad Católica. Vigilancia Epidemiológica de Virus respiratorios. Visitado 26.9.12. Disponible en: [http://virus.med.puc.cl/virus\\_respiratorios/bienvenida.html](http://virus.med.puc.cl/virus_respiratorios/bienvenida.html).

Sandin, M. D. (2008). *Métodos de estudio y diagnóstico viral. Hipertextos del área de la biología Argentina.*

Valdés J., & Pariasca N., (2010). *La presencia de bocavirus humano podría asociarse a una mayor duración de los síntomas de las infecciones respiratorias agudas en niños. Evidencias en Pediatría, 6(3), 12.*

Videla C., Carballal G., & Kajon A. (1999). *Genomic analysis of adenovirus isolated from Argentinian children with acute lower respiratory infections. Journal of Clinical Virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 14(1), 67-71.*

- Von Linstow L., Høgh M., & Høgh B. (2008). *Clinical and epidemiologic characteristics of human bocavirus in Danish infants: results from a prospective birth cohort study*. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(10), 897–902.
- Weissenbasher, C., Ávila, W., Benguigui, Y., Antuñano, F., Schmunis, G., & Yunes, J. (1997). *Los virus como causa de IRA alta y baja en niños: Características generales y diagnóstico*. *Infecciones respiratorias en niños*. OPS/OMS, 85.
- Yoshioka, M., Ishikawa Y., Ikeda T., Shimizu T., Noda M., & Kimura H. (2012). *Epidemiological analysis and clinical study of pediatric human metapneumovirus detected in patients with acute respiratory infection*. *KansenshogakuZasshi*, 86(6), 755-762.

## ANEXOS

### Tablas de datos

Tabla N° 1. N° de cada tipo virus detectados.

VIRUS	MONOINFECCIÓN	COINFECCIÓN	TOTAL
ADV	27	5	32
BoVh	16	9	25
MpVh	5	0	5
VRSA	4	1	5
VRSB	3	6	9
POSITIVAS	55	10	65
NEGATIVAS	95	-	95

**Tabla N° 2.N° de muestras positivas detectadas en las 160 muestras analizadas por PCR.**

<b>Resultados</b>	<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>	<b>Total</b>
N° enteros	65	95	160
%	40.6	59.3	100

**Tabla N°3. N° de casos positivos detectados por PCR, a partir de muestras negativas a IFI en ANF.**

<b>ADV</b>	<b>BOCA</b>	<b>META</b>	<b>VRS A</b>	<b>VRS B</b>	<b>COINFECCIÓN</b>
32	25	5	5	9	10

**Tabla N°4. Porcentajes de muestras positivas detectadas de las coinfecciones por la PCR para BRQ.**

<b>Tipo de CI</b>	<b>N° entero</b>	<b>%</b>
VRSB/BoVh	5	7,69
ADV/BoVh	3	4,62
ADV/VRSA	1	1,54
ADV/BoVhA/VRSB	1	1,54
Monoinfección	55	84,62
<b>TOTAL</b>	<b>65</b>	<b>100</b>

**Tabla N° 5. N° de casos positivos por grupos etarios detectados por PCR, a partir de muestras negativas a la IFI en ANF.**

<b>Virus / Grupos de edad</b>	<b>ADV</b>	<b>BOCA</b>	<b>META</b>	<b>VRS A</b>	<b>VRS B</b>
<b>0-6 meses</b>	8	5	1	1	3
<b>&gt;6 meses- 1 año</b>	6	8	2	3	3
<b>&gt;1- 5 años</b>	4	4	1	0	1
<b>&gt; 5 años</b>	5	1	0	0	0

**Tabla N° 6. Prevalencia de cada tipo de virus, según grupo de edad, detectados por PCR a partir de muestras negativas a la IFI en ANF.**

<b>Grupos de edad / Virus</b>	<b>0-6 meses</b>	<b>&gt;6 meses - 1 año</b>	<b>&gt;1 – 5 años</b>	<b>&gt;5 años</b>
<b>ADV</b>	8	6	4	5
<b>BoVh</b>	5	8	4	1
<b>MpVh</b>	1	2	1	0
<b>VRSA</b>	1	3	0	0
<b>VRSB</b>	3	3	1	0



**Tabla N° 7. N° de muestras positivas detectadas por grupos de edad y N° de casos totales analizados por grupos de edad**

<b>Grupos de edad</b>	<b>0- 6 Meses</b>	<b>&gt;6 Meses- 1 año</b>	<b>&gt;1 - 5 años</b>	<b>&gt; 5 años</b>
<b>N ° Casos</b>	<b>18</b>	<b>22</b>	<b>10</b>	<b>6</b>
<b>N ° muestras por grupos de edad</b>	<b>48</b>	<b>49</b>	<b>25</b>	<b>15</b>

**Tabla N° 8. Distribución de los virus respiratorios detectados por PCR en los meses de junio, julio y agosto del 2010.**

<b>Virus / Meses</b>	<b>Junio</b>	<b>Julio</b>	<b>Agosto</b>
<b>ADV</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>10</b>
<b>BoVh</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>MpVh</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
<b>VRSA</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>VRSB</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>Coinfección</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>1</b>

## PROTOSCOLOS

### Protocolo de extracción de ADN para su uso en la técnica de PCR sugerido por Biomerieux Inc.

Reactivos necesarios:

- Nuclisens – Lysis Buffer (inicio)
- Nuclisens – Magnetic Extraction Reagents (Kit lavado)

Proceso:

- Centrifugar Buffer de Lysis (2500 rpm x 1 min).
- Agregar 500 µL de muestra con 500 µL de Buffer de Lysis. Agitar en un Vortex y dejar 10 min.
- Agregar 50 µL de sílice al tubo con la muestra. Agitar en un vortex y dejar 10 min.
- Centrifugar 2 min a 3000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante (utiliza sílice precipitado que tiene pegado el DNA)
- Ocupar kit de lavado y aparato Minimag.
- Agregar 400 µL Wash Buffer 1 al tubo con la sílice y pasar la muestra a los tubos del Minimag. Dar 30 vueltas. Eliminar sobrenadante. Repetir lavado con Wash Buffer 1.
- Agregar 500 µL Wash Buffer 2, dar 30 vueltas. Eliminar sobrenadante. Repetir lavado Wash Buffer 2.
- Agregar 500 µL Wash Buffer 3, dar 15 vueltas. Eliminar sobrenadante.
- Agregar 25 µL del Buffer de elución.
- Llevar al Termociclador a 60° C, 1400 rpm x 5 min (al agitar y aumentar la temperatura el ADN se suelta de la sílice y queda en el eluido).
- Extraer los 25 µL de eluido y almacenar la muestra a -80°C hasta su utilización.

[<http://www.biomerieux-usa.com/servlet/srt/bio/usa/home>].

**Protocolo de amplificación de material genético. Utilizado en la Técnica de Nested RT-PCR Múltiplex para BRQ. (Estandarizado en el Laboratorio de Virología de la Universidad de Valparaíso).**

**RT-PCR Múltiplex 1° Amplificación (BRQ1)**

<b>Reactivos</b>	<b>1X(ul)</b>
H2O	9
2X	25
RSVAB 1+	1(1/10)
hMpv 1+	1(1/10)
BocV 1+	1(1/10)
ADV 1+	2(1/10)
RSVAB 1-	1(1/10)
hMpv 1-	1(1/10)
BocV 1-	1(1/10)
ADV 1-	2(1/10)
AMV	1

Volumen final 45ul (mix)+ 5ul extracto = 50ul

Programa PCR : BRQ 1

45°C x45' + 95°C x15' + 45 x(95°C x30''+53°C x2' +72°C x30'') /72°C x5' /4°C ON

## Nested PCR Múltiplex 2° Amplificación (BRQ2)

Reactivos	1X(ul)
H2O	23.9
5X	10
dNTPs	0.4 (c/u)
RSVA 2+	1 (1/10)
RSVB 2+	1(1/10)
hMpv 2+	1(1/10)
BocV 2+	1(1/10)
ADV 2+	2(1/10)
RSVA 2-	1(1/10)
RSVB 2-	1(1/10)
hMpv 2-	1(1/10)
BocV 2-	1(1/10)
ADV 2-	2(1/10)
Taq	0.5

Volumen final 48ul (mix)+ 2ul extracto = 50 ul

Programa PCR : BRQ 2

94°C x2' + 35°C x (94°C x30''+53°C x1' +72°C x30'') /72°C x5' /4°C ON

**Gel de agarosa al 2% para el revelado en la cámara de la electroforesis**

Gel Agarosa : 1.5 gr

Buffer TBE : 50 ul

Gel red (agente intercalante): 2ul

