

AGENTES VIRALES Y BACTERIANOS EN NIÑOS HOSPITALIZADOS CON INFECCION RESPIRATORIA AGUDA: BROTE EPIDEMICO

Dra. Pilar Salas*, Dra. Rosario Achí*, Dr. Leonardo Mata* y
Dr. José F. Chavarría*

INTRODUCCION

Las infecciones respiratorias son las enfermedades más comunes en la niñez y comprenden aproximadamente el 50% de todas las enfermedades en niños menores de 5 años de edad. La mayoría de ellas se limitan al tracto respiratorio superior y sólo un 5% involucra al tracto respiratorio inferior (17).

El 90% de las infecciones respiratorias son de origen viral y el papel de las bacterias y otros agentes es menos importante y a veces difícil de determinar. Entre los agentes virales que causan este tipo de infecciones están el virus sincicial respiratorio, parainfluenza 1, 2 y 3 y virus influenza A, los cuales se han considerado patógenos respiratorios de mucha importancia (15,17).

El virus sincicial respiratorio es la causa principal de infección respiratoria en la infancia y es responsable del 80% de las bronquiolitis. Además es de distribución mundial y en contraste con otros virus, causa brotes anuales con tasas de ataque de 30 a 60% en lactantes menores de un año que han sido expuestos a la infección (16,17). En Melbourne, Australia, el pico epidémico se presenta en los meses más fríos del año. En Norte América existe una variación estacional más marcada y el pico varía desde final del otoño hasta principios de la primavera (17). Por el contrario los virus parainfluenza tipos 2 y 3 y los rinovirus se presentan durante todo el año. Se ha sugerido que existe un fenómeno de interferencia entre los virus respiratorios ya que cuando uno de ellos es epidémico, los otros se mantienen reprimidos (15,17). En los países tropicales se ha demostrado un aumento de infección respiratoria durante los meses fríos y lluviosos del año (8,12,13,14,20,21).

Entre las bacterias más importantes que se aíslan de pacientes con infección respiratoria aguda se encuentra el *Streptococcus pneumoniae* en el 80% de los cuadros de neumonía. *S. pneumoniae* también es un agente etiológico de otitis media, y es la segunda causa de meningitis bacteriana (15). Además, esta bacteria puede ser aislada de la faringe del 30 al 70% de individuos aparentemente normales (5,7).

* Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica.

El *Haemophilus influenzae* tipo B causa la mayoría de los cuadros de epiglotitis y es responsable del 20 al 40% de los casos de otitis media en niños menores de 10 años (9). El papel del *Staphylococcus aureus* en el tracto respiratorio es difícil de interpretar ya que de un 20 a un 60% de los humanos son portadores de este microorganismo (7). Otras bacterias como *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* se aíslan en gran número, a menudo en procesos patológicos del tracto respiratorio inferior (7).

Un estudio colaborativo entre el INISA y el Hospital Nacional de Niños demostró que las infecciones respiratorias agudas se comportan en forma similar a lo observado en otras latitudes, tanto tropicales como templadas. Además, se aisló por primera vez en Costa Rica los principales virus respiratorios y se desarrolló una infraestructura de laboratorio para ampliar nuestro conocimiento en ese campo (3,18).

Con base en tales consideraciones, se decidió estudiar un brote de infección respiratoria que ocurrió durante los meses de noviembre y diciembre de 1983 en el Hospital Nacional de Niños. Los niños estudiados fueron evaluados con un criterio clínico uniforme y en todos ellos se recogió una muestra de material nasofaríngeo aspirado, la cual fue analizada por virus y bacterias.

MATERIAL Y METODOS

Población y recolección de las muestras

Se estudiaron 76 niños menores de un año provenientes del cantón central de San José, admitidos entre el 10 de noviembre y el 15 de diciembre de 1983 en el Hospital Nacional de Niños por presentar insuficiencia respiratoria moderada o severa.

Para el aislamiento bacteriano y viral se tomaron muestras nasofaríngeas, utilizando dispositivos plásticos desechables provistos de una sonda de alimentación que se introduce en la nasofaringe. La sonda está conectada a un recipiente estéril en donde se recolectan las secreciones. La aspiración se realiza accionando un aspirador mecánico (Argyle, De Lee Suction Catheter con trampa para moco, Division of Sherwood Medical, St. Louis, MO.) conectado en el otro extremo por un tubo similar.

Aislamiento de virus respiratorios

Para el aislamiento viral las secreciones (uno a dos mililitros) fueron transferidas de inmediato a tubos que contenían 4 ml de Hanks con 2% de albúmina bovina con antibióticos en las siguientes concentraciones, por ml: estreptomina (500 ug), penicilina (500 U), anfotericina B (2,5 ug) y nistatina (50 U) (10, 16).

Las muestras fueron transportadas en baño de hielo en el término de treinta a noventa minutos de haber sido recogidas y fueron mantenidas en refrigeración hasta su manipulación en el laboratorio. Las suspensiones de las secreciones fueron centrifugadas a 500 xG durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada (Beckman, Modelo TJ-6) y 0,25 ml del sobrenadante fue inoculado por duplicado, en tubos de 16 X 125 mm con monocapas de células heteroploides de riñón de mono y hepatoma humano (LLCMK y HEp-2) y diploides de amígdala fetal humana (HFT) (6,10). No se incluyó ningún sistema para aislar virus influenza.

El mantenimiento de las células HEp-2 y HFT se hizo en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) (Grand Island Biological Company, Grand Island New York) con 2% de suero fetal bovino inactivado (56°C por 30 minutos), 7,5% de bicarbonato de sodio, 100 ug/ml de estreptomina y 100 U/ml de penicilina (4,16). Las células LLCMK₂ fueron mantenidas en el mismo medio pero sin suero, adicionado de 0,5 ug/ml de tripsina cristalina (Sigma, Chemical Company, St. Louis, MO) (6).

Los tubos se examinaron diariamente en busca de efectos citopáticos en un microscopio invertido (American Optical Scientific Instruments). Cada tres o cuatro días se cambió el medio. Las monocapas de LLCMK que no presentaban efecto citopático de los siete días de incubación fueron tratadas después de remover el fluido, con 0,5 ml de una suspensión de glóbulos rojos de caballo al 0,4% para buscar el fenómeno de hemadsorción (19).

Las monocapas de células diploides se observaron durante tres semanas y las células HEp-2 y LLCMK durante dos semanas. Los cultivos de LLCMK que después de la observación permanecían negativos, fueron congelados y descongelados tres veces y los materiales fueron reinoculados nuevamente (pase) en los mismos cultivos, empleando 0,25 ml de material por tubo. Las monocapas de HEp-2 que permanecían negativas a las dos semanas, fueron desprendidas con una varilla de vidrio ("policía") y luego subcultivadas sin congelar, en células del mismo tipo. Todos los tubos que permanecieron negativos (sin efecto citopático ni hemadsorción) durante dos a tres semanas de incubación en el segundo pasaje, fueron descartados como negativos por virus

El virus sincicial respiratorio fue identificado por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Wellcome Diagnostic Reagents) (1), y los virus herpes simplex y los adenovirus fueron identificados por su efecto citopático.

Aislamiento de bacterias

La porción de la muestra utilizada para el análisis bacteriológico se cultivó secuencialmente en los siguientes agares: sangre, chocolate complementado con Isovitalax (BBL, Microbiology Systems; Becton Dickinson and Co.), Levine y Manitol-Sal. Se realizó una tinción de Gram directamente de la secreción. Los platos de agar sangre y agar chocolate fueron incubados a 37°C

por 24 horas en una atmósfera de 10% de CO₂, en una jarra con candela. El agar Levine y el agar Manitol-Sal se incubaron a 37°C de 18-24 horas en aerobiosis.

Después de la incubación, las placas fueron examinadas para identificar las características coloniales que junto con la tinción de Gram, permiten identificar colonias sospechosas para proceder a subcultivarlas en otro plato de agar de sangre y así realizar el diagnóstico presuntivo.

Para *Streptococcus* beta-hemolítico del Grupo A se utilizaron discos impregnados con 0,04 unidades de bacitracina (BBL, Taxo A). Cualquier zona de inhibición, sin importar su diámetro, se consideró *Streptococcus* beta hemolíticos, Grupo A presuntivamente (5). Para *Streptococcus pneumoniae* se utilizaron discos impregnados con hidrocloreuro de etil-hidrocupreína (Optochin, BBL Taxo P Discs) de 5 ug; considerándose positiva una zona de inhibición de 14 mm o más (11). Para *Haemophilus influenzae* se buscó el fenómeno de satelitismo en agar sangre utilizando una cepa de *Staphylococcus aureus* (9).

RESULTADOS

El Cuadro 1 muestra la frecuencia de agentes infecciosos en 76 niños con infección respiratoria aguda. En 44 sujetos con bronquiolitis y en 32 con bronconeumonía-neumonía, el virus sincicial respiratorio fue el agente más frecuente. Algunos niños presentaron infecciones mixtas de virus y bacterias. En niños con bronquiolitis, la combinación más común fue de virus sincicial respiratorio con *Streptococcus pneumoniae* (25%), con *Streptococcus sp* (15,9%) o *Staphylococcus aureus* (9,1%).

Los virus de herpes simplex se encontraron asociados con bacterias en ambos cuadros clínicos. En bronquiolitis se presentó con *S. pneumoniae* (4,5%) y en bronconeumonía-neumonía con *Streptococcus sp* (9,4%). Los adenovirus ocuparon el tercer lugar aislándose de un niño con bronquiolitis. En los casos de bronconeumonía-neumonía este virus se asoció con *S. pneumoniae* y *Streptococcus* (3,1%).

Con relación a las bacterias, el *S. pneumoniae* fue la más frecuentemente aislada en casos de bronquiolitis (13,6%) seguido de *Streptococcus* (9,1%).

En niños con bronconeumonía-neumonía los *Streptococcus* fueron los más frecuentes (12,5%) seguido de *S. pneumoniae* (6,2%).

S. aureus y *H. influenzae* se aislaron sólo en casos de bronconeumonía (6,2%) y neumonía (3,1%).

El Cuadro 2 es una sinopsis de todos los resultados para demostrar que fue posible identificar virus en niños con bronquiolitis en el 70,5% y con bronconeumonía-neumonía en el 59,4%. En ambas patologías el virus sincicial respiratorio fue el más frecuente. Igualmente la frecuencia de bacterias aisladas fue de 79,6% en bronquiolitis y 71,9% en bronconeumonía. El Cuadro 3 resu-

me los hallazgos de infecciones múltiples, revelando que fue posible aislar e identificar uno o más agentes en el 93,2% de los casos de bronquiolitis y en el 87,5% de los de bronconeumonía-neumonía.

CUADRO 1

Agentes Infecciosos en Niños con Infección Respiratoria Aguda
Hospital Nacional de Niños, 1983

	Bronquiolitis N = 44	Bronconeumonía- neumonía N = 32
VSR	5 (11,4)*	5 (15,6)
VSR + <i>S. pneumoniae</i>	11 (25,0)	5 (15,6)
VSR + <i>Streptococcus sp</i>	7 (15,9)	2 (6,2)
VSR + <i>S. aureus</i>	4 (9,1)	0
VSR + <i>H. influenzae</i>	0	1 (3,1)
VHS + <i>S. pneumoniae</i>	2 (4,5)	1 (3,1)
VHS + <i>Streptococcus sp</i>	1 (2,3)	3 (9,4)
AV	1 (2,3)	0
AV + <i>S. pneumoniae</i>	0	1 (3,1)
AV + <i>Streptococcus sp</i>	0	1 (3,1)
<i>S. pneumoniae</i>	6 (13,6)	2 (6,2)
<i>Streptococcus sp</i>	4 (9,1)	4 (12,5)
<i>S. aureus</i>	0	2 (6,2)
<i>H. influenzae</i>	0	1 (3,1)

* Porcentaje

VSR = virus sincicial respiratorio

VHS = virus herpes simplex

AV = adenovirus

CUADRO 2

Sinopsis en Agentes Respiratorios en Niños con Infección Respiratoria Aguda
Hospital Nacional de Niños, 1983

AGENTE	Bronquiolitis N = 44	Bronconeumonía- neumonía N = 32
Virus sincicial respiratorio	27 (61,4)	13 (40,6)
Virus herpes simplex	3 (6,8)	4 (12,5)
Adenovirus	1 (2,3)	2 (6,3)
Total con virus	31 (70,5)	19 (59,4)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	19 (43,2)	9 (28,1)
<i>Streptococcus sp</i>	12 (27,3)	10 (31,3)
<i>Staphylococcus aureus</i>	4 (9,1)	2 (6,3)
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	2 (6,3)
Total con bacterias	35 (79,6)	23 (71,9)

Nota:

Las frecuencias no son aditivas puesto que muchos casos tuvieron dos agentes.

CUADRO 3

Agentes Infecciosos en Niños con Infección Respiratoria Aguda
Hospital Nacional de Niños, 1983

Agente	Bronquiolitis N = 44	Bronconeumonía- neumonía N = 32
Virus, sólo	6 (13,6)*	5 (15,6)
Bacterias, sólo	10 (22,7)	9 (28,1)
Virus y bacterias	25 (56,8)	14 (43,8)
Uno o más agentes	41 (93,2)	28 (87,5)
Ninguno	3 (6,8)	4 (12,5)

* Positivo (porcentaje relativo)

DISCUSION

Los resultados obtenidos confirman la importancia etiológica de los virus en cuadros de infección respiratoria grave como bronquiolitis (70,5%) y bronconeumonía (59,4%). El virus sincicial-respiratorio fue el agente más frecuente especialmente en niños menores de un año en los cuales el cuadro clínico se relaciona con la edad y la invasión del tracto respiratorio inferior (17). El aislamiento del virus presenta algunas dificultades pues es muy lábil, por lo que el transporte de las muestras debe realizarse en el menor tiempo posible. Es muy importante contar con células de alta susceptibilidad como HEp-2, y aspirados nasofaríngeos a fin de obtener el mayor número de partículas infectantes (2).

Los virus herpes simplex y los adenovirus se aislaron con menor frecuencia, sugiriendo una interferencia de estos virus por la presencia epidémica del virus sincicial respiratorio (17).

Las bacterias aisladas del tracto respiratorio deben considerarse como patógenos potenciales, pero su papel como agentes causales es difícil de interpretar. La principal razón es que los portadores asintomáticos sanos se encuentran en proporción muy similar a los niños con infección respiratoria declarada. La mayoría de las muestras nasofaríngeas se contaminan con secreciones orofaríngeas, y los resultados de niños con infección del tracto respiratorio superior, dependerán del tipo de muestra y del microorganismo aislado (17).

El *S. pneumoniae* ocurre aproximadamente en un 80% de todas las neumonías bacterianas. Su desarrollo se relaciona más a factores predisponentes que a la exposición con neumococos. Entre los factores predisponentes se encuentran la infección viral, obstrucción viral y atelectasia, alteración de la función mucociliar, congestión pulmonar y esplenectomía accidental o natural como ocurre en la anemia de células falciformes. La mortalidad debida a *S. pneumoniae* ha disminuido considerablemente con el uso de antibióticos (15).

En el presente trabajo se aisló *S. pneumoniae* con más frecuencia en casos de bronquiolitis (43,2%); los *Streptococcus sp* se encontraron asociados a los cuadros de bronconeumonía-neumonía (31,3%) (15).

H. influenzae apareció en muy baja frecuencia y únicamente en bronconeumonías (3,1%), sin asociarse a ninguno de los virus aislados. La infección se adquiere por la vía respiratoria y la susceptibilidad está inversamente relacionada con los anticuerpos presentes en el suero. Además se ha demostrado que los brotes epidémicos son raros (15).

El porcentaje de aislamiento viral fue similar al bacteriano. Es posible que las bacterias de flora indígena nasofaríngea contaminaron la muestra, y que la infección bacteriana complicara la infección viral contribuyendo a la gravedad del cuadro clínico. Ante la sospecha de una etiología bacteriana, debe hacerse hemocultivos, y cultivos de fluidos, pleural y alveolar, para tener la certeza de su papel etiológico (15).

Finalmente debe mencionarse que se obtuvo una alta eficiencia en el diagnóstico pues fue posible determinar la etiología en un 93,2% de los casos con bronquiolitis y en un 87,5% en los niños con bronconeumonía-neumonía. Es necesario implementar técnicas adicionales que permitan brindar un diagnóstico rápido y seguro, especialmente en presencia de un aumento en este tipo de infecciones.

AGRADECIMIENTO

Se agradece a las Sritas. Lucía Lizano y Giselle Ramírez la colaboración en la recolección y transporte de las muestras y al Sr. Federico Hernández por su ayuda técnica. Se recibió financiamiento de la Organización Panamericana de la Salud, la Edna MccConnell Clark Foundation y la Universidad de Costa Rica.

RESUMEN

De 76 niños hospitalizados por infección respiratoria aguda se recolectaron aspirados nasofaríngeos. Para obtener dichas secreciones se utilizaron dispositivos plásticos provistos de una sonda de alimentación y un aspirador mecánico. Las secreciones fueron divididas en dos porciones, tanto para aislamiento viral como bacteriano.

Para el aislamiento viral las muestras fueron colocadas en una solución preservativa y prontamente transportadas en baño de hielo al laboratorio para ser inoculadas en células HFT, HEp-2 y LLCMK. Mediante la observación de los efectos citopáticos, hemadsorción e inmunofluorescencia indirecta se identificaron virus en el 70,5% de las bronquiolitis y en el 59.4% de las bronconeumonía-neumonías. El virus más frecuentemente aislado fue el sincicial respiratorio, seguido del herpes simplex y los adenovirus.

Para el aislamiento bacteriano las muestras fueron inoculadas, a la orilla de la cama del paciente, en agaros sangre, chocolate con isovitalax, Levine y manitol-sal. Se identificaron *Streptococcus* beta hemolíticos del Grupo A, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*.

En niños con bronquiolitis *S. pneumoniae* fue la bacteria más frecuentemente aislada (13,6%) seguida de *Streptococcus sp* (12,5%) en niños con bronconeumonía-neumonía. Se obtuvo una alta eficiencia en el diagnóstico ya que en el 93,2% de los niños con bronquiolitis y en el 87,5% de los niños con bronconeumonía fue posible determinar alguna etiología.

SUMMARY

Nasopharyngeal aspirates were recollected from 76 hospitalized children with acute respiratory infection (ARI). Plastic disposable collectors provided with a sterile feeding probe were used to obtain secretions. Aspirates were immediately transferred to a preservative solution and transferred in an ice bath within thirty to forty minutes of collection for inoculation in cell cultures, the same day of collection. Cell types employed were used to identify viruses in 70,5% of the bronchiolitis and in 59,4% of the broncopneumonia-pneumonia. Respiratory syncytial virus was isolated most frequently, followed by herpes virus and adenovirus.

Samples for bacterial isolation were inoculated on the following agar media: blood, chocolate, Levine and manitol-salt. Presumptive identification of Group A beta hemolytic *Streptococci*, *Streptococcus pneumoniae* and strains of *Staphylococcus aureus* for *Haemophilus influenzae*.

In children with bronchiolitis, *S. pneumoniae* was the bacteria most frequently isolated (13,6%) and broncopneumonia-pneumonias, *Streptococcus sp* (12,5).

Diagnosis was possible in 93,2% of the cases of bronchiolitis and in 87,5% of broncopneumonia-pneumonias.

BIBLIOGRAFIA

1. Almeida, J.D., P. Atanasiu, D.W. Bradley, P.S. Gardner, J. Maynard, A.W. Schuurs, A. Voller & R.H. Yolken: Manual for Rapid Laboratory Viral Diagnosis. Bull. World Hlth. Org. 1979.
2. Bromberg, K., L.M. Clarke, E.D. Curran & M.F. Sierra: Inoculation of HEp-2 cells for respiratory syncytial virus isolation. Clin. Pediatr. 22: 62, 1983.
3. Chavarría, J.F., L. Mata, E. Mohs & R. González: Estudio sobre infección respiratoria aguda en Costa Rica, 1982-1983. Bol. Of. Sanit. Pan. En prensa, 1985.
4. Chanock, R.M. Parainfluenza Viruses. In: Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. Editors Lennette, E.H., N.J. Schmidt. Am. Pub. Hlth Ass., Washington. pp 611-632, 1979.
5. Facklam, R.R.: Streptococci and Aerococci. In: Manual of Clinical Microbiology. Editors Lennette, E.H., A. Balows, W.J. Hausler, J.P. Truant. Amer. Soc. Microbiol., Washington. pp 88-110, 1980.
6. Frank, A.L., R.B. Couch, C.A. Griffis & B.D. Baxter: Comparison of different tissue cultures for isolation and quantification of J. Clin. Microbiol. 10: 32, 1979.

7. Isenberg, H.D., J.A. Washington, A. Balows & A.C. Sonnenwirth: Collection, handling, and processing of specimens. In: Manual of Clinical Microbiology. Editors Lennette, E.H., A. Balows, W.J. Hausler, J.P. Truant. American Society for Microbiology. Washington pp 59-60, 1980.
8. Jennings, R. & L.S. Grant: Respiratory viruses in Jamaica. A virologic and serology study. *Amer. J. Epidemiol.* 86: 690, 1957.
9. Kilian, M: Haemophilus. In: Manual of Clinical Microbiology. Editors Lennette, E.H., A. Balows, W.J. Hausler, J.P. Truant. American Society for Microbiology. Washington pp 330-336, 1980.
10. Loda, F.A., W.A. Clyde, W.P. Glezen, R.J. Senior, Ch. I. Sheaffer & F.W. Denny: Studies on the role of viruses, bacteria and *M. pneumoniae* as causes of lower respiratory tract infections in children. *J. Pediat.* 72: 161, 1968.
11. Mac. Faddin, J.F.: Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. Williams & Wilkins. Baltimore p 245, 1980.
12. Mohs, E.: Infecciones respiratorias agudas en Costa Rica, 1965-1980: Prevalencia, gravedad y letalidad. *Bol. Of. Sanit. Pan.* 94: 535, 1983.
13. Monto, A.S. & J.J. Cavallaro: The Tecumseh study of respiratory illness. II Patterns of occurrence of infection with respiratory pathogens, 1965-1969.
14. Monto, A.S. & K.M. Johnson: A community study of respiratory infections in the tropics. I Description of the community and observations on the activity of certain respiratory agents. *Amer. J. Epidemiol.* 86: 78, 1967.
15. Pan American Health Organization: Acute respiratory infections in children. PAHO, Washington, D.C., pp 1-101, 1982.
16. Parrot, R.H., H. Wkim, C.D. Brand, M.O. Been, L. Richardson, J.L. Gerin & R.M. Chanock: Respiratory Syncytial virus. In: Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. Editors Lennette, E.H., Schmidt, N.J. American Public Health Association pp 695-708, 1979.
17. Phefan, P.D., L.f. Landau & A. Ofinsky: Epidemiology of acute respiratory infections. In: Respiratory Illness in Children. Blackwell Scientific Publications, Melbourne pp 29-50, 1982.
18. Salas, P., L. Mata & J.F. Chavarria: Estudio sobre infección respiratoria aguda en Costa Rica. Virus aislados al momento del internamiento. *Bol. Of. Sanit. Pan.* En prensa, 1985.
19. Shelokow, A., J.E. Voge & L. Chi: Hemadsorption (Adsorption-Hemagglutination). Test for viral agents in tissue culture with special reference to influenza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 97:802, 1958.
20. Spence, L. & N. Barrat: Respiratory infections in Trinidadian patients. *Amer. J. Epidemiol.* 99: 257, 1968.
21. Sutmoller, F., J.P. Nascimento, J.R.S. Chaves, V. Ferreira & M.S. Pereira: Viral etiology of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: first two years of a longitudinal study. *Bull. Wold. Hlth. Org.* 61: 845, 1983.