

## DIAGNOSTICO RAPIDO POR INMUNOFLUORESCENCIA EN NIÑOS HOSPITALIZADOS POR INFECCION RESPIRATORIA AGUDA (IRA)

INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE, EPIDEMIOLOGIA  
Y MICROBIOLOGIA

Lic. Marité Bello Corredor,\* Dr. Angel Goyenechea  
Hernández,\*\* Téc. Maria Teresa Pérez Guevara,\*\*\*  
Téc. Olvido E. Díaz Rosa,\*\*\* Dra. Adays García  
Linares\*\*\*\* y Dr. Roberto Zayas Mujica\*\*\*\*

### RESUMEN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) de origen viral, son causas frecuentes de hospitalización durante los 2 primeros años de vida. Para el diagnóstico rápido de estas infecciones se utilizan anticuerpos conjugados con fluoresceína contra los principales virus respiratorios. Se estudiaron 110 exudados nasofaríngeos procedentes de niños menores de 2 años, ingresados en 4 hospitales pediátricos de Ciudad de La Habana, con diagnóstico de IRA, en el periodo de enero de 1987 a septiembre de 1988. Las muestras se trasladaron en frío al laboratorio, donde se procesaron para el diagnóstico por inmunofluorescencia (IF) por el método directo, con anticuerpos conjugados de virus sincitial respiratorio (RS), Adenovirus, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2 y Parainfluenza 3. Los resultados obtenidos arrojaron 40 muestras positivas que representan el 36.4 %, de las cuales la mayor incidencia correspondió al virus RS. La positividad a los diferentes agentes se muestra en las tablas.

- 
- \* Licenciada en Microbiología. Investigadora Agregada. Laboratorio de Virus Respiratorio. INHEM.
  - \*\* Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Titular. Jefe del Laboratorio de Virus Respiratorio. INHEM.
  - \*\*\* Técnicos Sanitarios "A". Laboratorio de Virus Respiratorio. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología.
  - \*\*\*\* Residente de Pediatría. Hospital Pediátrico Docente "Centro Habana".

## INTRODUCCION

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) que afectan a la población infantil, son frecuentemente de causa viral y en ocasiones originan hospitalización en los primeros años de vida. Dentro de los agentes virales responsables de estas infecciones tenemos el virus Sincital Respiratorio (RS), patógeno fundamental de las vías respiratorias en los lactantes,<sup>1,2</sup> los Adenovirus, los virus Influenza y los Parainfluenza, todos causantes de bronquiolitis, laringitis, bronconeumonía y neumonía en los niños pequeños.<sup>1</sup>

En los últimos años se han desarrollado métodos de diagnóstico rápido, que permiten demostrar la presencia de antígenos virales en secreciones respiratorias, y es la técnica de inmunofluorescencia una de las más utilizadas.<sup>3</sup> Este método tiene muchas ventajas, entre ellas la de permitir identificar en pocas horas, si el agente causal de la enfermedad es de origen viral, lo que puede evitar la administración innecesaria de antibióticos. Además representa ahorro de tiempo y recursos.

En este trabajo presentamos los resultados de un estudio realizado en niños menores de 2 años, hospitalizados por IRA, en el periodo de enero de 1987 a septiembre de 1988, en el que se utilizó el método de inmunofluorescencia directa, con el objetivo de conocer si un agente viral era el causante de la enfermedad.

Este estudio se realiza por primera vez en nuestro país, pero en otros países como Noruega, Austria y Francia<sup>2,4-7</sup> se realizan encuestas para conocer la circulación de los virus respiratorios causantes de IRA, con la utilización de la técnica de inmunofluorescencia.

## MATERIAL Y METODO

### Muestra

Se estudiaron 110 exudados nasofaríngeos de niños menores de 2 años, hospitalizados, con 1 a 3 días de evolución de los siguientes síntomas: laringitis, bronquiolitis, bronconeumonía y neumonía. La muestra se distribuyó para su estudio en 3 grupos de edades: de 0 a 5 meses, 51 muestras; de 6 a 11 meses, 48; de 12 a 23 meses, 11 exudados.

### Traslado de las muestras

Se trasladaron al laboratorio en medio 199 al 0,5 % de lactoalbúmina, con antibióticos en las concentraciones siguientes: penicilina: 100 U/mL; gentamicina: 0,04 mg/mL; kanamicina: 0,01 mg/mL; colimicín: 100 U/mL. Se conservaron en frío hasta su procesamiento.

### Procesamiento de las muestras

Se centrifugaron a 1 000 rev/min, durante 10 min; se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendió el sedimento en 0,1 a 0,3 mL de PBS.

## Preparación de los frotis

Se montaron los frotis antes de las 6 horas después de tomada la muestra, y se fijó la suspensión en acetona fría durante 10 min.

## Técnica

Se utilizó la inmunofluorescencia directa, según la técnica descrita por Gardner y Mc Quillin.<sup>3</sup>

## Antisueros conjugados

Se emplearon antisueros conjugados comerciales contra RSV, Adenovirus, Influenza A y B y Parainfluenza 1, 2 y 3, procedentes del Centro de Producción de Preparados Bacterianos y Virales de Kaumas, URSS, en una dilución de trabajo 1/8, establecida mediante la normalización de la técnica de nuestro laboratorio.

## Microscopio

Las muestras fueron examinadas en un microscopio Leitz, modelo Ortho Lux, lámpara HBO-200.

## Interpretación

Se consideró como positivo la presencia de 5 o más células emisoras de una luz amarillo-verdosa fluorescente, al reaccionar con el conjugado específico.

## Controles

Se utilizaron los controles positivos y negativos correspondientes a los diferentes conjugados.

## Análisis estadístico

Para la comparación entre los grupos de edades se utilizó el estadígrafo Chi-cuadrado a un nivel de significación de 0,05.

Para la comparación entre los anticuerpos conjugados se utilizó la prueba de Mc Nemar a un nivel de significación de 0,05.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla se muestran los resultados obtenidos por la técnica de inmunofluorescencia directa con la utilización de antisueros conjugados de virus Sincitial Respiratorio (RS), Adenovirus (Ad), Influenza A (Inf. A), Influenza B (Inf. B), Parainfluenza 1, 2 y 3 (Pi 1, Pi 2 y Pi 3).

**TABLA. Resultados obtenidos por la técnica de inmunofluorescencia directa con diferentes anticuerpos conjugados contra virus respiratorios. C. de La Habana. 1987-1988**

Grupos de edades	0-5 meses		6-11 meses		12-23 meses		Total	
	Pos.	%	Pos.	%	Pos.	%	Pos.	%
Anticuerpos conjugados	n=51		n=48		n=11		n=110	
Sincitial Respiratorio (RS)	11	21.6	6	12.5	1	9.1	18	16.4
Adenovirus	3	5.9	4	8.3	0	0	7	6.4
Influenza A	0	0	4	8.3	1	9.1	5	4.5
Influenza B	0	0	0	0	0	0	0	0
Parainfluenza 1	3	5.9	2	4.2	1	9.1	6	5.5
Parainfluenza 2	1	1.9	0	0	0	0	1	0.9
Parainfluenza 3	1	1.9	2	4.2	0	0	3	2.7
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>37.3</b>	<b>18</b>	<b>37.5</b>	<b>3</b>	<b>27.3</b>	<b>40</b>	<b>36.4</b>

Fuente: Laboratorio de Virus Respiratorio, Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. C. de La Habana, Cuba.

El mayor número de reacciones positivas fueron detectadas usando conjugados antiviral RS, con 18 casos para el 16.4 %, de los cuales 11 (21.6 %) correspondían a niños de 0 a 5 meses de edad.

En los grupos de 6 a 11 y 12 a 23 meses, se detectó 6 (12.5 %) y 1 (9.1 %) de positivos respectivamente. Estos resultados coinciden con los de otros autores como Anestad,<sup>4-7</sup> Popow,<sup>8</sup> Gardner,<sup>9</sup> Hurnsleth,<sup>10</sup> Kim,<sup>11</sup> Mlinaric,<sup>12</sup> Kumar,<sup>13</sup> etcétera, que plantean que el virus RS es el principal agente causal de las IRA en los niños pequeños y sobre todo en los menores de 6 meses.

Siete muestras presentaron fluorescencia al utilizar conjugado antiAdenovirus, lo que correspondió al 6.4 %, y no se encontró ningún caso positivo en el grupo de 12 a 23 meses. Freymuth<sup>2</sup> halló en un estudio realizado en Francia el 3.1 % de positivos por Adenovirus.

Al usar conjugados antiInfluenza A observaron 5 casos positivos que representan el 4.5 %, y no se detectó ningún positivo en el grupo de 0 a 5 meses, lo que coincide con lo planteado por los autores antes mencionados

referente a que los virus de la Influenza <sup>5-8,13</sup> afectan menos a este grupo de edades. No se detectó ningún caso positivo para el virus de Influenza B.

Anestad en 1982-1983 <sup>5,6</sup> encontró el 3.5 % de muestras positivas para Influenza A y 0.3 % para Influenza B en niños, resultados que se acercan a los reportados por nosotros, y Freymuth <sup>2</sup> detectó el 3.1 % de muestras positivas para los virus de la Influenza A y B.

Con los antisueros dirigidos contra los Parainfluenza virus se encontró 5.5 % , 0.9 % y 2.7 % de reacciones positivas para los Parainfluenza 1, 2 y 3 respectivamente. Estos resultados también concuerdan con un número amplio de reportes aparecidos en la literatura médica acerca de la poca incidencia de infecciones respiratorias causadas por Parainfluenza 2, al mismo tiempo reportan una mayor incidencia de los Parainfluenza 1 y 3 <sup>6-8</sup> como frecuente causa del crup y laringotraqueobronquitis en niños. En otro trabajo se detectó el 3.2 % para los Parainfluenza 3.

De los 110 casos estudiados se obtuvieron 40 muestras positivas que representa el 36.4 %. Este porcentaje de positividad al utilizar conjugados antivirales, se aproxima bastante a los detectados mediante estudios similares en algunos países, <sup>5,7,8,12</sup> aunque difiere de otras cifras reportadas en la literatura <sup>6,10,11</sup> probablemente a causa de obvias diferencias de tipo climático y epidemiológico que condicionan patrones de distribución diferentes de estas infecciones en otros lugares del mundo. La figura ilustra lo planteado en la tabla.

El análisis estadístico de los resultados arrojó que sólo hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los conjugados antivirales de RS y Ad y RS e Influenza A y B.

Sin embargo, no hay diferencias significativas entre los grupos de edades investigados para los 7 conjugados antivirales utilizados. Esto puede deberse a lo reducido de la muestra, aunque resalta el hecho de un mayor porcentaje de casos positivos por RS, y sobre todo en el grupo de 0 a 5 meses de edad, donde es más importante una orientación diagnóstica precoz, que permita establecer una conducta terapéutica consecuente.

La efectividad del método para detectar posibles infecciones causadas por el virus RS, principalmente en los lactantes menores de 6 meses, adquiere mayor importancia, pues aporta a los médicos de asistencia un elemento para considerar el probable riesgo de bronquiolitis, frecuentemente causada por este agente viral.

Aunque el diagnóstico rápido por Inmunofluorescencia es presuntivo y tiene que ser corroborado por los métodos convencionales de aislamiento viral y serología, la disponibilidad de esta técnica ayuda a los pediatras a diferenciar posibles infecciones respiratorias de origen viral de otras de índole bacteriana, en un tiempo menor que los métodos convencionales usados en Bacteriología y Virología. La eficacia de la aplicación de esta técnica en nuestras condiciones, está dada por el hecho de que nuestros resultados reflejan un patrón de incidencia de los diferentes virus en los grupos de edades de los pacientes estudiados, bastante cercano de los reportados por investigadores de otros países. Por tanto creemos oportuno

recomendar la extensión de su aplicación principalmente a los hospitales pediátricos, por lo cual deben dirigirse los esfuerzos a la producción nacional de los antisueros conjugados requeridos para dicha técnica.

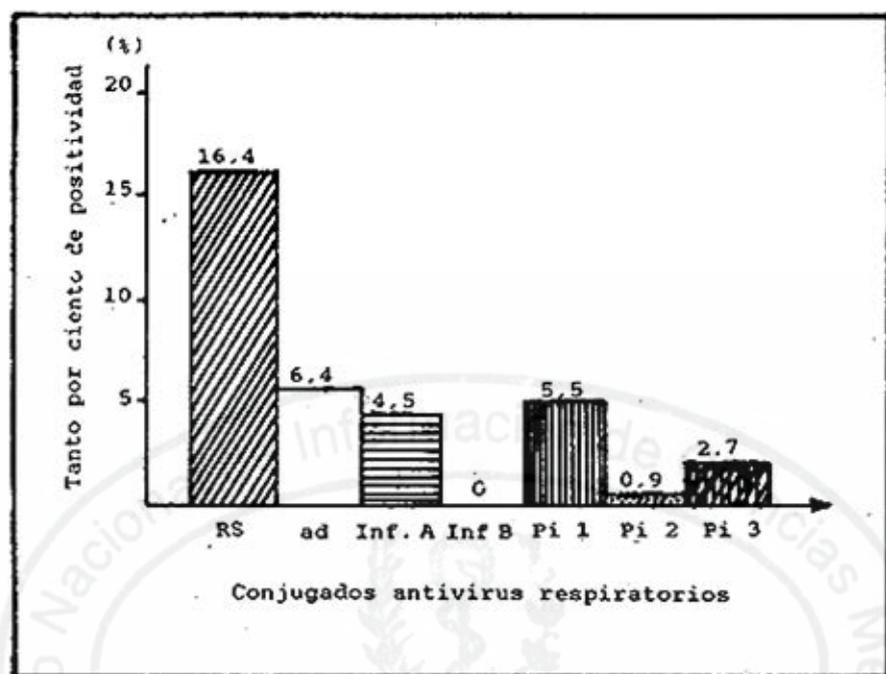


FIGURA. Tanto por ciento de positividad por inmunofluorescencia a diferentes conjugados antiviruses respiratorios. Ciudad de La Habana, 1987-1988.

## CONCLUSIONES

1. Con la técnica de inmunofluorescencia directa se detectó un mayor número de muestras positivas por virus Sincitial Respiratorio en la población investigada.
2. El grupo de edades de 0 a 5 meses fue el más afectado por el virus Sincitial Respiratorio.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiéramos agradecer la participación en este trabajo de las doctoras Ana M. Maza García, Lourdes Valdés Urrutia, la técnica Bárbara Hernández Espinosa y además al doctor Germán Rogés Machado por la revisión de este trabajo.

## SUMMARY

The acute respiratory infections (ARI) of viral origin, are frequent causes of hospitalization during the first two years of life. For a rapid diagnosis of these infections are used fluoresceine conjugated antibodies against

the main respiratory viruses. A total of 110 nasopharyngeal exudates from children aged less than two years, was studied; the children were on admission to four pediatric hospitals in Havana City, with diagnosis of ARI, during January 1987-September 1988 period. The samples were carried at a cold temperature to the laboratory, where were processed for the diagnostic by direct immunofluorescence (IF) with conjugated antibodies of respiratory syncytial (RS) virus, adenovirus, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2 and Parainfluenza 3. The results obtained showed 40 positive samples (36.4 %), corresponding the highest incidence to RS virus. Positive results to different agents are shown in tables.

## RESUME

Les infections respiratoires aiguës (IRA) d'origine virale constituent une cause fréquente d'hospitalisation au cours des 2 premières années de vie. Pour le diagnostic rapide de ces infections, on utilise des anticorps conjugués avec fluorescéine contre les principaux virus respiratoires. On a étudié 110 exsudats nasopharyngiens provenant d'enfants âgés de moins de 2 ans, admis dans 4 hôpitaux pédiatriques de La Havane-Ville, avec diagnostic d'IRA, pendant la période allant de janvier 1987 à septembre 1988. Les échantillons ont été transférés au froid dans le laboratoire. Là ils ont été traités pour le diagnostic par immunofluorescence (IF) par la méthode directe, avec des anticorps conjugués de virus syncytial respiratoire (RS), Adénovirus, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2 et Parainfluenza 3. Les résultats ont révélé 40 échantillons positifs, représentant 36,4 %, dont la plupart correspondait au virus RS. La positivité aux différents agents est présentée sur les tableaux.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. JAWETZ, E. ET AL.: Manual de Microbiologia Médica. 9na. ed. Mexico, Ed. El Manual Moderno S.A., 1981.
2. FREYMUTH F. ET AL.: Viruses responsible for respiratory infections in pediatrics. Evaluation of 3 480 nasal aspirates performed in children over 6 year period. *Ann Pediatr (Paris)* 34 (7): 493-501. Sept. 1987.
3. GADNER P. S.; J. MC QUILLIM: Rapid virus diagnosis in application of immunofluorescence. 2nd. ed., London, Butterworth and Co. Ltd., 1980.
4. ANESTAD, G.; O. R. MOCHLE: Rapid diagnosis of RSV infections by IF. A simplified procedure for the preparation of nasopharyngeal suction specimens. *Acta Pathol Microbiol Scand* 89 B: 285, 1981.
5. ANESTAD, G. ET AL.: Rapid diagnosis of RSV and Inf. A infection by IF. *Acta Pathol Microbiol Scand (B)* 91 (4): 267-71. Aug. 1983.
6. ANESTAD, G.: Surveillance of respiratory viral infections by IF diagnosis with emphasis on the epidemiological development of RSV infections. *J Hyg* 94 (3): 349-56, 1985.
7. ANESTAD, G.: Surveillance of respiratory viral infections by rapid IF diagnosis with emphasis on virus interference. *Epidemiology and Infection* 99 (2): 523, 1987.
8. POPOW-KRAUPPT, T. ET AL.: Respiratory virus infection in hospitalized children in Austria 1979-82. Diagnosis by IF. *Infection* 12 (3): 185-9, 1984.
9. GADNER, P. S.; J. MC QUILLIM: Application of IF de technique in rapid diagnosis of RSV infections. *Br Med J* 3: 340, 1968.
10. HURNSLETH, A.: Detection of RSV in nasopharyngeal secretions by a biotin-avidin ELISA more sensitive than the fluorescent Ac. technique. *J Med Virol* 18 (2): 113-7, 1986.
11. KIM, H. W. ET AL.: Respiratory RS detection by IF in nasal secretions with monoclonal antibodies against selected surface and internal prot. *J Clin Microbiol* 18 (6): 1399, 1983.

12. MLINARIC-GALINOVIC, G. ET AL.: Rapid detection of RSV in clinical specimens. Acta Virol 31 (5): 410, 1987.
13. KUMAR M. L. ET AL.: Diagnosis efficacy of two rapid tests for detection of RSV antigen. J Clin Microbiol 25 (5): 873-5, 1987.

Recibido: 28 de junio de 1989. Aprobado: 3 de agosto de 1989.

Lic. Marité Bello Corredor. Infanta No. 1158 e/ Llinás y Clavel, Centro Habana. La Habana 10300, Cuba.

