# DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO[1]

## VIROLOGICAL DIAGNOSIS OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

[2] Leidy Viviana Ávila Adarme.
[3] Jaime E. Castellanos.

### Resumen

La enfermedad respiratoria aguda se define como un conjunto de infecciones del tracto respiratorio que pueden ser causadas por una gran variedad de microorganismos tanto virales como bacterianos, y que constituyen un importante problema de salud pública en el mundo. La infección por Virus Sincitial Respiratorio (VSR) está catalogada como una de las principales causas de enfermedad respiratoria aguda, presentándose especialmente en niños menores de dos años. La falta de diagnóstico confiable de la etiología en las infecciones respiratorias, da como resultado un manejo inadecuado de los pacientes, lo cual puede originar varios tipos de complicaciones. Por tal razón, en esta revisión de la literatura nos enfocamos en presentar un panorama general de la situación de las infecciones respiratorias debidas a VSR en Latinoamérica y las principales dificultades que se presentan al realizar el diagnostico virológico. Para

### Abstract

Acute respiratory disease is defined as a set of respiratory tract infections that can be caused by a variety of both viral and bacterial microorganisms, which constitute a major public health problem in the world. Respiratory Syncytial Virus (RSV) infection is listed as a major cause of acute respiratory disease, occurring especially in children less than two years old. The lack of accurate diagnosis of respiratory infections etiology, results in an inadequate management of patients, which can cause lots of complications. Thus, this review is focused on presenting an overview of the status of respiratory infections due to RSV in Latin America and the main difficulties related with performing the virological diagnosis. For the specific case of RSV, since all etiologic agents produce similar symptoms, clinical signs cannot be taken as a reference to distinguish the etiological agent of the disease, so, in this paper we describe strategies for diagnosis of RSV such as

Recibido el 26/02/2013
Aprobado el 20/05/2013

1. Artículo de revisión. Grupo Patogénesis Infecciosa, Universidad Nacional de Colombia y Grupo de Virología, División de investigaciones Universidad El Bosque
2. Odontóloga. Candidata a Magíster en Ciencias- Microbiología, Universidad Nacional de Colombia. Grupo Patogénesis Infecciosa, Universidad Nacional de Colombia.
3. PhD. Grupo de Virología, División de investigaciones Universidad El Bosque. Grupo Patogénesis Infecciosa, Universidad Nacional de Colombia castellanosjaime@unbosque.edu.co

el caso puntual del VSR debido a que todos los agentes etiológicos producen signos y síntomas similares, estos no pueden ser tomados como referencia para distinguir el agente etiológico asociado, así que, en este trabajo se describen las estrategias para realizar el diagnostico de VSR como por ejemplo los que se encargan de detectar anticuerpos específicos en el suero y también los métodos de detección del virus directamente en la muestra de secreción respiratoria, es decir el aislamiento viral en cultivo celular, la detección de antígenos por fluorescencia y la detección de ácidos nucleicos.

**Palabras clave:** Infección por Virus Sincitial Respiratorio, Diagnostico virológico.

those that detects specific antibodies in serum and also methods that directly detects the virus in the respiratory secretion sample, in other words, the viral isolation in cell culture, antigens and nucleic acid detection.

**Key words:** Respiratory Syncytial Virus Infection, virological diagnosis.

## INTRODUCCIÓN

La infección respiratoria aguda (IRA) es la enfermedad más frecuente en todas las etapas de la vida del ser humano; está condicionada fundamentalmente por la edad, las circunstancias medioambientales que influyen sobre el hospedero, el ámbito asistencial, las enfermedades sistémicas asociadas y varía en cuanto a su etiología o agente causal (1). Adicionalmente, las infecciones respiratorias agudas de vías bajas (IRAB) son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad de niños en el mundo, particularmente en países subdesarrollados (2). Entre los numerosos microorganismos causantes, los virus se reconocen como los agentes etiológicos predominantes en las infecciones respiratorias agudas, tanto en niños como en adultos (3). Los agentes etiológicos virales más comunes en las infecciones respiratorias incluyen: Adenovirus (AdV), Influenza A y B (Flu A y Flu B), Parainfluenza 1, 2, 3 y 4 (PIV 1, 2, 3), Virus Sincitial Respiratorio humano (hVSR), Coronavirus Humano (hCoV), Rinovirus (RV), Enterovirus (EV) y Bocavirus Humano (hBoV) entre otros (4), y entre de estos, el VSR es el agente etiológico que se presenta con mayor frecuencia en las enfermedades respiratorias agudas (5). Previamente, se ha descrito que casi todos los niños presentan evidencia serológica de infección por VSR a la edad de dos años. La primoinfección por este virus casi siempre es sintomática y los casos más severos se presentan durante los primeros 6 meses de vida (6).

## GENERALIDADES DEL VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO

El Virus Sincitial Respiratorio pertenece a la familia *Paramyxoviridae,* subfamilia *Pneumovirinae,* y dentro de ella al género *Pneumovirus*. Como se representa

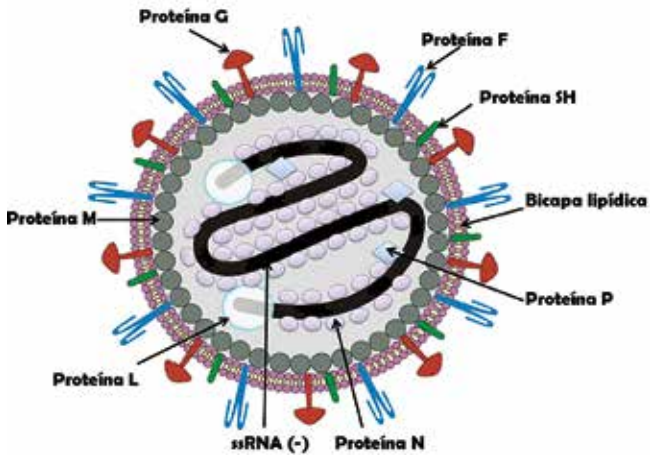



Figura 1. Esquema de la estructura del Virus Sincitial Respiratorio.

en la Figura 1, este es un virus con envoltura lipídica cuya información genética está codificada en forma de RNA no segmentado de cadena sencilla de polaridad negativa (7). La nucleocápside del VSR tiene entre 150 – 300 nm de diámetro y presenta glicoproteínas ancladas a su membrana: La proteína G que participa en la adhesión y la proteína F que le permite fusionarse con las células hospederas, estas son las proteínas que participan en la formación de sincitios, principal efecto citopático característico de este virus.

Adicionalmente, el virus codifica para la proteína de la matriz M que está involucrada con la morfogénesis del virión, dos proteínas no estructurales NS1 y NS2 que participan en la replicación del virus y, la proteína SH, cuya función aún no está muy clara ya que al hacer una deleción de este gen el virus no pierde su

viabilidad aunque es ligeramente menos virulento. El RNA viral está asociado a la nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P) y la polimerasa viral (L), las cuales conforman la nucleocápside helicoidal. La replicación del genoma y síntesis de proteínas, se llevan a cabo en el citoplasma de la célula del hospedero, y luego, las nuevas partículas virales salen de la célula propagándose y alcanzando nuevos hospederos (7). En relación con el VSR se han identificado dos grupos antigénicos A y B, que difieren en la secuencia de aminoácidos de las glicoproteínas de superficie y principalmente la proteína G (8).

El VSR es el principal agente etiológico de IRAB en niños menores de 2 años, quienes presentan los cuadros clínicos más severos. Infecciones por VSR se detectan en un rango que oscila entre el 40% y 70%, de los niños hospitalizados, aunque afecta también a adultos mayores e individuos inmunocomprometidos (9). La primoinfección por VSR en niños, es en general sintomática, adquiriéndose en la mayoría de los casos en los primeros años de vida. Este virus es altamente contagioso y se disemina rápidamente en la comunidad durante las épocas frías, ocasionando brotes epidémicos todos los años. La infección por el VSR causa la destrucción del epitelio respiratorio con descamación y alteración ciliar, edema de la mucosa e hipersecreción de moco (10), además se asocia a una gran diversidad de manifestaciones clínicas que pueden variar desde síntomas del resfriado común (rinorrea, cefalea, malestar general), hasta infección respiratoria aguda grave (IRAG) con dificultad respiratoria, sibilancias, crepitaciones, cianosis y episodios de apnea. Se ha reportado que entre el 25% y el 40% de los niños desarrollan síntomas de bronquiolitis y neumonía durante su primera infección (11), y es justo por esta razón que estos cuadros clínicos son los más frecuentemente asociados a la infección por este virus. El VSR es trasmitido por secreciones contaminadas de un contacto cercano, en forma directa o por medio de fómites (12); cabe citar también que infecciones previas debidas al VSR no confieren protección al individuo y por tanto las reinfecciones son comunes a lo largo de la vida (13).

Los virus RNA tienen como característica ser capaces de experimentar reorganización en sus genes y mutaciones que determinan cambios de mayor o menor magnitud en sus antígenos externos. Esto lleva a que aparezcan variantes virales que se diferencian parcial o totalmente de las conocidas por el sistema inmune del huésped (14). En el caso del VSR, hay dos grupos antigénicos, el subtipo A y el B que difieren principalmente en la secuencia de aminoácidos de la proteína de unión (Proteina G), esta proteína varia en un 44% aproximadamente entre los dos subgrupos (15); por otra parte, también se han observado diferencias cercanas la 20% en la proteína G dentro del mismo subgrupo antigénico (16, 17). En este orden de ideas y por los argumentos expuestos anteriormente, se puede explicar como la variabilidad entre cepas favorece la habilidad del virus para evadir el sistema inmune y de esta forma establecer reinfecciones en un mismo hospedero (18, 19).

Respecto a la severidad de la enfermedad, se ha encontrado que factores como el nacimiento pretérmino, bajo peso al nacer y enfermedad cardiopulmonar, son predisponentes en niños menores de un año para sufrir infecciones respiratorias graves. Por estas razones, estos niños son los que requieren mayor permanencia hospitalaria, ingreso a unidades de cuidados intensivos y ventilación mecánica por periodos más prolongados (20). Giubergia y cols., (2004) analizaron diferentes variables en 461 pacientes con diagnóstico de IRAB causada por VSR en un periodo de un año. Las variables de severidad analizadas en niños con estos factores de riesgo para sufrir IRAB por VSR fueron: recién nacidos pretérmino (≤34 semanas), prematuros, menores de 6 meses al momento de la infección, recién nacidos a término menores de 45 días, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, displasia broncopulmonar, fibrosis quística y cardiopatías congénitas. En ese trabajo, se dividió a la población en dos grupos: sin factores de riesgo (57,3%) y con factores de riesgo (42,7%). Las formas clínicas que se presentaron más frecuentemente fueron bronquiolitis (72,2%) y neumonía (13,9%), y la mortalidad del grupo de pacientes con factores de riesgo fue 1,04%. Estos datos ayudan a definir en qué tipo pacientes deberían implementarse medidas preventivas y terapéuticas más tempranas para mejorar su evolución y pronóstico, ya que además los niños con infección por VSR con factores de riesgo requirieron mayor tiempo de hospitalización y oxigenoterapia y tuvieron mayor probabilidad de requerir asistencia ventilatoria mecánica (21).

Al referirse a diagnósticos definitivos en los pacientes con infecciones respiratorias agudas, debido a la gran variedad de patógenos que las causan y, a que todos producen signos y síntomas similares, estos no pueden ser tomados como referencia para distinguir el causante etiológico de la patología, haciéndose necesaria la confirmación por el laboratorio del responsable de la infección en cada caso (22). Dicha confirmación, se hace generalmente detectando antígenos virales en las secreciones respiratorias de los pacientes. En este orden de ideas la Inmunofluorescencia indirecta (IFI) es la técnica más usada debido a que es la más rápida,

aunque su especificidad y sensibilidad varían dependiendo de muchos factores incluida la calidad de la muestra tomada para la evaluación (23).

## VIRUS SINCITIAL RESPIRATORIO EN LATINOAMÉRICA

Con la finalidad de identificar los agentes virales asociados a infecciones respiratorias agudas en pacientes del estado Zulia en Venezuela, entre febrero 2005 y julio de 2006, se estudiaron un total de 102 muestras provenientes del tracto respiratorio (hisopado nasal, faríngeo y/o nasofaríngeo, esputo y lavado broncoalveolar) de pacientes con clínica de IRA. Las infecciones respiratorias del tracto inferior fueron las más frecuentes (67,4%). El aislamiento viral se realizó a través del cultivo celular y la identificación del agente patógeno por la técnica de inmunofluorescencia directa. Se obtuvieron 46 muestras positivas (45%), Los pacientes estudiados estuvieron en un rango de edad comprendido entre 6 meses y 77 años. El mayor número de muestras fue obtenido en adultos jóvenes de 20 a 40 años (26,4%). El VSR fue el agente que se presentó con mayor frecuencia (32,6%), seguido de AdV (28,2%), PIV (23,9%) y Flu (15,2%) (24).

En Argentina, Maffey y cols. (2008) evaluaron la prevalencia y circulación estacional de virus respiratorios utilizando RT-PCR e inmunofluorescencia. Se incluyeron pacientes de 2 meses a 3 años con sibilancias recurrentes hospitalizados por obstrucción bronquial y con factores de riesgo para desarrollar asma. Se obtuvieron secreciones respiratorias por aspirado nasofaríngeo y se utilizó la técnica de inmunofluorescencia para detectar VSR, AdV, PIV 1, 2 y 3 e Flu A y B. Por otra parte se uso la PCR para detectar RV, EV, VSR, hBoV, AdV y CoV. En total se evaluaron 119 muestras de pacientes y se hallaron 102 (86%) casos positivos para al menos un virus. El 55% de los virus se detectó por Inmunofluorescencia y el 45% por PCR. El 75% de las muestras respiratorias presentó un solo agente viral, el 22% una coinfección doble y el 3% una coinfección triple. La proporción de los virus respiratorios detectados fue: VSR 43%, RV 23%, hMPV 10%, Flu A 6%, EV 5%, BoV 5%, AdV 3%, hCoV 2%, PIV -1: 1%. Flu B, 1% y PIV-3: 1%. De lo cual se concluyó que los lactantes y niños pequeños con sibilancias recurrentes hospitalizados por obstrucción bronquial presentan una elevada prevalencia de virus respiratorios. La técnica de inmunofluorescencia tradicionalmente usada evalúa la presencia de agentes virales como VSR, AdV, Flu A y B y PIV 1, 2 y 3, pero las coinfecciones establecidas por la participación de uno de los demás virus pueden favorecer el desarrollo de infecciones nosocomiales múltiples de origen viral, por tanto estos virus deben ser incluidos en los protocolos de evaluación de muestras respiratorias de rutina los cuales son generalmente hechos por inmunofluorescencia (25).

En Chile se realizó un estudio en 86 pacientes adultos hospitalizados por infección respiratoria viral diagnosticada por inmunofluorescencia directa para describir la presencia de virus respiratorios, y sus características clínicas y epidemiológicas. Se evaluaron los virus Flu, VSR, PIV y AdV. El 73.5% de las muestras fueron positivas para Flu (48,2%, FluA y 25,3% FluB), y 26,5% fueron positivos para el resto de los virus así: 15,7% para PIV-2; 8,4% para VSR; 1,2% para PIV-3 y 1,2% AdV (26). Por tanto se concluyó que durante la temporada de influenza de 2004 en Chile, el 26,5% de las infecciones en adultos hospitalizados fueron causadas por virus diferentes a Influenza y debido a la dificultad que hay para diferenciar clínicamente infecciones por Influenza y otros virus respiratorios, se planteó la necesidad de ampliar el estudio de la etiología viral para tener diagnósticos etiológicos precisos de las infecciones respiratorias agudas. En ese trabajo se muestran las diferencias existentes en la circulación viral, entre países dependiendo si son tropicales o no, evidenciando que fueron predominantes los virus de influenza.

En Bogotá, Mojica y cols. (2008) reportaron un estudio para detectar y tipificar el VSR mediante la técnica RT- PCR anidada en pacientes con infección respiratoria aguda. Se incluyeron en total 30 muestras entre hisopados y aspirados nasofaríngeos provenientes de enfermos con clínica compatible con IRA, reportados como positivos o negativos para el VSR por inmunofluorescencia. Se aplicó una técnica molecular de RT-PCR seguida de un PCR anidada, usando como blanco de amplificación el gen de la nucleocápside, que diferencia los tipos A y B gracias al tamaño de sus amplicones. Del total de las muestras, 2 resultaron positivas para VSR tipo A, 16 positivas para VSR tipo B, y 7 mostraron una coinfección por los tipos A y B; 5 fueron negativas para VSR. Al comparar los resultados encontrados por RT-PCR con los de la inmunofluorescencia, se observó una concordancia del 100% entre las dos técnicas debido a que la RT-PCR anidada detectó la totalidad de muestras previamente positivas por IFI (25 muestras positivas y 5 negativas). Los autores sugieren que el protocolo de RT-PCR presentado ofrece una alternativa rápida y eficaz para la detección y tipificación del VSR a partir de muestras respiratorias (27).

El diagnóstico de la entidad y específicamente, la detección y caracterización de ciertos agentes como el VSR usando los métodos convencionales (IFI), presenta algunas falencias que pruebas moleculares como la RT-PCR tratan de resolver y esta, a su vez sirve para subtipificar el virus lo cual podría permitir realizar estudios epidemiológicos de este virus (28), esta información es necesaria en nuestro país, puesto que no se conocen con certeza los patrones de circulación del VSR y mucho menos de sus subgrupos (A y B). Otro punto importante, es que la búsqueda activa del virus en personas que tienen infecciones respiratorias, permite establecer el momento en que está comenzando un brote y preparar los servicios de salud para un aumento en la demanda de consultas, permitiendo también establecer el período en que las personas de mayor riesgo deben utilizar medidas preventivas para evitar el contagio. En este orden de ideas, los métodos para el diagnóstico disponibles para identificar virus deben por tanto ser sensibles, permitiendo la identificación de los pacientes que padecen la infección y así efectuar un adecuado manejo de los síntomas e interrumpir el ciclo de transmisión (29). Se ha propuesto que los métodos de diagnóstico virológico para VSR deben incluir tres pruebas mínimas para confirmar un caso probable como verdadero positivo, debido a que ninguno es sensible en un cien por ciento. Estos métodos son el cultivo celular para realizar aislamiento viral, detección de antígenos por inmunofluorescencia y amplificación del RNA viral por RT-PCR (1).

Palomino y cols. (2004) realizaron un estudio en Chile, para evaluar la asociación entre los grupos A y B de VSR con la severidad clínica. Se estudiaron lactantes hospitalizados por IRAB debida a VSR. Se determinó el predominio de VSR B en el año 1994, el VSR A lo hizo entre 1995 y 1997 y entre 1999 y 2002; en 1998 la proporción de VSR A y B fue similar, apareciendo primero A y luego B. Los grupos no mostraron diferencias significativas en días de hospitalización, pero el requerimiento de oxígeno fue significativamente mayor en el grupo con VSR B identificado, con predominio de neumonías. En ese trabajo, se encontró asociación significativa entre la severidad de las IRAB y la presencia de VSR del grupo B, ya que el diagnóstico de bronconeumonía fue significativamente mayor en este (30).

## TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS RESPIRATORIOS

El diagnóstico específico del VSR se hace mediante la detección del virus, sus antígenos o por el hallazgo de secuencias específicas de su material genético en las secreciones respiratorias (14). El tipo y calidad de las muestras son muy importantes para garantizar la sensibilidad y especificidad de las pruebas que se llevan a cabo para la detección viral. Se ha demostrado que los lavados nasales o aspirados nasofaríngeos son las muestras que ofrecen la mayor sensibilidad para la detección del virus cuando se compara con hisopados nasofaríngeos (31). Sin embargo la toma de hisopados es menos incomoda para el paciente, no requiere equipos especiales y también pueden ser tomadas en pacientes que no estén hospitalizados. Durante la toma del hisopado hay que tener en cuenta que se obtengan células de la nasofaringe infectadas con el virus, para este fin se ha visto que los hisopos fibrosos son mas efectivos y mejoran la calidad de la muestra incrementando la posibilidad de obtener un buen resultado diagnostico (31). Otros métodos de laboratorio incluyen aislamiento viral en cultivo celular, detección de antígenos virales por IFI o por ELISA y la detección de ácidos nucleicos por ensayos como la RT-PCR (32).

## DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LOS VIRUS RESPIRATORIOS

Como se anotó previamente, el diagnóstico virológico de la etiología de la infección respiratoria aguda resulta fundamental, debido a que representa una ayuda importante en el manejo del paciente y el control de los brotes epidémicos anuales (33) aunque el manejo clínico de las infecciones respiratorias virales es similar, así sea causado por virus como influenza, adenovirus, parainfluenza o virus sincitial respiratorio, conocer el agente implicado permite disminuir el uso de antibióticos, orientar el manejo individual del paciente, aislarlo y de esta forma interrumpir la transmisión. Este diagnóstico puede adoptar una estrategia doble; por una parte, la que se fundamenta en métodos directos, como los que son capaces de recuperar el virus mediante su aislamiento en cultivo celular y aquellos que permiten detectar el virus en las secreciones respiratorias del paciente (detección de antígenos y/o de ácidos nucleicos). De otra parte, el diagnóstico indirecto que valora la presencia de una respuesta inmunitaria de tipo humoral mediante la detección de anticuerpos específicos en el suero (14).

La detección en las secreciones, de antígenos y ácidos nucleicos virales permite la realización de un diagnóstico rápido, que ayuda a la toma de decisiones terapéuticas. Por el contrario, el aislamiento en cultivo celular es un diagnóstico dispendioso, costoso y demorado, pero de extraordinaria importancia en la caracterización epidemiológica, antigénica y filogené-

tica de estos virus. En la actualidad, el interés de la serología se encuentra principalmente en la realización de estudios poblacionales para la evaluación de la cobertura vacunal (32).

## RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

El requisito principal a la hora de valorar las muestras del tracto respiratorio es que estas deben contener el mayor número posible de células epiteliales, que son en las que fundamentalmente se replica y se puede encontrar el virus. Para detectar los microorganismos asociados a las enfermedades respiratorias existe una amplia variedad de técnicas para tomar muestras como los hisopados nasales, nasofaríngeos y orofaríngeos, aspirados nasofaríngeos, lavados nasales, esputo y muestras de saliva entre otras, las cuales deben ser obtenidas durante los primeros días de la enfermedad (34). El transporte de las muestras debe realizarse refrigeradas (a 4 °C) con objeto de asegurar la infectividad de las partículas virales para el caso del aislamiento en celulas. La recuperación de los virus respiratorios se favorece con un medio de transporte adecuado, que consiste en una solución salina a pH neutro con estabilizadores de proteínas, como albúmina sérica bovina, antifúngicos y antibióticos para reducir el crecimiento de bacterias y hongos que pueden estar presentes en la muestra (34).

## AISLAMIENTO MEDIANTE CULTIVO CELULAR

Desde hace muchos años se ha utilizado el aislamiento viral mediante la implementación de cultivos celulares como parte del diagnóstico virológico. Luego de inocular las muestras en diferentes líneas celulares, se puede observar el efecto citopático que demuestra la replicación viral para después hacer su identificación (35) (Figura 2A).

El aislamiento viral depende de diversos factores, entre los cuales se encuentran la calidad de la muestra clínica, los reactivos requeridos en el proceso, la susceptibilidad de los cultivos celulares elegidos y la experiencia técnica del personal que realiza los diferentes procedimientos. Una vez los virus se aíslan, se facilita su análisis posterior, por ejemplo, la caracterización de cepas circulantes, los estudios fenotípicos de resistencia a antivirales y el descubrimiento de nuevos virus o serotipos (36).

El aislamiento viral ha sido considerado el estándar para la detección de virus y es el método de referencia

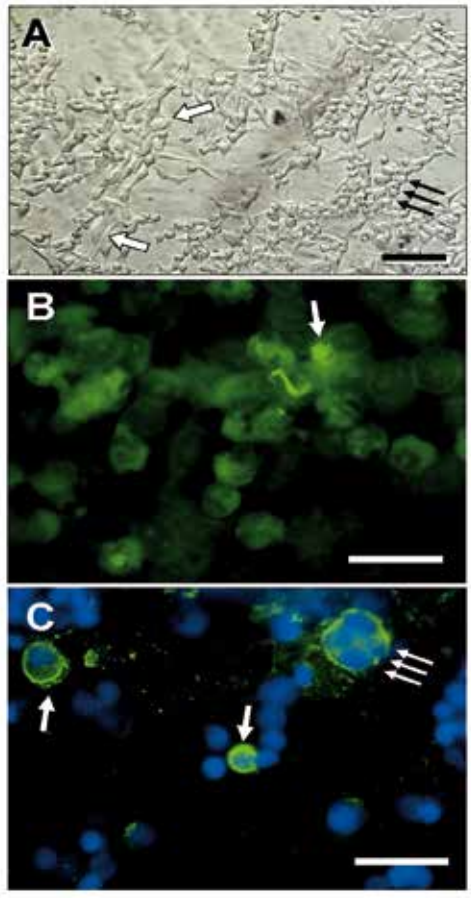



Figura 2. A. Aspecto en contraste de fase de células Hep-2 infectadas con VSR. Se observan células normales con forma de huso y además células redondeadas (flechas negras), en su primera fase del efecto citopático. También se pueden ver células de mayor tamaño, que se han fusionado por la expresión de la proteína viral F en su superficie (sincitios, flechas blancas). La barra corresponde a 100 µm. B. Células Hep-2 inoculadas con una muestra de secreción respiratoria para hacer aislamiento viral. Se observa una célula marcada con el anticuerpo anti-VSR y el patrón de fluorescencia punteado característico (flecha blanca). C. Control positivo de la Inmunofluorescencia para VSR del sistema Light Diagnostic Respiratory Panel (Chemicon, Millipore), el cual se procesa simultáneamente con las muestras de secreción. Las flechas blancas muestran células infectadas; la triple flecha señala una célula multinucleada positiva para VSR (sincitio). Las barras en B y C corresponden a 40 µm.

ya que por medio de este se puede hacer la confirmación de la infectividad del virus posibilitándose así la identificación de los virus capaces e incapaces de infectar y causar enfermedad; cosa que no es posible hacerse por medio de el uso de métodos de amplificación de ácidos nucleicos ni con los de detección de antígenos virales, volviéndose de esta forma el aislamiento viral en cultivo celular una herramienta muy útil (36). Hay que tener en cuenta que el buen manejo y la preparación de las muestras clínicas para este fin

debe ser ideal, debido a que los virus respiratorios se inactivan muy fácilmente (1).

Para el aislamiento de VSR se usan frecuentemente cultivos de células Hep-2 (células de carcinoma epidermoide humano) aunque también suelen implementarse cultivos de células primarias de riñón de mono o fibroblastos humanos, luego de la infección de estas células, se espera la aparición de efecto citopático (ECP) dentro de los 3–7 días siguientes (1, 37); dicha aparición de ECP permite la identificación de la replicación viral en la monocapa de células, el cual consiste en la aparición de células degenerativas y redondeadas de gran tamaño y que poseen más de un núcleo. Posteriormente, la caracterización del virus aislado se realiza por inmunofluorescencia mediante la utilización de anticuerpos monoclonales, esta caracterización se hace muy importante en los casos en los que el ECP no es claro o muy difícil de apreciar (32). Una de las principales limitaciones del aislamiento viral es el tiempo necesario de crecimiento e identificación en cultivo celular (3–7días). En el sistema de cultivo celular en *shell vial* se realiza la centrifugación de las muestras cuando estas ya están en contacto con la monocapa facilitándose de esta forma la adhesión y penetración viral detectándose el ECP en las 24–48h siguientes y la presencia de proteínas virales mediante inmunofluorescencia mas rápidamente (1).

## DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES EN MUESTRAS DE SECRECIÓN RESPIRATORIA

Los métodos basados en la detección de los antígenos virales a pesar de necesitar una alta calidad de muestra tienen como ventaja ser independientes de la capacidad infectiva del virus, además permiten una obtención rápida de resultados, luego de la recepción de la muestra se necesitan de 4 a 6 horas para conocerlos (Figura 2B). Cabe señalar también que una de las desventajas más frecuentes es la dificultad de interpretación de los resultados, porque la especificidad se verá reflejada en el evaluador y su experiencia; adicionalmente la sensibilidad de estas técnicas suele ser baja (38). Estos métodos son usados para la detección directa de antígenos virales en la muestra clínica o en cultivos celulares infectados previamente. Los anticuerpos utilizados para el diagnóstico van dirigidos contra los antígenos que se sitúan en la superficie del virus y debido a la continua variación evolutiva de estas moléculas de superficie es presumible que sea necesario cambiar el anticuerpo cada cierto tiempo. Por esta razón, se ha propuesto evaluar la presencia de otras proteínas menos expuestas por tanto menos variables como la nucleoproteína (39).

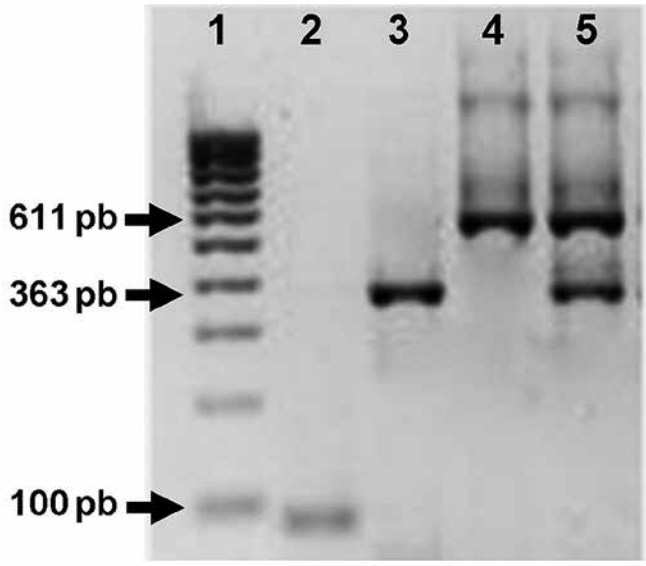



Figura 3. Detección de ARN viral del VSR por RT-PCR.

## DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Los métodos moleculares implementados para el diagnóstico, permiten la detección de ácidos nucleicos basados en la búsqueda y el reconocimiento del genoma viral en el cultivo celular o en la muestra clínica. La reacción en cadena de la polimerasa *(Polymerase Chain Reaction,* PCR) es la técnica mas empleada, tanto la técnica convencional como en la de tiempo real (*quantitative PCR* o *qPCR*). En el caso del VSR, antes de la reacción de amplificación debe hacerse una reacción de transcripción inversa para transformar el RNA del virus en cDNA. Regularmente, las técnicas de PCR están diseñadas para evaluar la presencia de secuencias génicas muy conservadas, como las que codifican para las proteínas G y F, y el evaluar la proteína G también podría permitir la diferenciación entre los subtipos A y B del VSR (31).

La PCR convencional presenta un inconveniente respecto a que es un método cualitativo, por lo cual muchas veces requiere la aplicación de una segunda ronda de PCR (PCR anidada o *nested-PCR)* para alcanzar una sensibilidad similar a la que se obtiene con una qPCR, esto incrementa el tiempo necesario hasta la obtención de los resultados, aumenta la carga de trabajo, y presenta un mayor riesgo de contaminaciones y falsos positivos. Un ejemplo de este tipo de técnica cualitativa puede evidenciarse en la Figura 3.

Por tanto en las PCR en tiempo real, el empleo de diferentes sondas marcadas fluorogénicamente (TaqMan, sondas de hibridación, molecular beacon), cebadores marcados que dan lugar a un amplicón fluorescente (primers scorpions, primers sunrise) o de agentes intercalantes, como el SYBR-Green, están desplazando el uso de la PCR convencional (40). Estos métodos de qPCR permiten la cuantificación y minimizan la necesidad de un análisis posterior de los amplicones obtenidos, además de reducir el riesgo de contaminaciones y el tiempo requerido en la emisión de los resultados (40).

## VALIDEZ DE UNA PRUEBA DIAGNÓSTICA: SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS PRUEBAS PARA VSR

Durante el proceso diagnóstico deben intervenir, la historia clínica, la exploración física y la realización de pruebas complementarias (41). Cuando existen varios diagnósticos presuntivos, se deben realizar pruebas complementarias que lleven al diagnóstico diferencial de cada una de las posibles etiologías de la enfermedad. Por obvias razones, la mejor prueba diagnóstica será aquella que arroje resultados positivos para enfermos y negativos para pacientes que no lo están o que no tienen el microorganismo en evaluación (42). En este orden de ideas una prueba diagnóstica fidedigna debe tener **validez**, que quiere decir el grado en que una prueba mide lo que se supone que debe medir y corresponde a la exactitud diagnóstica y se relaciona con la frecuencia con que el resultado del test es confirmado por procedimientos diagnósticos más complejos y rigurosos. La validez diagnóstica viene determinada por la especificidad y la sensibilidad de una prueba (43).

La **sensibilidad** se define como la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad. De ahí que también la sensibilidad se conozca como "tasa de verdaderos positivos" (44). Por otra parte, la **especificidad** es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para excluir a los sanos. De ahí que también sea denominada "tasa de verdaderos negativos".

La seguridad de una prueba diagnóstica, es el grado en el que una prueba predice la presencia o ausencia de enfermedad, es decir la probabilidad de padecer la enfermedad cuando el resultado de la prueba es positiva (44, 45). Otro término importante es el **valor predictivo positivo**, que es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test, es decir, es el número de resultados que finalmente resultan verdaderamente positivos de entre todos aquellos que la prueba determina como positivos (suma de positivos y de falsos positivos), en tanto que el **valor predictivo negativo**, es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano, o sea, es el número de resultados que finalmente resultan negativos de entre todos aquellos que la prueba determina como negativos(42, 44).

La *reproducibilidad* es la capacidad de la prueba para ofrecer los mismos resultados cuando se repite su aplicación en circunstancias similares; la variabilidad biológica del hecho observado, la introducida por el propio observador y la derivada del propio test, determinan su reproducibilidad (42). Por ejemplo en una prueba realizada en adultos con enfermedad respiratoria de diferentes grupos de edad y enfermedades de base, se comparó una RT-PCR anidada en un solo tubo, con el aislamiento viral en cultivo celular y una prueba serológica por inmunoensayo enzimático midiendo IgG en suero para diagnosticar la presencia de VSR. Se tomaron 1112 hisopados nasales, se les realizaron las 3 pruebas mencionadas anteriormente, 117 fueron positivas para VSR por al menos un método y 995 fueron negativos por todos los métodos. 110 fueron considerados como verdaderos positivos ya que el cultivo o la serología fueron positivos. De estos, 80 (73%) fueron positivos por RT-PCR mientras que solo 43 (39%) fueron positivos por cultivo. Siete de los casos que fueron positivos por PCR se consideraron como falsos positivos porque el cultivo celular y la serología fueron negativos. De lo anterior se podría concluir que la sensibilidad de la RT-PCR en este estudio fue 73% y la especificidad estuvo cercana a 99% (46).

Louie y cols. reportaron un estudio en el 2005 por medio de la implementación de PCR y cultivo celular en *shell vial*. Buscaron caracterizar los virus causantes de infección respiratoria en adultos durante la temporada de influenza. Durante los meses de enero a marzo de 2002, se tomaron lavados nasofaríngeos de adultos con síntomas respiratorios. Se evaluaron 266 muestras respiratorias, de estas 103 (39%) resultaron positivas para al menos un virus por cualquiera de las dos técnicas (52 por cultivo y 100 por PCR). Con respecto al diagnóstico clínico, se observó predominio de infecciones respiratorias altas, seguido por sinusitis y faringitis; se encontró que Flu A y B estaban

presentes en el 54% de las muestras, RV en el 28%, VSR en el 12%, hMPV en el 9% y CoV y AdV en un 2%. En ese estudio también se presentaron infecciones respiratorias agudas de vías bajas, siendo la neumonía el principal diagnóstico clínico. Se demostró predominancia de etiología viral en los casos de bronquitis (62,5%), faringitis (57,1%) y neumonía (47,6%). La PCR encontró 17 casos de Flu A y 1 de PIV-1 que fueron negativos por shell vial pero falló al detectar 2 casos Flu A, 1 de AdV y 2 con PIV-1 que resultaron positivos en el cultivo. Así, sugieren que la PCR es una herramienta muy útil durante la identificación de patógenos virales no detectados fácilmente por métodos de evaluación tradicionales como el cultivo celular (47).

En un estudio realizado por Casiano y cols. (2003) se procesaron 60 hisopados nasofaríngeos para comparar la sensibilidad de cuatro técnicas de diagnóstico para el VSR (cultivo celular, RT-PCR, serología evaluando niveles de IgG y detección antigénica), se encontró que 54 de las muestras fueron positivas para VSR por al menos una de las técnicas evaluadas: 46 fueron positivas por serología (77%), 49 fueron detectadas por RT-PCR (82%), 28 se identificaron por cultivo celular (46%) y sólo 19 fueron identificadas por detección antigénica (32%) (6 positivas por BD (Becton Dickinson Directigen RSV) (10%), 12 por VIDAS RSV assay (20%) y por IFI 14 (24%). Debido a que la validez de las pruebas diagnósticas evaluadas para VSR está dada en términos de sensibilidad (valor predictivo positivo RT-PCR: 0,90, Cultivo celular 0,51, Serología 0,8 y detección de antígenos 0,3) se concluyó que, las técnicas más sensibles fueron tanto la serología como la RT-PCR y los ensayos menos sensibles fueron los métodos de detección rápida de antígenos (48).

En 2007 Rabagliati y cols. evaluaron el impacto del uso de la PCR en tiempo real (qRT-PCR) en el diagnóstico de infecciones respiratorias por VSR en adultos y caracterizar su perfil clínico. Durante ocho semanas del año 2005, se evaluaron por qRT-PCR para detectar VSR, 114 adultos con síntomas respiratorios internados en un hospital, cuyos hisopados nasofaríngeos fueron negativos para inmunofluorescencia de VSR, Flu-A, -B, PIV-1, 2, 3 y AdV. Se confeccionó una base de datos con los antecedentes clínicos, pruebas de laboratorio y evolución de cada paciente. En 17 de los 114 hisopados (14,9%) se detectó VSR por la qPCR. El perfil clínico de los pacientes estuvo constituido en más del 80% por fiebre, congestión faríngea, tos y signos de obstrucción bronquial. El 30% presentaba enfermedad crónica y 47% eran inmunocomprometidos. 3 pacientes de los 17 (18%) presentaron descompensación de la enfermedad de base y 1 de los 17 (6%) requirió ventilación mecánica. No hubo mortalidad asociada. En este caso el uso de qRT-PCR permitió duplicar la detección de infecciones por VSR en adultos hospitalizados respecto a las diagnosticadas por IFI, por tanto se recomienda considerar el empleo de la técnica de qRT-PCR en aquellos pacientes con sospecha clínica de VSR durante la temporada de mayor circulación viral y con resultados negativos por métodos convencionales debido a la baja sensibilidad de la inmunofluorescencia directa (49).

Templeton y cols. (2004) realizaron la comparación entre la sensibilidad de detección viral por cultivo celular y qPCR. Para esto se desarrolló una PCR multiplex para la detección de una serie de virus respiratorios: Flu A y B, VSR, PIV 1, 2, 3 y 4. Se analizaron un total de 358 muestras de secreciones respiratorias tomadas durante un periodo de un año. En 67 de los 358 (19%) se encontró al menos uno de los virus evaluados por aislamiento viral y 87 de los 358 (24%) por qPCR multiplex. Por cultivo se detectaron 3 casos de Flu A, 2 de Flu B, 57 de VSR, 2 de PIV1 y 2 de PIV3. Todas las muestras positivas por cultivo fueron positivas por qPCR multiplex pero por esta técnica se detectaron además, 5 muestras positivas para Flu A, 6 para VSR, 2 para PIV 1, 1 para PIV2, 1 para PIV3 y 3 para PIV4. Se evidenció que la utilización de qPCR multiplex para evaluar las muestras de secreciones respiratorias, incrementa la sensibilidad para el diagnostico de la etiología de infecciones respiratorias virales. Debido a que los resultados pueden ser obtenidos dentro de las siguientes 6 horas después de haber tomado la muestra. El uso de esta técnica molecular podría mejorar el manejo de los pacientes y el control de las infecciones respiratorias (50).

Los datos anteriormente expuestos señalan la dificultad para dar un diagnostico certero por laboratorio de la etiología de las infecciones respiratorias y por tanto es de gran interés e importancia conocer el número de casos verdaderos positivos que se pasan por alto al evaluar las muestras por inmunofluorescencia directa, confirmando los casos mediante técnicas moleculares como RT-PCR y aislamiento viral; además es relevante saber la distribución geográfica de los diferentes subtipos de VSR.

Para realizar un resumen global de los hallazgos de los anteriores estudios, podemos decir en términos generales que: la inmunofluorescencia es una de las técnicas más ampliamente utilizadas durante el diagnóstico de estas entidades y a pesar de ser más rápida, es menos sensible que el aislamiento viral y se ve afectada por la calidad de la muestra y la carga viral contenida en ella

(51). El cultivo se considera como una prueba importante para el diagnóstico de la etiología de la infección respiratoria aguda, pero actualmente se cuestiona su papel, debido a que cuando es posible llevarlo a cabo, resulta laborioso, demorado, costoso y de sensibilidad variable (52). Para el caso particular del VSR, el método clásico para su diagnóstico es el aislamiento en cultivo celular, pero puede conllevar a resultados falsos negativos ya que este virus es muy lábil (53). Es probable que estas dificultades en el diagnóstico sean las responsables de que se desconozca la etiología en más del 50% de los casos de IRA (27), impidiendo el tratamiento adecuado de la enfermedad. Ante esta situación, se han venido desarrollando técnicas moleculares con diferentes características debido a que algunas, además de identificar y subtipificar el VSR, reconocen diferentes patógenos causantes de IRA simultáneamente, con excelentes resultados (54, 55). Sin embargo, a pesar de los avances en las técnicas y la gran variedad de patógenos que se evalúan en estas, en una gran proporción de episodios de enfermedad respiratoria no puede ser identificado el agente patógeno causante de la enfermedad por tanto aun hace falta investigación y muchos más estudios que demuestren la verdadera superioridad de un ensayo sobre los otros (54).

## CONCLUSIONES

La infección respiratoria aguda es la enfermedad más frecuente en todas las etapas de la vida del ser humano; varía en cuanto a su etiología y está condicionada fundamentalmente por la edad, las circunstancias medioambientales que influyen sobre el hospedero, el ámbito asistencial y las enfermedades sistémicas asociadas (1).

Entre los numerosos microorganismos causantes, los virus son reconocidos como los agentes etiológicos predominantes en las infecciones respiratorias agudas, tanto en niños como en adultos (2).

Los agentes etiológicos virales más comunes en las infecciones respiratorias incluyen los siguientes virus: Adenovirus (AdV), Influenza A y B (Flu A y Flu B), Parainfluenza 1, 2, 3 y 4 (PIV 1, 2, 3), Virus Sincitial Respiratorio humano (hVSR), Coronavirus Humano (hCoV), Rinovirus (RV), Enterovirus (EV) y Bocavirus Humano (hBoV) entre otros (4).

El VSR es el principal agente etiológico de las enfermedades respiratorias agudas como se vio a lo largo de la revisión. Casi todos los niños presentan evidencia serológica de infección por VSR a la edad de dos años (5). La primoinfección por este virus casi siempre es sintomática y los casos más severos se presentan durante los primeros 6 meses de vida (6).

En la literatura se ha reportado que los métodos de diagnóstico virológico, deben realizarse tres pruebas mínimas para confirmar un caso probable como verdadero positivo, debido a que ninguno de ellos tiene una sensibilidad del 100%. Estos métodos son cultivo celular para realizar aislamiento viral, detección de antígenos por inmunofluorescencia y PCR para detectar el genoma viral (1), realizar las tres pruebas es ideal para confirmar los casos, pero implica gastos muy grandes para el sistema, por tanto es necesario proponer un algoritmo para determinar la etiología de las infecciones respiratorias agilizando y optimizando el diagnóstico y así poder determinar el tratamiento adecuado evitando de esta manera la diseminación de los brotes respiratorios y el uso innecesario de antibióticos.

La inmunofluorescencia es una de las técnicas más ampliamente utilizadas durante el diagnóstico de estas entidades y a pesar de ser más rápida, es menos sensible que el aislamiento viral y se ve afectada por la calidad de la muestra (51). El cultivo se considera como una prueba importante para el diagnóstico de la etiología de la infección respiratoria aguda, pero actualmente se cuestiona su papel debido a su sensibilidad variable y costo (52) y puede conllevar a resultados falsos negativos ya que este virus es muy lábil (53). Es probable que estas dificultades en el diagnóstico sean las responsables de que se desconozca la etiología en más del 50% de los casos de IRA (27), impidiendo el tratamiento adecuado de la enfermedad. Ante esta situación, se han venido desarrollando técnicas moleculares para el diagnóstico de los virus causantes de IRA, como una alternativa muy útil aunque son técnicas costosas y el entrenamiento del personal influye mucho en la calidad de los resultados.

Como conclusión general vale la pena resaltar que, el diagnostico preciso y rápido de las infecciones respiratorias es muy importante para mejorar el tratamiento de los pacientes, limitándose así el uso innecesario de antibióticos, también es importante para optimizar el manejo de dichos pacientes previniendo de esta forma la dispersión de infecciones en el ámbito hospitalario por ejemplo por VSR a pacientes pediátricos inmunocomprometidos que pueden desarrollar infecciones respiratorias agudas graves. A nivel de vigilancia, un punto neurálgico es tener un control adecuado de los virus respiratorios conociendo así las cepas circulantes y detectando cualquier cambio que pueda considerarse de alerta, orientando de esta forma la prevención

y el manejo durante la presentación de brotes de enfermedades respiratorias.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento especial a las Dras. Paola Pulido y Janeth Forero del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud por el procesamiento de las muestras usadas para las fotografías del artículo.

## FUENTES DE FINANCIACIÓN

La presente revisión fue realizada en el marco del Proyecto 210 451 928989 financiado por Colciencias, el Instituto Nacional de Salud, la Universidad El Bosque y la Universidad Nacional de Colombia.

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores no reportan conflicto de interés en este artículo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Eiros JM. Ortiz de Lejarazu R., Tenorio A., Casas I., Pozo F., Ruiz G., et al. Diagnóstico microbiológico de las infecciones virales respiratorias. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009; 27: 168–177.
2. Williams BG, Gouws E, Boschi-Pinto C, Bryce J., Dye C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. Lancet Infect Dis. 2002; 2: 25–32.
3. Jennings LC, Anderson TP, Werno AM, Beynon KA. Murdoch DR. Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital: role of polymerase chain reaction and demonstration of multiple infections. Pediatr Infect Dis J. 2004; 23: 1003–1007.
4. 4. Weigl JA, Puppe W, Grondahl B, Schmitt HJ. Epidemiological investigation of nine respiratory pathogens in hospitalized children in Germany using multiplex reverse-transcriptase polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000; 19:336–343.
5. 5. Sigurs N. Epidemiologic and clinical evidence of a respiratory syncytial virus-reactive airway disease link, Am J Respir Crit Care Med. 2001; 163: S2–S6.
6. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK., Edwards KM., Staat MA.,et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. N Engl J Med. 2009; 360: 588-98.
7. Collins p., Crowe J. Paramyxoviridae: Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. En: Knipe D., Howley P. Fields Virology. 5th Edition. Volume II, Section II. 2007.
8. Escobar **B,** Luchsinger V, .Palomino M, Avendaño L. Gravedad clínica de la infección respiratoria aguda baja primaria por Metapneumovirus humano y virus respiratorio sincicial**.** Revista Pediátrica. 2006; 2: 1-4.
9. Shay DK., Holman RC., Newman RD., Liu LL., Stout JW., Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. J Am Med Assoc. 1999; 282: 1440-1446.
10. Bem R., Bos A., Bots M., Wolbink A., Ham SM., Medema JP., et al. Activation of the Granzyme Pathway in Children With Severe Respiratory Syncytial Virus Infection. Pediatric Research. 2008; 63: 650-5.
11. Checchia P. Identification and management of severe respiratory syncytial virus. Am J Health Syst Pharm. 2008; 65: S7-12.
12. Moylett EH, Piedra PA. Respiratory syncytial virus infection: diagnosis, treatment, and prevention. Hosp Med. 1999; 35:10–17.
13. Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. J Pediatr. 2003; 143: S112-7.
14. Murphy BR., Wester RG. Orthomyxoviruses. En: Fields BN, Knippe DM, Howley PM, Virology. 3a ed. NuevaYork: Lippincot-Raven; 1996:1397–445.
15. Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84:5625–9.
16. Anderson LJ, Hendry RM, Pierik LT, Tsou C, McIntosh K. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. J Infect Dis. 1991; 163: 687–92.
17. Cane PA., Matthews DA., Pringle CR. Identification of variable domains of the attachment

(G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. J Gen Virol. 1991; 72:2091–6.

18. Sullender WM, Anderson K, Wertz GW. The respiratory syncytial virus subgroup B attachment glycoprotein: analysis of sequence, expression from a recombinant vector, and evaluation as an immunogen against homologous and heterologous subgroup virus challenge. Virology. 1990; 178:195–203.

19. Yamaguchi M., Sano Y., Dapat IC., Saito R., Suzuki Y., Kumaki A., et al. High Frequency of Repeated Infections Due to Emerging Genotypes of Human Respiratory Syncytial Viruses among Children during Eight Successive Epidemic Seasons in Japan. J Clin Microbiol. 2011; 49: 1034-40.

20. Fodha I., Vabret A., Ghedira L., Seboui H., Chouchane S., Dewar J., et al. Respiratory Syncytial Virus Infection in Hospitalized Infants: AsociationBetwen Viral Load, Virus Subgroup, and Disease Severity. J Medical Virology. 2007; 79: 1951-8.

21. Giubergia V., Martinchuk G., Moreno N., Colombres G., Parra L., Viale D., et al. Gravedad de la infección por virus sincicial respiratorio en pacientes con factores de riesgo y sin ellos. Arch. Argent. Pediatr. [online]. 2004; 102: 330-334. Disponible en:http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-00752004000500004&script=sci_arttext

22. Peltola V, Reunanen T, Ziegler T, Silvennoinen H, Heikkinen T. Accuracy of clinical diagnosis of influenza in outpatient children. Clin Infect Dis. 2005; 41: 1198-200.

23. Bosis S., Esposito S., Niesters HG., Zuccotti GV, Marseglia G, Lanari M,.et al. Role of respiratory pathogens in infants hospitalized for a first episode of wheezing and their impact on recurrences. Clin Microbiol Infect. 2008; 14: 677-84.

24. Valero N., Larreal Y., Arocha F., Gotera J., Mavarez A., Bermudez J., et al. Etiología viral de las infecciones respiratorias agudas. Invest. Clín. 2009; 50: 359-368.

25. Maffey A., Venialgo C., Barrero P., Fuse VA., Márques M de L., Saia M., et al. Nuevos virus respiratorios en niños de 2 meses a 3 años con sibilancias recurrentes. Arch. Argent. Pediatr. [On line] 2008; 106. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-00752008000400005&nrm=iso&tlng=pt.

26. Rabagliati R., Serri M., Perret C., Guzmán A., Azócar A., Habash A., et al. Perfil clínico-epidemiológico de las infecciones por virus respiratorios en adultos hospitalizados durante la estación de influenza 2004. Rev. Chil. Infectol [online]. 2006; 23: 111-117. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-10182006000200002&script=sci_arttext

27. Mojica M., Escobar M., Escalante M., Jaramillo C., Delgado M. Detección y tipificación del virus sincitial respiratorio mediante la técnica RT- PCR anidada en pacientes con infección respiratoria aguda. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 2008; 21: 92-98.

28. Nokso-Koivisto J, Hovi T, Pitkäranta A. Viral upper respiratory tract infections in young children with emphasis on acute otitis media. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2006; 70: 1333-1342.

29. Rodríguez L., Reyes Y., Rodríguez A., Salcedo I. Vigilancia por Laboratorio de Influenza y otros Virus Respiratorios en el Marco del Plan Antipandemia. Ministerio de la Protección Social Instituto Nacional de Salud, Subdirección Red Nacional de Laboratorios. Bogotá, D.C. 2007.

30. Palomino M., Larenas J., Moraga G., Avendaño L. et al. Severidad clínica de la infección respiratoria aguda baja primaria por virus respiratorio sincicial grupos A y B. Rev Chil Pediatr. 2004; 75:S18-S24.

31. Ahluwalia G., Embree J., Mcnicol P., Law B, Hammond GW. Comparison of Nasopharyngeal Aspirate and Nasopharyngeal Swab Specimens for Respiratory Syncytial Virus Diagnosis by Cell Culture, Indirect Immunofluorescence Assay, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J Clin Microbiol. 1987; 25: 763-767.

32. Popow-Kraupp T., Aberle J. Diagnosis of Respiratory Syncytial Virus Infection. The Open Microbiology Journal. 2011; 5: 128-34.

33. Belshe RB. Influenza prevention and treatment: current practices and new horizons. Ann Intern Med. 1999; 131:621–624.

34. Kim C, Ahmed JA, Eidex RB, Nyoka R., Waiboci LW., Erdman D., et al. Comparison of Nasopharyngeal and Oropharyngeal Swabs for the Diagnosis of Eight Respiratory Viruses by Real-Time

Reverse Transcription-PCR Assays. PLoS ONE [En línea]. 2011; 6. Disponible en: www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0021610.

35. Carman B. Molecular techniques should now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. Rev Med Virol. 2001; 11: 347–349.

36. Leland DS., Ginocchio C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. Clin Microbiol Rev. 2007; 20:49–78.

37. Navarro J., Sanbonmatsu S., Perez M., De La Rosa M. Rapid Detection of Respiratory Viruses by Shell Vial Assay Using Simultaneous Culture of HEp-2, LLC-MK2, and MDCK Cells in a Single Vial. J Clin Microbiol. 1999; 37: 2346–7.

38. Ginocchio C. Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods. Journal of Clinical Virology. 2007; 40: S11–S14.

39. Cane PA., Pringle CR. Respiratory Syncytial Virus heterogeneity during epidemic analysis by limited sequencing (SH gene) and restriction mapping N gene. J Gen Virol. 1991; 72: 349-357.

40. Fox J. Nucleic acid amplification tests for detection of respiratory viruses. Journal of Clinical Virology. 2007; 40: S15–S23.

41. Sackett DL, Haynes RB, Guyatt GH, Tugwell P. Epidemiología clínica. Ciencia básica para la medicina clínica. 2ª ed. Madrid: Editorial médica panamericana. 1994; 115.

42. Altman D., Bland J.M. Statistics Notes: Diagnostic tests 2: predictive values. Br Med J. 1994; 309: 102.

43. Daniel, W. W. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa Wiley. México. 2002;202-294.

44. Rosner B. Fundamentals of biostatistics. 7th edition. Brooks/Cole cengage learning; 2011: 50-53.

45. Norman G., Streiner D. *PDQ Statistics*, *Third Edition*. BC Decker Inc, Hamilton- London. 2003; 113-123.

46. Falsey AR, Formica MA, Walsh EE. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. J Clin Microbiol. 2002; 40: 817- 820.

47. Louie J., Hacker J., Gonzales R., Mark J, Maselli JH, Yagi S., et al. Characterization of viral agents causing acute respiratory infection in a San Francisco University Medical Center Clinic during the influenza season. Clin Infect Dis. 2005; 41:822-828.

48. Casiano C., Hulbert E., Mayer TK, Walsh EE., Falsey AR. Lack of sensitivity of rapid antigen tests for the diagnosis of respiratory syncytial virus infection in adults. J Clin Virol. 2003; 28: 169-174.

49. Rabagliati R., Serri M., Montecinos L., Azocar A. Ferrés M. Utilidad de la reacción de polimerasa en cadena en tiempo real en el diagnóstico de infecciones por virus respiratorio sincitial en adultos. Rev Chil Infect. 2007; 24: 441-445.

50. Templeton K., Scheltinga S., Beersma M., KroesA., Claas E. Rapid and Sensitive Method Using Multiplex Real-Time PCR for Diagnosis of Infections by Influenza A and Influenza B Viruses, Respiratory Syncytial Virus, and Parainfluenza Viruses 1, 2, 3, and 4. J Clin Microbiol. 2004; 42: 1564–1569.

51. Syrmis MW, Whiley DM, Thomas M., Mackay IM., Williamson J., Siebert DJ., et ál. A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase- PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples. J Mol Diagn. 2004; 6: 125-131.

52. Bellau-Pujol S., Vabret A., Legrand L., Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J., et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. J Virol Methods. 2005; 126:53-63.

53. Sarmiento L, Chacón D, Valdivia A, Savón., Goyenechea A. Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación del virus sincitial respiratorio. Rev Cubana Med Trop. 1997; 49: 21-23.

54. Chidlow G., Harnett B., Shellam R., Smith D. An economical tandem multiplex real-time PCR technique for the detection of a comprehensive range of respiratory pathogens . Viruses. 2009; 1: 42-56.

55. Coiras M., Pérez P., García M., Casas I. Simultaneous Detection of Influenza A, B, and C Viruses, Respiratory Syncytial Virus, and Adenoviruses in Clinical Samples by Multiplex Reverse Transcription Nested-PCR Assay. Journal of Medical Virology. 2003; 69:132–144.



UNIVERSIDAD
# EL BOSQUE

## Lo Que Buscas

**ADMINISTRACIÓN DE EMPRESAS** **INGENIERÍA INDUSTRIAL**
**INGENIERÍA ELECTRÓNICA** **BIOINGENIERÍA**
**INGENIERÍA AMBIENTAL** **INGENIERÍA DE SISTEMAS**
**BIOLOGÍA** **INSTRUMENTACIÓN QUIRÚRGICA** **ENFERMERÍA**
**OPTOMETRÍA** **PSICOLOGÍA** **ODONTOLOGÍA**
**PEDAGOGÍA INFANTIL** **DERECHO** **EDUCACIÓN BILINGÜE**
**FILOSOFÍA** **FORMACIÓN MUSICAL** **ARTES PLÁSTICAS**
**ARTE DRAMÁTICO** **DISEÑO INDUSTRIAL**
**Diseño y desarrollo de productos artesanales** **Gestión de empresas de artesanía**

**Pregrados** | **Posgrados** | **Educación Continuada** | **Colegio Bilingüe Grados 10 y 11**

**www.uelbosque.edu.co**

Por una cultura de la vida, su calidad y su sentido

Av. carrera 9na No. 131 A - 02, Edificio Fundadores - Bogotá D.C.
Teléfonos (1)648 90 00 - 01 8000 11 30 33

facebook.com/universidadelbosque

@UElBosque

youtube.com/universidadelbosque

Institución de Educación Superior sujeta a inspección y vigilancia por el Ministerio de Educación Nacional. Reg snies 10571, 7777, 1278, 4952, 7772, 91002, 12333, 53071, 52725, 1779, 1780, 1778, 2692, 53049, 13143, 13222, 91493, 7113, 8120, 54924, 15555, 90450, 90451.