

Detección y tipificación del virus sincitial respiratorio en menores de dos años con infección respiratoria aguda

Detection and tipification respiratory syncytial virus in children under two years with acute respiratory infection

Martha Sánchez^{1*}

César Bedoya^{2,3}

Patricia Márquez¹

Maylen Espinosa²

Iliana Caicedo⁴

Ángel Ortiz⁵

1. Área de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Leopoldo Izquieta Pérez, Ecuador.

2. Dirección de Investigación, Desarrollo e Innovación, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Leopoldo Izquieta Pérez, Ecuador.

3. Facultad de Ciencias de la Vida, Escuela Superior Politécnica de Litoral, Ecuador.

4. Dirección Técnica del área de ensayos clínicos del ARCSA, Ecuador.

5. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Guayaquil, Ecuador.

*Autor para correspondencia: msanchezd@inspi.gob.ec

RECIBIDO: 16/04/2017

APROBADO: 16/11/2017

RESUMEN

El virus respiratorio sincitial (VRS) es un importante patógeno siendo la causa más frecuente de bronquiolitis en niños menores de 2 años en todo el mundo. La OPS-OMS refiere que en Ecuador las principales causas de muerte en niños de 1 a 4 años son las infecciones respiratorias agudas por lo que en la presente investigación se decide implementar un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa anidada con transcriptasa inversa para la detección y tipificación del virus sincitial respiratorio humano a partir de muestras clínicas en niños menores de 2 años. Se tomaron muestras de hisopados nasofaríngeos y aspirados bronquiales en niños menores de 2 años con insuficiencia respiratoria aguda de los distintos centros de salud de la ciudad de Guayaquil. Una prueba de inmunofluorescencia indirecta para la identificación del antígeno viral de la cápside fue realizada y mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada con transcriptasa inversa se amplifica un segmento del genoma que codifica

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is an important pathogen, being the most frequent cause of bronchiolitis in children under 2 years of age around the world. PAHO-WHO reports that in Ecuador the main causes of death in children from 1 to 4 years are acute respiratory infections. The present investigation, decided the implementation of a nested chain reaction of polimerase with reverse transcriptase for the detection and typing of human respiratory syncytial virus from clinical samples in children younger than 2 years. Samples of nasopharyngeal swabs and bronchial aspirates were taken from children under than 2 years of age with acute respiratory insufficiency at the different health centers in the city of Guayaquil. An indirect immunofluorescence test for the identification of the viral antigen of the capsid was performed and through nested chain reaction of polimerase with reverse transcriptase was amplified a segment of the genome that codes the fusion protein. The 86 samples analyzed,

para la proteína de fusión. De las 86 muestras analizadas el 56% resultaron positivas por inmunofluorescencia indirecta y el 59% mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada. De las muestras positivas por reacción en cadena de la polimerasa el 88% correspondió al subtipo A y el 8% al subtipo B. Se encontraron 2 coinfecciones con los dos subtipos que corresponde al 4%. Los resultados antes referidos indican que la reacción en cadena de la polimerasa anidada con transcriptasa inversa supera la detección de muestras positivas para VSR con respecto a la inmunofluorescencia indirecta siendo el subtipo A el predominante.

Palabras clave: Infecciones respiratorias agudas, Inmunofluorescencia indirecta, RT-PCR anidada

56% were positive for indirect immunofluorescence and 59% for through nested chain reaction of polimerase. From positive samples by chain reaction of polimerase, 88% belonged to be subtype A and 8% subtype B. Two coinfections were found with two subtypes that represent 4%. The results indicated that nested chain reaction of polimerase with reverse transcriptase is better for the detection of RSV positive samples in comparison to indirect immunofluorescence being predominant the A subtype.

Keywords: acute respiratory infection, indirect immunofluorescence, nested RT-PCR .

INTRODUCCIÓN

El virus sincitial respiratorio humano (VSRH), es un virus de cadena simple de ARN en sentido negativo de la familia de los paramixovirus (Paramyxoviridae). El genoma es de 15.000 nucleótidos de longitud y se compone de 10 genes que codifican 11 proteínas. Basado en la diversidad antigénica de la proteína G de fijación, el VSR presenta dos 2 subtipos, A y B. (Knipe & Howley, 2007), (Corzo-López y Odalys Valdés-Ramírez 2013).

Las infecciones respiratorias agudas (IRA), son la primera causa de morbilidad y una de las principales causas de mortalidad de niños. En este grupo se destaca la infección con VSRH, a la edad de dos años, infecta al 70% de los niños en su primer año de vida, y casi al 100% para el tercer año, con un pico de incidencia entre los dos y seis meses (Mora et al, 2011). Las tasas globales de infección anual alcanzan 64 millones y la mortalidad es de 160,000 (Knipe & Howley, 2007).

La tasa de hospitalización de infantes por

VSRH varía de acuerdo al escenario. Los países desarrollados tienen tasas de 1 a 200 infecciones durante el primer año de vida (Horwitz A., 2002). La hospitalización por esta causa tiende a ser significativamente mayor en países menos desarrollados. No obstante, se ha estimado, que un tercio de todos los niños fallecidos menores de cinco años, es debido a las infecciones del tracto respiratorio bajo, siendo el VSRH, el responsable del 96 % de los casos hospitalizados por infecciones virales (Carballal et al, 1998).

En Latinoamérica, los problemas infecciosos causados por las infecciones agudas respiratorias han sido poco estudiadas por lo que hay escasa información sobre los agentes etiológicos de las IRA, especialmente las virales. Los pocos estudios que se encuentran en la literatura han sido realizados en periodos cortos de tiempo y son procedentes especialmente de Argentina, Chile y el sur de Brasil (Aranda et al, 2012).

La OPS-OMS refiere que en Ecuador las

principales causas de muerte en niños de 1 a 4 años son las IRA (16,4%) (Organización Panamericana de la Salud, 2012). Hasta la actualidad, no se reportan estudios publicados de VSRH en Ecuador. Algunas tesis han sido realizadas en el país pero en muestras pequeñas y en los últimos años, las cuales no revelan datos homogéneos de la prevalencia del virus en infecciones respiratorias agudas bajas. En el hospital Baca Ortiz de la ciudad de Quito se realizó una investigación donde el VSRH en Infecciones Respiratorias Agudas Bajas (IRAB) no prevaleció (Grijalva, 2102) mientras que, en Guayaquil se identificó un alto porcentaje del virus en las infecciones respiratorias estudiadas (Ojeda, 2014).

A pesar que las IRA representan un problema de salud importante, son pocos los laboratorios en Ecuador que realizan un diagnóstico viral. Además los estudios epidemiológicos de virus respiratorios, así como el conocimiento de las cepas virales circulantes son escasos por lo que se decide realizar el presente estudio con el objetivo de identificar el VSRH en menores de 2 años con infección respiratoria aguda.

■ MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de serie de casos o casos clínicos de IRAB en los diferentes centros de salud de la Ciudad de Guayaquil (Centro de salud 13, Hospital Francisco Icaza Bustamante, Hospital Roberto Gilbert).

Muestras

Ochenta y seis muestras fueron tomadas por el personal de asistencia de los diferentes centros de salud siguiendo las normas establecidas en el manual descrito por Savón et al (2003). Luego, fueron remitidas al Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical (LVINHMT) para su proce-

samiento. Las muestras pertenecen a pacientes menores de dos años.

Procesamiento de las muestras

Inmunofluorescencia indirecta

Se realizó la técnica de IFI como método rápido de diagnóstico de IRA causadas por VSRH en muestras de hisopado nasal faríngeo y aspirados nasofaríngeos (Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí," 2003). Para tal efecto se emplearon anticuerpos monoclonales del kit Light Diagnostic Respiratory Panel, (Chemicon, 28820 Single Oak Drive Temecula, CA, EE.UU). Además, el kit cuenta con placas control para la confirmación de los resultados. Todas las muestras fueron procesadas mediante esta técnica.

Detección de muestras clínicas por ensayo de RT PCR anidada

Las muestras tanto negativas como positivas por IFI se realizó RT PCR - anidada siguiendo los protocolos descritos a continuación.

Extracción: Para la extracción del ARN viral directamente de la muestra clínica se utilizó un Kit comercial QIAamp Viral RNA (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones establecidas por el fabricante. Luego de la extracción se verificó la calidad del ADNc obtenido mediante la amplificación del gen de la β actina humana.

PCR: La detección molecular se basó en el protocolo de RT PCR anidada propuesto por Coiras et al., 2003, el cual amplifica un segmento del gen que codifica para la proteína F. En este procedimiento, la PCR se realizan en un mismo microtubo de reacción de 0.5 ml. Para esto se añadieron a la mezcla de reacción 5 μ l del ARN extraído. En la mezcla se emplearon

1.5mM MgSO₄, 200uM de DNTPs, 10 pmol de cada primer específico RSVAB1 (5'ATGGA-GYTGCYRATCCWCARRRCAARTGCAAT 3'), RSVAB2 (5'AGGTGTWGTACACCTGCATTRACAC-TRAATTC3'), 10 ul de 5x de buffer de reacción, 5U de enzima RT, 5 U de DNA Polimerasa y se completó con agua estéril libre de RNasa para un volumen final de 20 ul. Las muestras fueron sometidas a un ciclo inicial de 42 °C durante 45 minutos para obtener el ADNc a partir de este ADNc se realizó la amplificación por PCR.

Luego las muestras fueron incubadas por 94°C durante 3 minutos. Las condiciones del ciclo para la PCR fue de 45 ciclos con el siguiente programa: 94°C por 30 segundos; 55°C por 1 min; 68°C por 30 segundos y una incubación final de 68°C por 5 minutos.

A la mezcla de PCR anidada, se añadió 1 ul de la primera PCR. La mezcla está constituida por 2 mM MgCl₂, 200 uM DNTPs; 10 pmol de cada primer específico RSVA3 (5'TTATACACT-CAACAATRCCAAAAAWACC3'), RSVA4 (5'AAA-TTCCCTGGTAATCTCTAGTAGTCTGT3'), RSVB3 (5'ATCTTCCTAACTCTTGCTRTTAATGCATTG'3),

RSVB4 (5'GATGCGACAGCTCTGTTGATT-TACTATG3'); y 2.5 U de Taq DNA Polimerasa y se completó con agua estéril para un volumen final de 20 ul.

Las muestras fueron sometidas a calentamiento por 94°C por 3 minutos con 45 ciclos: 94°C por 30 segundos; 55 °C por 2 minutos; 72°C por 30 segundos y una incubación final de 72°C por 10 minutos.

Las mezclas de reacción se colocaron en un Termociclador (MJ Research, PTC 100).

Electroforesis: Los productos amplificados se detectaron adicionando 10 ul del producto de la RT-PCR más 3 µL del indicador de corrida Blue 6 X loading (Invitrogen) se sometió a una electroforesis en un gel de agarosa al 2,0% teñido con bromuro de etidio (BDH, 0.1 µg/

ml). La electroforesis se llevó a cabo en cámara submarina horizontal utilizando un tampón de corrida TAE 1X. La corrida se realizó a 90 V durante 1 hora 30 min. Las bandas de ADN fueron visualizadas mediante un transiluminador de luz ultravioleta. En la primera PCR se obtuvo un producto de 737 pb. Mientras que, en la segunda PCR una banda de 611 para el VSR tipo B y una banda de 363 pb para el VSR tipo A.

Análisis y presentación de los resultados

Se empleó una hoja de cálculo en Excel de Microsoft Office para el análisis y procesamiento de los resultados. Los valores fueron mostrados en figuras y gráficos presentados como porcentaje.

RESULTADOS

De las muestras analizadas, el 56% fue positivo por IFI y el 59% por PCR (Gráfico 1). El producto fue una banda de 737 pb (Figura 1).

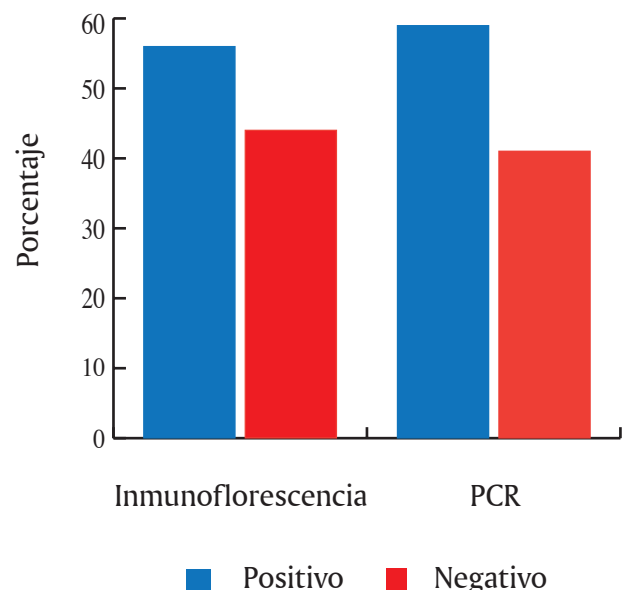


Gráfico 1. Identificación del VSR por técnica empleada.

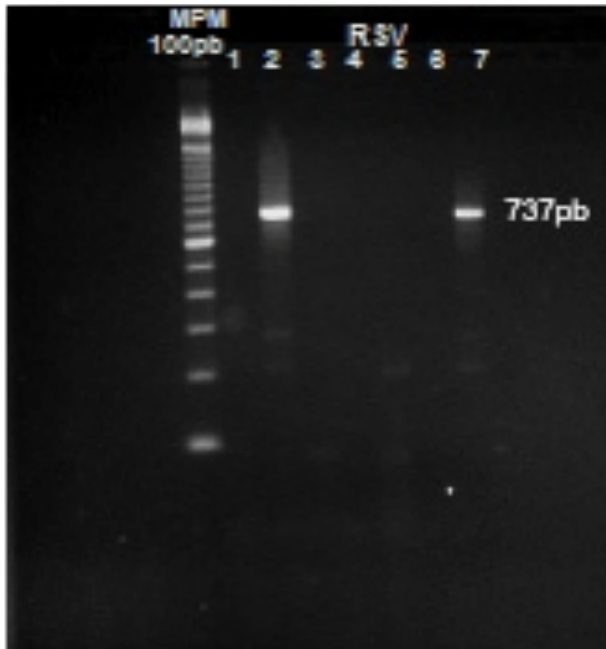


Figura 1. Detección del VSR por RT-PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se observa una banda de 737pb de VSR. Pocillo1, control negativo. Pocillo 2, muestra positiva de VSR. Pocillos del 3 al 6, muestras negativas. Pocillo 7, control positivo. MPM, marcador de peso molecular de 100pb.

De las muestras analizadas el 88% corresponde al subtipo A, 8% al subtipo B de VSR y 4% a coinfección subtipo AB.

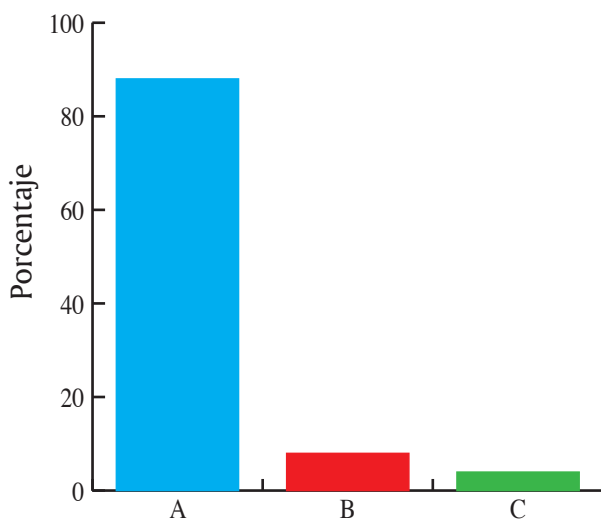
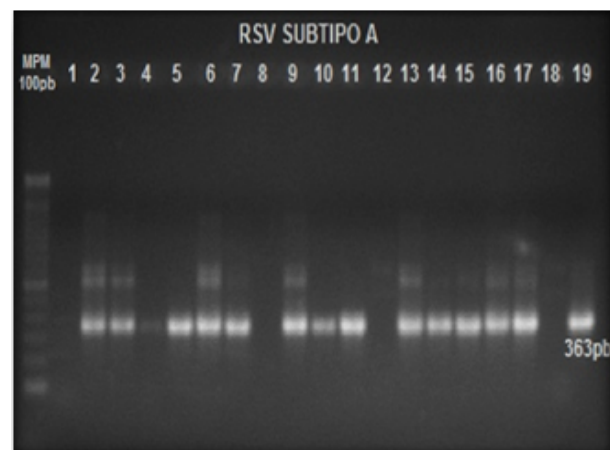


Gráfico 2. Subtipo de VSR identificados

Una vez identificado el VSR por ambos métodos, se pasó a la subtipificación, mostrando los resultados del gráfico 2. Para el subtipo A se obtuvo una banda de 363pb y para el subtipo B de 611pb (Figura 2). La muestras correspondientes a los carriles 9, 15, 16 amplificaron con los dos juegos de iniciadores tratándose por tanto de una coinfección.

(a)



(b)

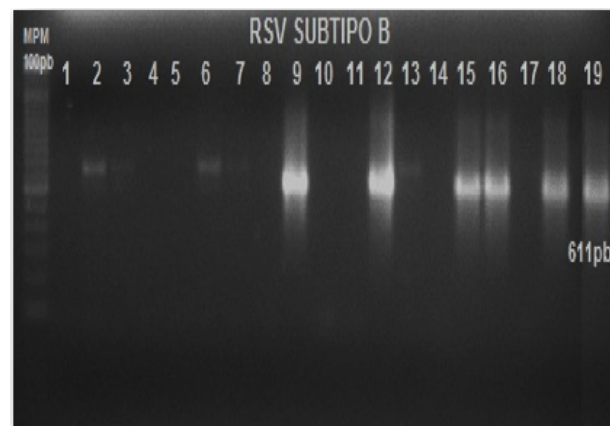


Figura 2. Subtipificación de VSRH. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. (a) Pocillo 1, Control negativo. Pocillos del 2 al 18, muestras de niños. Pocillo 19, control positivo subtipo A. MPM: marcador de peso molecular de 100 pb (b) Pocillo 1, Control negativo. Pocillos del 2 al 18 muestras de niños. Pocillo 19, control positivo subtipo B. MPM: marcador de peso molecular de 100 pb.

DISCUSIÓN

En cuanto al estudio clínico, la prueba de RT-PCR detectó la presencia de VSR en un 60%, del grupo investigado. Por tanto, detectó un 3% adicional con respecto a la prueba de IFI. Una de las posibles causas para este resultado fue que varias de las muestras fueron colectadas luego de los 3 días de la aparición de la sintomatología, coincidiendo con un descenso en la tasa de replicación viral. Algunos reportes señalan que la RT-PCR anidada presenta ventaja con respecto a otras pruebas como IFI o cultivo celular. A pesar de que la IFI es un método rápido y se lo realiza directamente de la muestra, resulta no ser un método sensible para detectar y tipificar el VSR (Mojica, et al 2008).

La biología molecular es utilizada en el diagnóstico de algunos virus respiratorios, esta técnica molecular permite tipificar al virus en grupo A o B, y se ha caracterizado por su alta sensibilidad y alta especificidad. Es muy importante pues el aislamiento o detección de antígenos virales se dificulta por la poca cantidad de virus presente en las muestras (Anchundia F., et al., 2000 y Patón, A. et al., 1992)

Los resultados de la subtipificación concuerdan con lo reportado en los estudios epidemiológicos moleculares de VSR en Latinoamérica (Galiano et al., 2005), (Valdés O., 2004), (Russi et al., 1989), (San Juan Vergara et al 2012), (De-Paris, F., et al 2014). La coinfección encontrada en la presente investigación coincide con lo referido en un estudio realizado en Costa Rica en pacientes hospitalizados (Mojica et al., 2008).

CONCLUSIONES

Los resultados antes mostrados indican que la RT-PCR anidada supera la detección de muestras positivas para VSRH con respecto a la

IFI lo que corrobora que es un método de mayor sensibilidad.

Predomina el subtipo A siendo desde el punto de vista epidemiológico el subtipo que prevalece también en la mayoría de los estudios.

Se reportó coinfecciones de los subtipos estudiados lo que coincide con lo reportado en la literatura acerca del patrón de circulación del VSRH en países del hemisferio norte y sur.

AGRADECIMIENTOS

Debo expresar mis sinceros agradecimientos a Dios, a mis padres por haberme dado el por su sacrificio y apoyo, que me ha servido para la culminación de mis metas. A Abel, por su amor incondicional y dedicación, a quien le debo tanto, en los momentos donde se necesita palabras de afecto y estímulo. A la Dra. Aracely Alava Alprecht quien me orientó y brindó sus conocimientos.

LITERATURA CITADA

Anchundia F., Alejandro J., Cabello C., Rosete D y Manjarrez M. (2000). Incorporación de la técnica de RT-PCR para la detección del Virus Sincitial Respiratorio. Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias 13(3): 145–152.

Aranda D., Lozano L., González-Parra G. y Querales J.(2013) Modelamiento de la transmisión del Virus Respiratorio Sincitial (VRS) en niños menores de cinco años. Revista de Salud Pública. 15 (4): 637-647.

Carballal G. (1998). Paramixoviridae. Pp.191-202. En: Carballal G, Oubiña J: Virología Médica. Buenos Aires, Argentina.

Coiras M., Pérez-Breña P., García M. and Casas, I. (2003). 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* 69(1): 132–144.

Corzo M y Valdés O. (2013). El virus sincitial respiratorio humano: una panorámica *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 44 (2): 1-20.

De-Paris F., Beck C., de Souza L., Mombach A., Minuto R., da Silva D., Márcia P., Pires R., de Souza R. and Barth A. (2014). Evaluation of respiratory syncytial virus group A and B genotypes among nosocomial and community-acquired pediatric infections in Southern Brazil. *Virology Journal* 11 (36): 11-36.

Galiano M., Palomo C., Videla C., Arbiza J., Mello, J and Carballal G. (2005) Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups a and b) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 to 2001). *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5): 2266–2273.

Grijalva M. (2012), Identificación y Genotipificación de Virus Sincitial Respiratorio Humano (VRSH) mediante RT-PCR en muestras respiratorias de niños en edad escolar con asma en el Hospital Baca Ortiz de Quito-Ecuador. Tesis Ing. Biotecnología. Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador.

Horwitz A. (2002). La Salud en las Américas: 1-482. Disponible en: <http://www.paho.org>. (Consultado: agosto 15, 2017).

Mojica M., Escobar M., Escalante M., Jaramillo C y Delgado M. (2008). Detección y tipificación del virus sincitial respiratorio mediante la técnica RT-PCR anidada en pacientes con infección respiratoria aguda. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 21(2): 92–98.

Mora D., Alfaro W., Taylor L and Hun L. (2011). Detection of Human Respiratory Syncytial Virus subtypes A and B in hospitalized children in Costa Rica. *Acta Médica Costarricense* 53(1): 20–25.

Ojeda P., (2014). Neumonía por virus sincitial respiratoria en menores de 1 año en el área de pediatría en el Hospital Abel Gilbert Pontón. Tesis Medicina. Carrera de Ciencias Médicas, Universidad Estatal de Guayaquil, Ecuador.

Paton A., Paton J., Lawrence A., Goldwater P and Harris R (1992). Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 30(4): 901–904.

Peter L. Collins, Robert M. Chanock, and Brian R. Murphy (2001). Respiratory Syncytial Virus P.p. 887-910. En: Fields B., Howley P: *Fields Virology*. Atlanta, Estados Unidos.

Russi J., Delfraro A., Arbiza J, Chiparelli H., Orvell C., Grandien M and Hortal M. (1989). Antigenic characterization of respiratory syncytial virus associated with acute respiratory infections in Uruguayan children from 1985 to 1987. *Journal of Clinical Microbiology* 27(7) : 1464–1466.

San Juan Vergara H., Gutiérrez M y Mohapatra, S. (2006). Biología molecular del virus sincitial respiratorio y desarrollo de estrategias profilácticas. *Revista Científica Salud Uninorte* 22 (2): 135-153.

Savón C. Goyenechea A. Oropesa S. Valdés O. Acosta B. González G. Pérez L. Palerm L y Piñon A (2003) Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. Habana, Cuba.

Valdés O. (2004). Caracterización antigénica y molecular del virus sincitial respiratorio humano. Tesis Ciencias de la Salud. Doctorado en Ciencias de la Salud, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri.”. Cuba.