

Infecciones por el virus parainfluenza tipo 4

M.L. García García^a, J. Aguilar Ruiz^b, J.E. Echeverría Mayo^c, C. Calvo Rey^a, I. Pinto Fuentes^a, M. Ordoñas Gabin^d, E. Roman Riechmann^a y P. Pérez Breña^b

^aServicio de Pediatría. Hospital Severo Ochoa. Servicios de ^bVirología y ^cMicrobiología Diagnóstica. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.

^dServicio de Epidemiología. Comunidad de Madrid. España.

Objetivo

Describir las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones por virus parainfluenza humano tipo 4 (VPIH-4) en pacientes pediátricos.

Métodos

Se estudiaron los pacientes hospitalizados o atendidos en el servicio de urgencias con el diagnóstico de infección respiratoria de vías respiratorias inferiores. Las variables clínicas estudiadas fueron edad, sexo, diagnóstico clínico, temperatura corporal, saturación de oxígeno en sangre arterial (SaO₂), resultado de la radiografía de tórax y duración de la hospitalización. Las muestras obtenidas mediante aspiración nasofaríngea se estudiaron mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), cultivo celular y una nueva técnica de reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa (RT-PCR) múltiple, capaz de detectar en la misma reacción los 4 tipos de virus parainfluenza.

Resultados

Se analizaron 230 muestras correspondientes a 191 pacientes. En el 35,1% de los episodios se detectó algún virus parainfluenza: el 37,3% correspondió al VPIH-1, el 10,4% al VPIH-2, el 38,9% al VPIH-3 y en el 13,4% se identificó el VPIH-4. Se amplificó ARN del virus parainfluenza tipo 4 en 10 muestras correspondientes a 9 pacientes. Todos ellos excepto uno eran menores de 2 años, con unos límites de edad entre 26 días y 23 meses. El diagnóstico clínico fue bronquiolitis o bronquitis sibilante, que en uno de ellos se acompañó de infiltrado pulmonar. Precisarón ingreso hospitalario 6 pacientes, con una SaO₂ media de 89,5% y una estancia media de 7,6 días.

Discusión

Es la primera vez que se describe la circulación del VPIH-4 en España. Las infecciones ocasionadas por este

virus no son tan leves como se había descrito inicialmente. La utilización de una RT-PCR múltiple permite diagnosticar infecciones respiratorias por VPIH-4 que de otra manera pasarían desapercibidas.

Palabras clave:

Virus parainfluenza. Virus parainfluenza tipo 4. Infecciones respiratorias. Niños.

PARAINFLUENZA VIRUS TYPE 4 INFECTIONS

Objective

To describe the clinical and epidemiological characteristics of parainfluenza virus type 4 infections in pediatric patients.

Methods

Inpatients and outpatients with lower respiratory tract infections were studied. Recorded data were age, sex, clinical diagnosis, temperature, oxygen saturation, chest radiograph and length of hospital stay. Nasopharyngeal aspirates were studied through indirect immunofluorescence, tissue culture and a new multiplex reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) able to identify the four types of human parainfluenza virus in the same reaction.

Results

Two hundred thirty specimens from 191 patients were analyzed. Parainfluenza viruses were diagnosed in 35.1%: 37.3% type 1, 10.4% type 2, 38.9% type 3 and 13.4% type 4. RNA from parainfluenza virus type 4 was amplified in 10 aspirates from nine patients. Of these, all except one were aged less than two years (range: 26 days to 23 months). The clinical diagnosis was bronchiolitis or

Estudio financiado parcialmente por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) nº 95/0387.

Correspondencia: Dra. M.L. García García.
Servicio de Pediatría. Hospital Severo Ochoa.
Avda. Orellana, s/n. 28911 Leganés. Madrid. España.
Correo electrónico: marialuzgarcia@terra.es

Recibido en enero de 2002.

Aceptado para su publicación en febrero de 2002.

wheezing associated with lower respiratory tract infection. Six patients required admission, with a mean oxygen saturation of 89.5% and a mean length of hospital stay of 7.6 days.

Discussion

This is the first description of the characteristics of parainfluenza virus type 4 in Spain. Infections associated with this virus are not as mild as previously thought. Application of a multiplex RT-PCR allows identification of respiratory infections due to parainfluenza virus type 4 that would otherwise be underdiagnosed.

Key words:

Human parainfluenza virus. Human parainfluenza virus type 4. Respiratory infections. Children.

INTRODUCCIÓN

Los virus parainfluenza humanos (VPIH) son virus con genoma ARN no segmentado, que pertenecen a los géneros *Paramyxovirus* (VPIH-1 y VPIH-3) y *Rubulavirus* (VPIH-2 y VPIH-4), de la familia *Paramyxoviridae*¹.

Se cree que los VPIH se transmiten de persona a persona por contacto directo y exposición a secreciones nasofaríngeas contaminadas, a través de fomites y gotitas respiratorias². Estos virus producen un espectro de enfermedad que varía desde infecciones leves de vías respiratorias superiores, a formas más graves y prolongadas de infecciones respiratorias de vías inferiores, como son laringotraqueobronquitis, bronquiolitis y neumonía. Los VPIH-1 y VPIH-2 suelen producir epidemias en los otoños de años alternos, ocasionando infecciones respiratorias leves o moderadas, afectando sobre todo a niños de 2 a 6 años. El VPIH-1 es el principal agente responsable de los brotes epidémicos de *crup*. Las infecciones por VPIH-3 se adquieren habitualmente en edades más precoces y originan epidemias de enfermedades respiratorias de intensidad moderada o grave durante la primavera y los meses de verano³. Es el segundo virus, tras el virus respiratorio sincitial (VRS), productor de infecciones de vías respiratorias inferiores en la infancia, principalmente bronquiolitis o neumonía.

En contraste con el alto grado de conocimiento alcanzado respecto de los VPIH-1, VPIH-2 y VPIH-3, se dispone de poca información acerca de las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones por VPIH-4. La ausencia de métodos comerciales de diagnóstico rápido para el VPIH-4 y su difícil crecimiento en cultivo celular han contribuido probablemente a la escasa detección de sus infecciones, a pesar de que los estudios serológicos muestran que se trata de un virus relativamente ubicuo¹. Su asociación inicial con infecciones respiratorias leves^{4,6} llevó a considerarlo un patógeno respiratorio sin importancia clínica. Sin embargo, en 2 estudios recientes realizados en niños hospitalizados con infección de vías respiratorias inferiores debidas a VPIH-4 se ha observado

que las infecciones ocasionadas por este virus no son probablemente tan leves como se había pensado inicialmente^{3,7}.

En el presente estudio se describen las características clínicas de 9 pacientes pediátricos con infección por VPIH-4. El diagnóstico etiológico se basó en la aplicación de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa (RT-PCR) múltiple, capaz de detectar y tipificar los 4 tipos de VPIH. Es la primera vez que se comunica la circulación del VPIH-4 en España y se describen sus infecciones. Nuestros resultados sugieren que la infección por este virus es más frecuente y puede originar mayor morbilidad de lo que previamente se había pensado.

PACIENTES Y MÉTODOS

Desde el punto de vista clínico y virológico se estudiaron las infecciones respiratorias de pacientes pediátricos atendidos en el servicio de urgencias u hospitalizados con el diagnóstico de infección de vías respiratorias inferiores desde septiembre de 1997 hasta julio de 1998. Las infecciones respiratorias se consideraron de vías inferiores cuando correspondían a uno de los siguientes diagnósticos: bronquiolitis (definida según los criterios de McConnochie⁸), bronquitis sibilante (sibilancias en el contexto de una infección respiratoria en un niño con antecedentes de episodios similares previos), laringotraqueobronquitis o neumonía. Se recogieron las siguientes variables clínicas: edad, sexo, diagnóstico clínico, temperatura corporal, saturación de oxígeno respirando aire ambiental (pulsioxímetro portátil Nellcor[®]), resultado de la radiografía de tórax y duración de la hospitalización en el caso de los pacientes ingresados.

Las muestras clínicas, consistentes en secreciones respiratorias, obtenidas mediante aspiración nasofaríngea, se remitieron, en medio de transporte viral, al Servicio de Virología del Centro Nacional de Microbiología, donde se procesaron en las 24 h siguientes a su recogida. El estudio virológico se realizó mediante 3 técnicas: *a*) detección de antígeno viral mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI); *b*) aislamiento viral en cultivos celulares, y *c*) detección del ARN viral de VPIH mediante RT-PCR.

La IFI se realizó directamente sobre las células de las secreciones respiratorias que se concentraron mediante centrifugación, fijadas y teñidas con los métodos estándar. Se emplearon reactivos comerciales (Chemicon[®], Temecula, EE.UU.) para el diagnóstico de los VPIH-1, VPIH-2 y VPIH-3 y el anticuerpo monoclonal 531-3F, amablemente cedido por el Center for Disease Control (Atlanta, Georgia) para el diagnóstico específico del VPIH-4⁹.

Para el aislamiento viral en cultivo celular se inocularon las líneas celulares Hep-2, NCI-H292, MDCK y Fp. Los cultivos se observaron cada 48 h durante el período de incubación. Cuando se observó efecto citopático o tras 10 días de incubación, el cultivo se raspó y se sometió a

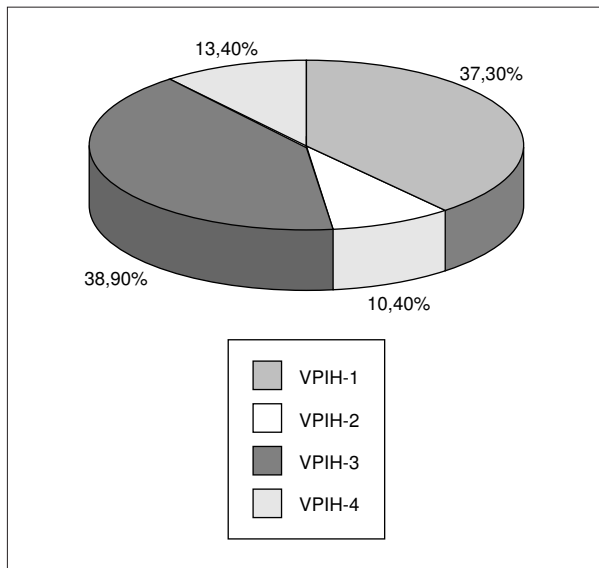


Figura 1. Frecuencia relativa de los distintos tipos de virus parainfluenza humanos (VPIH-1, VPIH-2, VPIH-3 y VPIH-4).

IFI para virus respiratorios. Cuando los resultados de la IFI sobre la monocapa del cultivo eran negativos, la muestra era reincubada y evaluada de nuevo mediante IFI a los 10 días.

La extracción del ARN y las condiciones analíticas del ensayo de RT-PCR múltiple utilizadas para el diagnóstico de los VPIH se han descrito previamente¹⁰. La realización de la RT-PCR se llevó a cabo utilizando *primers* previamente descritos para VPIH-1, VPIH-2 y VPIH-3⁹. Para

el diseño del *primer* específico de VPIH-4 se obtuvieron las secuencias del gen de la fosfoproteína P viral a partir del gen *BANK* y se alinearon utilizando el Wisconsin Analysis Package®, versión 8 (Genetics Computer Group, Madison, EE.UU.), Todos los resultados positivos se confirmaron mediante la repetición del ensayo en una alícuota independiente de la muestra.

RESULTADOS

Se analizaron 230 muestras respiratorias recogidas de 191 pacientes atendidos en el servicio de urgencias u hospitalizados durante el período de estudio. Los resultados combinados de las 3 técnicas descritas permitieron el diagnóstico de algún virus parainfluenza en el 35,1% (67/191) de los episodios. De ellos, el 37,3% correspondió al VPIH-1, el 10,4% al VPIH-2, el 38,9% al VPIH-3 y el 13,4% al VPIH-4 (fig. 1). Todos los VPIH-4 se subtipificaron como VPIH-4A. Se detectaron 3 coinfecciones de VPIH-3 y adenovirus y 1 coinfección de VRS con VPIH-4. Se amplificó ARN de VPIH-4 por RT-PCR en 10 muestras clínicas que correspondían a 9 pacientes, pero sólo se alcanzó el aislamiento viral en cultivo celular en una de ellas.

La identificación de todos los casos de VPIH-4 tuvo lugar en los meses de diciembre de 1997 y enero de 1998. En cambio, la mayoría de las infecciones por VPIH-1 y VPIH-2 se detectaron en los meses de otoño y las de VPIH-3 en los meses de verano (fig. 2).

Todos los pacientes con infección por VPIH-4, excepto un niño de 8 años, eran lactantes menores de 2 años, con unos límites de edad de 26 días a 23 meses. El diagnóstico clínico fue bronquiolitis o bronquitis sibilante en todos

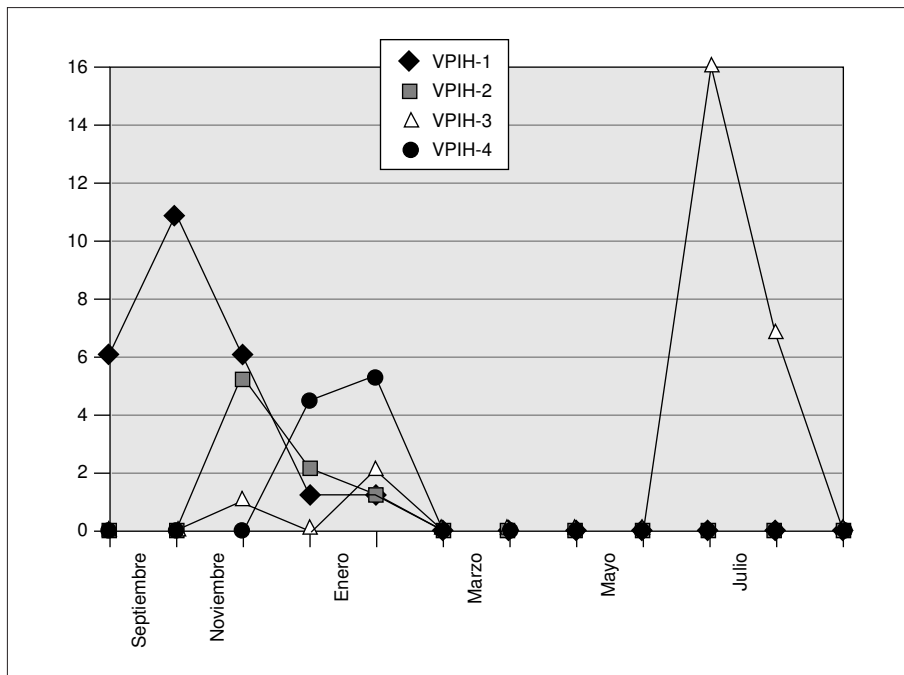


Figura 2. Distribución estacional de los distintos tipos de virus parainfluenza humanos diagnosticados desde septiembre de 1997 hasta julio de 1998 (VPIH-1, VPIH-2, VPIH-3 y VPIH-4).

TABLA 1. Características clínicas de los pacientes ingresados

Edad	Sexo	Antecedentes personales	Diagnóstico	Temperatura (°C)	SaO ₂ (%)	Duración del ingreso (días)
8 años	V	Asma	Crisis asmática	37,8	83	7
15 meses	V	Recién nacido pretérmino	Bronquiolitis	38,5	91	11
18 meses	V	Sibilancias	Bronquitis sibilante	38,9	92	10
26 días	V	No	Bronquiolitis más neumonía	37,9	90	9
10 meses	V	Sibilancias	Bronquitis sibilante	36,5	91	4
5 meses	V	No	Bronquiolitis	36,9	90	5

SaO₂: saturación de oxígeno en sangre arterial; V: varón.

TABLA 2. Características clínicas de los pacientes que no precisaron ingreso

Edad	Sexo	Antecedentes personales	Diagnóstico	Temperatura (°C)	SaO ₂ (%)
15 meses*	V	No	Bronquiolitis	36,7	97
22 meses	V	Sibilancias	Bronquitis sibilante	36,6	96
23 meses	M	Sibilancias	Bronquitis sibilante	37,3	95

*Coinfección con virus respiratorio sincitial.

V: varón; M: mujer; SaO₂: saturación de oxígeno en sangre arterial.

los casos, que en uno de ellos se acompañó de infiltrado pulmonar. Más de la mitad de los niños habían presentado episodios de sibilancias previos asociados a infecciones respiratorias, uno había sido prematuro y el resto no refería ningún antecedente reseñable. No se evidenció en ningún caso exantemas o convulsiones febriles. Precisa- ron ingreso hospitalario 6 de los 9 pacientes. Las caracte- rísticas clínicas de los niños hospitalizados y no hospita- lizados se detallan en las tablas 1 y 2.

En todos los pacientes que precisaron hospitalización se objetivó hipoxia en el momento del ingreso (satura- ción de oxígeno en sangre arterial [SaO₂] inferior al 95%), con una SaO₂ media de 89,5%. El 66% de ellos presenta- ron fiebre y la duración media de la estancia hospitalaria fue de 7,6 días. El diagnóstico clínico en este grupo fue bronquiolitis en 3 niños y bronquitis sibilante en el resto. Se realizó radiografía de tórax en todos los casos, y se objetivó infiltrado pulmonar en uno de ellos. Todos los ni- ños ingresados eran varones.

Los pacientes con infección respiratoria documentada por VPIH-4 que no precisaron ingreso tenían una edad li- geramente superior, estaban afebriles y presentaban una SaO₂ superior al 95%. Uno de ellos fue diagnosticado de bronquiolitis y los 2 restantes de bronquitis sibilante.

DISCUSIÓN

El VPIH-4 se aisló por primera vez en la década de los años 1950 en un escolar con faringitis y rinitis leve¹¹. Sin embargo, a pesar del tiempo transcurrido hasta nuestros días, el conocimiento actual de las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones asociadas a VPIH-4 es muy escaso. La dificultad que supone la identificación de este virus junto con la creencia inicial de que el VPIH-4 causaba infecciones leves, ha hecho que sea un virus respiratorio poco buscado en la rutina diagnóstica

de la mayoría de los laboratorios de virología. De hecho, a pesar de que los estudios de seroprevalencia han mos- trado que el 50% de los niños de 6 años y el 70-90% de los adultos jóvenes tienen anticuerpos frente a VPIH-4¹², la infección se diagnostica muy infrecuentemente.

El VPIH-4 es el VPIH de crecimiento más lento y difícil en cultivo celular. Es un virus muy lábil que produce escaso efecto citopático y hemadsorción de aparición tar- día, características ambas que dificultan su identifica- ción¹³. Además, los anticuerpos monoclonales específi- cos, necesarios para el aislamiento en cultivo celular, están disponibles desde hace pocos años⁷, y se han eva- luado para la detección del crecimiento viral en cultivo, pero no para el diagnóstico directo en muestras clínicas. Nuestro estudio es el primero en abordar el diagnóstico de las infecciones respiratorias por VPIH-4 mediante la aplicación de un método de RT-PCR. Probablemente gra- cias a la utilización de esta técnica se ha alcanzado una elevada tasa de detección (13,4%), mientras que el culti- vo celular sólo pudo diagnosticar un episodio de infec- ción debida a VPIH-4. No es de extrañar, por lo tanto, que mientras que en la serie de Lindquist et al³ se de- tectaron 13 pacientes con infección documentada por VPIH-4 a lo largo de 6 años, y en la de Rubin et al⁷ 10 ni- ños a lo largo de 3 años, en nuestro estudio se han diag- nosticado 9 pacientes de infección por VPIH-4 en sólo 11 meses.

En las escasas series publicadas de infecciones por VPIH-4, el porcentaje de éstas con respecto al total de in- fecciones por VPIH es variable. En todas ellas el diagnós- tico virológico del VPIH-4 se basó en el cultivo celular. Así, en la serie de Downham et al⁴ de pacientes pediátri- cos hospitalizados por infecciones debidas a VPIH, el VPIH-4 representó el 10,6% del total. En el estudio Te- cumseh¹⁴ de enfermedades respiratorias, una cohorte de

padres y sus hijos se controlaron durante 72 meses, presentando el 7% infecciones respiratorias por VPIH-4. En otras publicaciones más recientes se detectó VPIH-4 en menores proporciones (3,8%⁴ y 1,1%¹⁵ del total de infecciones por VPIH). Como era de esperar, los VPIH-1 y VPIH-3 fueron los VPIH más prevalentes en nuestro estudio¹⁶. En cambio, las infecciones por VPIH-4 fueron más frecuentes que las producidas por VPIH-2 (10,7%), virus este último incluido en el diagnóstico sistemático en muchos laboratorios de virología. Todos estos datos indican que hasta ahora las infecciones por VPIH-4 se han infradiagnosticado y que probablemente son mucho más frecuentes de lo que se había pensado.

La distribución estacional de los VPIH ha sido similar a la descrita en la bibliografía: los VPIH-1 y VPIH-2 circularon en los meses del otoño y VPIH-3 fundamentalmente durante el verano. Diciembre y enero fueron los meses en los que se diagnosticaron todos los casos de VPIH-4, de acuerdo con la circulación observada por otros autores¹⁵.

Respecto a la repercusión clínica, las primeras referencias de infecciones por VPIH-4 en adultos y en niños indicaban que se asociaban con infecciones leves de vías respiratorias superiores^{11,17}. Sin embargo, en los últimos años se han publicado descripciones de infecciones de vías respiratorias inferiores graves asociadas a VPIH-4. Así, en el primer estudio en el que se examinan las características clínicas de las infecciones pediátricas por VPIH-4, se describen 14 niños, de los cuales 8 habían precisado ingreso hospitalario¹². La serie de Downham et al⁴ está compuesta por niños hospitalizados con infecciones de vías respiratorias inferiores. Del mismo modo, las últimas 2 series publicadas de infecciones por VPIH-4 describen pacientes pediátricos con bronquiolitis, neumonía y/o distrés respiratorio, que han requerido hospitalización^{3,7}. En una publicación muy reciente se describe por primera vez un caso de sepsis viral grave causada por VPIH-4 en un niño previamente sano¹⁸. Los 9 pacientes diagnosticados en nuestro centro presentaban infecciones de vías respiratorias inferiores y 6 de ellos precisaron hospitalización con una estancia media de 7,6 días, similar a la descrita por Lindquist et al³ y Rubin et al⁷ en pacientes infectados por VPIH-4, pero superior a la encontrada por nuestro grupo en pacientes de similares características, ingresados con infecciones respiratorias de las vías inferiores debidas a distintos virus respiratorios¹⁹. Es decir, las infecciones ocasionadas por VPIH-4 no sólo no son tan infrecuentes como se pensaba, sino que su repercusión clínica puede llegar a ser al menos tan importante como la de otros virus respiratorios a los que se ha prestado mucha más atención. Por lo tanto, resulta de gran utilidad el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas como las descritas en este estudio, que permitan ampliar el conocimiento clínico y epidemiológico de infecciones relativamente frecuentes pero poco conocidas hasta ahora.

BIBLIOGRAFÍA

1. Henrickson K, Ray R, Belshe R. Parainfluenza viruses. En: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases, 4ª ed. New York: Churchill Livingstone, 1995; p. 1489-96.
2. American Academy of Pediatrics. Parainfluenza virus (infecciones). En: Pickering LK, editor. 2000 Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases, 25ª ed. Elk Grove Village: American Academy of Pediatrics, 2000; p. 438-40.
3. Lindquist S, Darnule A, Ista A, Demmler G. Parainfluenza virus type 4 infections in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:34-8.
4. Downham M, McQuillin J, Gardner S. Diagnosis and clinical significance of parainfluenza virus infections in children. *Arch Dis Child* 1974;49:8-15.
5. Killgore GE, Dowdle WR. Antigenic characterization of parainfluenza 4ª and 4B by the hemagglutination-inhibition test and distribution of HI antibody in human sera. *Am J Epidemiol* 1970;91:308-16.
6. Herrmann EC, Hable KA. Experiences in laboratory diagnosis of parainfluenza viruses in routine medical practice. *Mayo Clin Proc* 1970;45:177-80.
7. Rubin E, Quennec P, McDonald J. Infections due to parainfluenza virus type 4 in children. *Clin Infect Dis* 1993;17:998-1002.
8. McConochie K. Bronchiolitis. What's in the name? *Am J Dis Child* 1983;137:11-3.
9. Echeverría JE, Erdman D, Swierkosz E, Holloway B, Anderson L. Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2 and 3 from clinical samples by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1998;36:1388-91.
10. Aguilar J, Perez P, García ML, Cruz N, Erdman D, Echeverría JE. Detection and identification of Human Parainfluenza Viruses 1, 2, 3 and 4 in clinical samples of pediatric patients by Multiplex Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2000;119:1-5.
11. Johnson K, Chanock RM, Cook MK, Hyebner RJ. Studies of a new human hemadsorption virus. I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg* 1960;71:81-92.
12. Gardner SD. The isolation of parainfluenza 4 subtypes A and B in England and serological studies of their prevalence. *J Hyg* 1969;67:545-50.
13. Collins P, Chanock R, McIntosh K. Parainfluenza viruses. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology, 3ª ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996; p. 1205-41.
14. Monto A. The Tecumseh study of respiratory illness. *Am J Epidemiol* 1973;97:338-48.
15. Laurichesse H, Dedman D, Watson J, Zambon M. Epidemiological features of parainfluenza virus infections: Laboratory surveillance in England and Wales, 1975-1997. *Eur J Epidemiol* 1999;15:475-84.
16. Counihan M, Shay D, Holman R, Lowther S, Anderson L. Human parainfluenza virus associated hospitalizations among children less than five years of age in the United States. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:646-53.
17. Tyrrell DA, Bynoe ML. Studies on parainfluenza type 2 and 4 viruses obtained from patients with common colds. *BMJ* 1969;1:471-4.
18. Slvain K, Passaro D, Hacker J, Hendry M, Kohl S. Parainfluenza virus type 4: Case report and review of the literature. *Pediatr Infect Dis J* 2000;619:893-6.
19. García García ML, Ordobás Gabin M, Calvo Rey C, González Álvarez MI, Aguilar Ruiz J, Arregui Sierra A, et al. Infecciones virales de vías respiratorias inferiores en lactantes hospitalizados: etiología, características clínicas y factores de riesgo. *An Esp Pediatr* 2001;55:101-7.