

Detección de Virus Respiratorios Mediante Multiplex PCR en Tiempo Real en Niños Menores de Cinco Años de la Ciudad de Temuco, Región de la Araucanía, Chile

Respiratory Virus Detection by Multiplex Real-Time PCR in Children Under 5 Years of Age From the City of Temuco, Araucanía Region, Chile

Mariela Muñoz^{1,2}; Karen Lagos³ & Jaime Inostroza^{4,5}

MUÑOZ, M.; LAGOS, K. & INOSTROZA, J. Detección de virus respiratorios mediante multiplex PCR en tiempo real en niños menores de 5 años de la ciudad de Temuco, Región de la Araucanía, Chile. *J. health med. sci.*, 5(4):212-215, 2019.

RESUMEN: Las infecciones del tracto respiratorio se encuentran dentro de las principales causas de morbimortalidad en niños menores de 5 años, siendo la etiología viral la más prevalente. Sin embargo los programas de detección de origen viral utilizados actualmente pesquisan menos del 50 % de los agentes etiológicos debido a las técnicas utilizadas. Las técnicas moleculares disponibles en el mercado, principalmente las técnica de Múltiplex PCR en tiempo real, aumentan el número de agentes virales que se pueden detectar en la muestra, aumentando la posibilidad de encontrar el agente causal de la infección. El objetivo de éste trabajo fue conocer el agente causal de las IRA en aquellas muestras que dieron un resultado negativo para el panel de virus respiratorios clásicos que se realiza en nuestro país. A 71 muestras de hisopados y aspirados nasofaríngeos de niños menores de cinco años de la región de la Araucanía se les realizó múltiplex RT-PCR en tiempo real en equipo CFX96 de BioRad con el Kit de detección RV16 Anyplex™ II de Seegene. El 74,64 % de las muestras fueron positivas para algún virus respiratorio, de estas, un 66,03 % detectó la presencia de un solo virus, mientras que en el 26,41 % y 7,54 % se detectó coinfección con dos y tres virus, respectivamente. La detección del agente causal de las infecciones respiratorias permite tomar mejores medidas de salud en relación al tratamiento y valorar los factores de riesgo, como la contaminación ambiental, en el desarrollo de enfermedades respiratorias obstructivas crónicas. En conclusión la plataforma múltiplex PCR en tiempo real permite aumentar la tasa de detección de virus respiratorios y detectar coinfecciones.

PALABRAS CLAVE: múltiplex PCR, virus respiratorios, índice calidad del aire.

INTRODUCCIÓN

La tasa de mortalidad en menores de cinco años en Chile es de 7,4 por 1000 nacidos vivos en 2018 (WB, 2018) Si bien ha ido en descenso continuo, aún no se ha llegado a los valores esperados. Dentro de las principales causas de morbimortalidad se encuentran las infecciones del tracto respiratorio, tanto infecciones de las vías respiratorias altas como bajas. En nuestro país la principal causa de consultas y hospitalizaciones es relacionada con infecciones respiratorias agudas (IRA) de origen viral (Lozano *et al.*, 2008). Según la OPS, en la mayoría de los países

panamericanos las IRA sin diagnóstico etiológico superan el 50 % (Savón *et al.*, 2003). En Chile, el programa de vigilancia de virus respiratorios y exantemáticos (VRS, Influenza A y B, Parainfluenza 1, 2 y 3, Adenovirus y Metapneumovirus) del Instituto de Salud Pública (ISPCh), informó una positividad de un 30 % el año 2015 (ISPCh, 2015), en concordancia con lo reportado por la OPS.

Existe amplia evidencia que relaciona las infecciones respiratorias virales en niños menores de un

¹ Doctorado en Ciencias Morfológicas, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

² Centro de Excelencia en Estudios Morfológicos y Quirúrgicos, CEMyQ, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

³ Laboratorio Inmunológico del Sur, Temuco, Chile.

⁴ Sección Inmunología y Citometría de Flujo, Hospital Dr. Hernán Henríquez Aravena, Temuco, Chile.

⁵ Centro Jeffrey Modell Pars Diagnostico e Investigacion en Inmunodeficiencias primarias, Centro de Excelencia en Medicina Traslacional, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

año con el desarrollo de asma durante la niñez o edad adulta (García-García *et al.*, 2016). Por otro lado, los índices de contaminación en la región de la Araucanía, desde el mes de mayo a agosto de cada año están por sobre lo saludable, llegando a un promedio de índice de calidad del aire (ICA) en Padre Las Casas, de 140,32 midiendo las partículas en suspensión PM 2,5 (AQI, 2019) lo que significa una calidad de aire dañina para grupos sensibles, que incluye a los niños menores de un año. Lo anterior evidencia lo importante que es conocer la etiología de estas infecciones, principalmente en niños menores de un año, ya que tenemos dos importantes factores de riesgo para el desarrollo de cuadros de asma, infecciones por virus respiratorios y contaminación ambiental.

El diagnóstico de virus respiratorios se realiza rutinariamente por inmunofluorescencia directa o test inmunocromatográficos. Los métodos moleculares han mejorado la sensibilidad y especificidad del diagnóstico viral, pero aún son costosas y requieren de tiempo, instalaciones y personal capacitado, sin embargo, las nuevas plataformas de detección multiplex permiten detectar nuevos agentes como Rinovirus, Bocavirus, nuevos coronavirus, Parainfluenza IV, entre otros, en mucho menor tiempo y en plataformas más amigables con el operador.

Tabla I. Detección de virus respiratorios mediante técnica Multiplex PCR en tiempo real realizada a partir de las muestras negativas para virus respiratorios clásicos por la técnica de inmunofluorescencia.

Virus	%	N
Rinovirus A/B/C	45,28	24
Adenovirus	28,30	15
Influenza A	18,86	10
Virus respiratorio Sincicial B	9,43	5
Virus respiratorio Sincicial A	7,54	4
Coronavirus OC43	7,54	4
Influenza B	3,77	2
Metapneumovirus	3,77	2
Parainfluenza IV	3,77	2
Enterovirus	3,77	2
Bocavirus 1/2/3/4	3,77	2
Coronavirus 229E	1,88	1
Parainfluenza III	1,88	1
Parainfluenza II	0	0
Parainfluenza I	0	0
Coronavirus NL63	0	0

El objetivo del presente del trabajo fue conocer el agente causal de las IRA en aquellas muestras que dieron un resultado negativo para el panel de virus respiratorios clásicos que se realiza en nuestro país y demostrar la alta positividad de virus respiratorios en las infecciones respiratorias agudas.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 71 muestras de hisopados y aspirados nasofaríngeos de niños menores de cinco años que fueron procesadas entre noviembre del 2014 y septiembre del 2015. Se utilizó kit de extracción Gene All de Ribospin VDR, sistema basado en columnas de sílice para la extracción dual de ADN y ARN y se realizó multiplex RT-PCR en tiempo real en equipo CFX96 de BioRad con el Kit de detección RV16 Anyplex™ II de Seegene según instrucciones del fabricante.

RESULTADOS

El 74,64 % de las muestras fueron positivas para algún virus respiratorio, de estas, un 66,03 % detectó la presencia de un solo virus, mientras que en el 26,41 % y 7,54 % se detectó coinfección con dos y tres virus, respectivamente. La edad promedio de las muestras positivas para un y dos virus fue de $23,14 \pm 2,46$ meses ($n=49$) y el grupo de muestras positivas para tres virus tuvo una edad promedio de $10,0 \pm 2$ meses ($n=4$). De las muestras positivas, el 56,60 % correspondieron a sexo masculino y 43,39 % a sexo femenino. El virus más aislado, tanto en infección individual como coinfección, fue Rinovirus humano, seguido de adenovirus y en tercer lugar virus Influenza A (Tabla I). Cabe destacar la presencia de Parainfluenza IV (PIV-IV) con un 3,77 % de positividad, igual que para Metapneumovirus.

DISCUSIÓN

Sumado a los tradicionales virus respiratorios (Influenza A y B, Parainfluenza 1, 2 y 3, virus sincicial, adenovirus), a través de los años, y gracias a la introducción de técnicas de biología molecular, se han sumado a estos siete virus una lista de nuevos agentes y genotipos que se han asociado a infecciones respiratorias (Mahony *et al.*, 2011). Por ejemplo, el año 2001

a través de un estudio retrospectivo y utilizando biología molecular se descubrió un nuevo virus de la familia *Paramixoviridae*, el Metapneumovirus humano (Van den Hoogen *et al.*, 2001), el cual ha sido incluido en el panel de diagnóstico de infecciones virales por inmunofluorescencia directa o por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos en nuestro país. Varias limitantes en la inclusión de estos nuevos virus en el diagnóstico rutinario de las infecciones respiratorias han aparecido, entre ellas, falta de personal capacitado e infraestructura especializada, alto costo de la implementación, falta de estandarización y control de las técnicas, entre otras.

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR tradicional o incluso la PCR de tiempo real, toman varias horas para la determinación de todos los posibles virus respiratorios, es así que la introducción de plataformas multiplex para el diagnóstico de virus respiratorios han traído varias ventajas en comparación con los formatos simples de detección, como la disminución en el tiempo de detección, determinación de coinfecciones, y el estudio de la epidemiología de nuevos virus o genotipos (Van der Zalm *et al.*, 2011; Budnik *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos muestran un aumento en el establecimiento de la etiología de origen viral, encontrando una positividad de un 74,64 % versus lo encontrado por el programa de vigilancia de virus respiratorios y exantemáticos, donde sólo se asigna etiología viral en sólo un 30 % de las muestras durante el año 2015 (ISPCH). Lo encontrado por nuestro grupo está en concordancia con lo reportado por Ljubin-Sternak *et al.* (2016), con un establecimiento de etiología viral en el 81,3 % de las muestras, un 61,3 % de coinfección con un solo virus, 27,6 % con dos virus y un 11,0 % con tres virus (66,03 %, 26,41 % y un 7,54 % de coinfección con uno, dos y tres virus, respectivamente). La etiología viral de las infecciones respiratorias permitiría regular y disminuir el uso de antibióticos en niños, evitando así riesgo de aparición de resistencia bacteriana.

El virus más recuperado fue Rhinovirus con una presencia del 45,28 %, en concordancia con otros estudios donde se encuentra una alta prevalencia de Rhinovirus (Van der Zalm *et al.*). La importancia de detección de éste virus, como agente causal principal o en coinfecciones de infecciones respiratorias agudas, está relacionado con la ya establecida relación entre rinovirus y el desarrollo de cuadros de asma durante la niñez o adultez (García-García *et al.*).

Por otra parte, la contaminación presente en la ciudad de Temuco, principalmente, la alta concentración de partículas PM 2.5, partículas conocidas como partículas finas, que por ser de menor tamaño tienen gran poder de penetración en el árbol bronquial y son las que causan mayor daño en el sistema respiratorio. Estos dos antecedentes demuestran la importancia de detección de Rinovirus en nuestra localidad, como predictor de desarrollo de asma.

Cabe mencionar la presencia del virus Parainfluenza 4 en un 3,77 % de las muestras lo que concuerda con los resultados obtenidos por Xiao *et al.* (2016) que reportaron una positividad de un 3,63 % para PIV-4 en niños con infección respiratoria aguda baja, es el segundo en prevalencia luego de PIV-3, demostrando la importancia de la inclusión de éste serotipo en la detección de patógenos causantes de infecciones respiratorias agudas.

CONCLUSIONES

La plataforma multiplex PCR en tiempo real permite aumentar la tasa de detección de virus respiratorios. Además, permite detectar coinfecciones y virus que no son pesquisados por las técnicas rutinarias.

MUÑOZ, M.; LAGOS, K. & INOSTROZA, J. Respiratory virus detection by multiplex real-time PCR in children under 5 years of age from the city of Temuco, Araucanía region, Chile. *J. health med. sci.*, 5(4):212-215, 2019.

ABSTRACT: Respiratory tract infections are among the main causes of morbidity and mortality in children under 5 years of age, with viral etiology being the most prevalent. However, viral detection programs currently used detect less than 50 % of the etiologic agents due to the techniques used. Molecular assays available in the market, mainly real-time multiplex PCR techniques, increase the number of viral agents that can be detected in the sample, which increases the possibility of finding causative agent of infection. The objective of this work was to detect causative agent of acute respiratory infections in those samples that gave a negative result for the panel of classical respiratory viruses that is performed in our country. 71 samples of nasopharyngeal aspirates and swabs from children under five years of age in Araucanía region were performed real-time multiplex RT-PCR of BioRad CFX96 with the Seegene Anyplex™ II RV16 detection kit. 74.64% of the samples tested positive for some respiratory virus, of these, 66.03 % detected the presence of a single virus, while in 26.41 % and 7.54 % detected

coinfection with two and three viruses, respectively. The detection of causative agent of respiratory infections allows improving health measures in relation to treatment and assessing risk factors, such as environmental pollution, in development of chronic obstructive respiratory diseases. In conclusion, the multiplex real-time PCR platform allows to increase the rate of detection of respiratory viruses and detect coinfections.

KEY WORDS: multiplex PCR, respiratory virus, air quality index.

Dirección para correspondencia:
Mariela Muñoz
Centro de Excelencia en Estudios
Morfológicos y Quirúrgicos (CEMyQ)
Universidad de La Frontera
Temuco
CHILE

E mail: mariela.munoz@ufrontera.cl

Recibido : 23-08-2019

Aceptado: 27-09-2019

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Air Quality Index (AQI). Contaminación del aire de Padre Las Casas II. Índice de la Calidad del Aire (ICA) en tiempo real, 2019. Disponible en: <http://aqicn.org/city/chile/padre-las-casas-ii/es/>.
- Budnik, I.; Ferrés, M.; Pardo, T.; Edwards, J.; Labarca, G.; Reyes, F.; Martínez-Valdebenito, C.; Montecinos, L. & Perret, C. Aporte de la biología molecular en el diagnóstico de infecciones respiratorias agudas. *Rev. Chil. Enferm. Respir.*, 32(4):224-32, 2016.
- García-García, M. L.; Calvo Rey, C. & Del Rosal Rabes, T. Pediatric asthma and viral infection. *Arch. Bronconeumol.*, 52(5):269-73, 2016.
- Instituto de Salud Pública (ISPCH). Listado histórico de Informes de Circulación de Virus Respiratorios 2015. Instituto de Salud Pública, Gobierno de Chile, 2015. Disponible en: www.ispch.cl/listadoinformescirculacionvirusrespiratorios2015.
- Ljubin-Sternak, S.; Marijan, T.; Ivkovic-Jurekovic, I.; Cepin-Bogovic, J.; Gagro, A. & Vranes, J. Etiology and clinical characteristics of single and multiple respiratory virus infections diagnosed in Croatian children in two respiratory seasons. *J. Pathog.*, 2016:2168780, 2016.
- Lozano, J.; Yáñez, L.; Lapadula, M.; Lafourcade, M.; Burgos, F. & Budnik, I. Infecciones respiratorias agudas bajas en niños: Estudio etiológico prospectivo. *Rev. Chil. Enferm. Respir.*, 24(2):107-12, 2008.
- Mahony, J. B.; Petrich, A. & Smieja, M. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 48(5-6):217-49, 2011.
- Savón, C.; Goyenechea, A.; Oropesa, S.; Váldez, O.; Acosta, B.; González, G.; Pérez, L.; Palerm, L. & Piñón, A. Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral, 2003. Disponible en http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd63/labs_IPK.pdf?ua=1.
- Van den Hoogen, B. G.; de Jong, J. C.; Groen, J.; Kuiken, T.; de Groot, R.; Fouchier, R. A. & Osterhaus, A. D. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.*, 7(6):19-24, 2001.
- Van der Zalm, M. M.; Wilbrink, B.; van Ewijk, B. E.; Overduin, P.; Wolfs, T. F. & van der Ent, C. K. Highly frequent infections with human rhinovirus in healthy young children: a longitudinal cohort study. *J. Clin. Virol.*, 52(4):317-20, 2011.
- World Bank (WB). Tasa de mortalidad, menores de 5 años (por cada 1.000) – Chile. [datos.bancomundial.org](https://datos.bancomundial.org/indicador/SH.DYN.MORT?locations=CL), 2018. Disponible en: <https://datos.bancomundial.org/indicador/SH.DYN.MORT?locations=CL>.
- Xiao, N. G.; Duan, Z. J.; Xie, Z. P.; Zhong, L. L.; Zeng, S. Z.; Huang, H.; Gao, H. C. & Zhang, B. Human parainfluenza virus types 1-4 in hospitalized children with acute lower respiratory infections in China. *J. Med. Virol.*, 88(12):2085-91, 2016.