

BOCAVIRUS EN NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA. PROVINCIA DEL CHACO, 2014

GERARDO D. DELUCA¹, MARÍA CECILIA URQUIJO¹, CAROLINA PASSARELLA¹, CÉSAR PICÓN², DIMAS PICÓN²,
MARÍA ACOSTA², CARINA ROVIRA², HÉCTOR M. MARÍN³

¹Laboratorio de Aplicaciones Moleculares, Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes,
²Instituto Modelo de Medicina Infantil, Resistencia, Chaco, ³Área de Biología Molecular, Instituto de Medicina Regional,
Universidad Nacional del Nordeste, Chaco, Argentina

Resumen La infección respiratoria aguda (IRA) es la patología más frecuente a lo largo de la vida de una persona y es la causa más común de morbi-mortalidad en menores de 5 años. El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de bocavirus (BoV) en pacientes menores de 5 años con diagnóstico presunto de IRA en una ciudad capital del norte argentino (Resistencia, Chaco). Se analizaron aspirados nasofaríngeos correspondientes a 488 niños durante el año 2014. Los mismos fueron testeados por PCR en tiempo real hallándose BoV en 36 casos (7.4%), de los cuales 26 (72.2%) fueron infantes de 6-18 meses de vida. La mayor concentración de positivos se registró en el período junio-septiembre con un total de 28 pacientes (77.8%). Los casos positivos para BoV se observaron como infección única en el 50% de los mismos y el resto como infecciones concomitantes con otros microorganismos. No conocemos que haya otro estudio de epidemiología molecular de BoV en el norte argentino y destacamos la importancia de investigar los nuevos virus capaces de generar infección respiratoria aguda, y difundir el conocimiento de su circulación en la comunidad.

Palabras clave: bocavirus humano, infecciones respiratorias altas, niños hospitalizados

Abstract *Bocavirus in infants under 5 years with acute respiratory infection. Chaco Province, Argentina, 2014.* Acute respiratory infection (ARI) is the most frequent pathology along human life, being the most common cause of morbidity and mortality in children under 5 years. The aim of this study was to determine the frequency of bocavirus (BoV) in infants under 5 years with symptoms of ARI from north Argentina (Chaco province). The study was performed on nasopharyngeal aspirates from 488 patients, in the period of January-December 2014. The samples were tested by real time PCR and 36 positive BoV cases (7.4%) were detected. The period with the highest detection rate was June-September with 28 cases (77.8%), of which 26 (72.2%) were infants between 6-18 months of life. In half of BoV positive cases this virus was detected as single infection of the upper respiratory tract, and in the remaining 50%, as concomitant infection with other microorganisms. To our knowledge, this would be the first study on molecular epidemiology of BoV in northern Argentina. We emphasize the importance of investigating these new viruses capable of generating acute respiratory disease and also to disseminate awareness on their circulation within the community.

Key-words: Human bocavirus, upper respiratory infections, hospitalized children

La infección respiratoria aguda (IRA) es la enfermedad más frecuente a lo largo de la vida del ser humano y es la causa más común de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años, generando un aumento importante de las consultas externas y las hospitalizaciones en el período invernal¹.

Dentro de esta población, los diagnósticos principales son la neumonía y la enfermedad tipo influenza, seguidas de bronquitis y bronquiolitis^{2,3}. El 60% de los menores de un año y el 50% de los menores de 5 años padecen al

menos un episodio respiratorio agudo anual. Por su frecuencia, gravedad y costo en salud es un tema de claro interés prioritario².

De los múltiples agentes infecciosos involucrados en las IRA, los virus son sin duda, los principales responsables^{4,5}. Los agentes virales más comunes son: el virus sincicial respiratorio (VSR), los virus de la influenza A (FluA) y B (FluB), los virus parainfluenza 1, 2, y 3 (PIV 1, 2, 3), el adenovirus (AdV) y el rinovirus (RV)⁵⁻⁷. Según datos del Ministerio de Salud de Argentina, el VSR es el agente predominante en menores de 5 años (~75%) seguido por los PIV (~10%). En lactantes y menores de 2 años el principal agente involucrado es claramente el VSR².

La vigilancia epidemiológica es un instrumento esencial para una adecuada planificación de estrategias de preven-

Recibido: 6-I-2016

Aceptado: 21-IV-2016

Dirección postal: Gerardo D. Deluca, Roldán 1307, 3500 Resistencia, Chaco, Argentina

e-mail: delucagd@gmail.com

ción y control, para detectar epidemias, para determinar la frecuencia y distribución de los agentes responsables y para la evaluación antigénica y genética de nuevas cepas¹. El despliegue de la ciencia en el área de la biología molecular y la utilización de sus herramientas en la detección de virus respiratorios, permiten actualmente realizar un trabajo epidemiológico más ajustado y completo⁸⁻¹¹. Además, posibilita identificar agentes virales nuevos, como ocurriera en 2001 con el metapneumovirus (MPV) y en 2005 con el bocavirus (BoV)^{3, 12}.

Desde su identificación, los trabajos epidemiológicos relacionados al BoV han ido en aumento y se lo ha detectado en todo el mundo en muestras nasofaríngeas, suero y heces^{11, 13}. Si bien actualmente está muy discutido el verdadero rol de este virus en las IRA, consideramos importante conocer su circulación en distintas regiones del país para luego evaluar la necesidad de profundizar el conocimiento de su real implicancia. En la Argentina se publicaron algunos trabajos en el centro del país que señalan frecuencias de detección de alrededor del 10-20%¹⁴⁻¹⁶. Hasta 2014, se desconoce su comportamiento epidemiológico en el norte argentino.

El presente trabajo tiene como objetivo principal el estudio de la frecuencia y estacionalidad de las infecciones por BoV en menores de 5 años de la Provincia del Chaco con diagnóstico clínico presuntivo de IRA.

Materiales y métodos

Se estudiaron 488 muestras de aspirados nasofaríngeos (ANF) de menores de 5 años con diagnóstico presuntivo de IRA de la ciudad de Resistencia, Chaco, Argentina, en el período de enero a diciembre de 2014. Las muestras fueron obtenidas de pacientes que concurren a una de las principales clínicas de atención pediátrica privada de la ciudad. Cada muestra

se correspondió con un paciente y se utilizó para nuestra investigación una fracción del material obtenido para realizar el estudio virológico de rutina solicitado por el médico tratante. Esta fracción del ANS destinada al estudio de BoV en el Laboratorio de Aplicaciones Moleculares (LAM) de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), fue cedida con la autorización explícita y firmada de los padres y/o tutores de los niños, previa explicación de los fines y objetivos del estudio. Este trabajo fue aprobado por la Comisión de Ética del Instituto de Medicina Regional de la UNNE.

La detección de BoV en los ANF se realizó mediante PCR en tiempo real (qPCR) empleando sondas de hidrólisis (Taq-Man). Para esto, se utilizó una técnica de detección cualitativa en formato de paneles *multiplex* de desarrollo *in-house* tomada de varios autores, que permite detectar diversos agentes productores de patologías respiratorias y evaluar si el BoV se presenta solo o en forma conjunta con otros agentes potencialmente causantes de IRA¹⁷⁻²⁰. En la Tabla 1 se presentan los distintos paneles virales y de *Mycoplasma pneumoniae* (*My pn*) que se testearon para cada paciente. Los ácidos nucleicos (ARN y ADN) de los ANF se extrajeron mediante *kit* comercial de columnas (*High Pure Viral Nucleic Acid kit*[®], Roche) siguiendo las especificaciones del fabricante. La retrotranscripción se realizó en dos pasos con retrotranscriptasa reversa de PROMEGA (IMPROM[®]), según especificaciones del fabricante. Para la qPCR se empleó *mix* de reacción de cinética rápida de Kapa Biosystems (*KAPA Universal Probe Fast qPCR*) en un equipo ECO[®] Illumina de 4 canales. Las reacciones de qPCR se realizaron en un volumen final de 10 µl con el siguiente protocolo: 3 minutos a 95 °C para activación de la Taq polimerasa, luego 40 ciclos de 95 °C por 5 segundos y 60 °C por 30 segundos. Se utilizaron controles positivos secundarios para todos los agentes estudiados por cada ensayo realizado y se monitoreó que entre las distintas tandas procesadas los CT (ciclo de la qPCR en que la curva de amplificación corta la línea umbral establecida) de los controles no difirieran en ± 1.5 ciclos. Todas las muestras fueron testeadas a fin de evaluar la integridad de los ácidos nucleicos (RNAsa-P). La información epidemiológica de los casos estudiados se volcó, junto con los resultados obtenidos, en una planilla de cálculo confeccionada para ese fin. Una vez finalizada la recolección y estudio de las muestras se procedió a exportar dicha planilla al programa PAWS *Statistics*

TABLA 1.– *Detalle de los paneles virales y de Mycoplasma pneumoniae utilizados en este trabajo para la detección de los principales agentes involucrados en las IRA de menores de 5 años*

Agente respiratorio detectado	Fluoróforo/ Quencher	Paneles
Virus influenza A (todos los subtipos) (FluA)	FAM/BHQ1	Panel 1 (DUPLEX)16
Virus influenza B (FluB)	HEX/BHQ1	
Virus sincicial respiratorio genotipo A (VSR-A)	HEX/BHQ1	Panel 2 (DUPLEX)17
Virus sincicial respiratorio genotipo B (VSR-B)	FAM/BHQ1	
Rinovirus (RV)	Cy5/BHQ2	Panel 317
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (<i>My pn</i>)	HEX/BHQ1	Panel 418
Virus parainfluenza 1 (PIV1)	Cy5/BHQ2	Panel 5 (TRIPLEX)17
Virus parainfluenza 2 (PIV2)	HEX/BHQ1	
Virus parainfluenza 3 (PIV3)	FAM/BHQ1	
Adenovirus(AdV)	FAM/BHQ1	Panel 6 (DUPLEX)19
Bocavirus (BoV)	VIC/BHQ1	
RNAsa-p (Control Genómico)	FAM/BHQ1	Panel 716

(versión 18.0.0, IBM 2009) para realizar el análisis estadístico correspondiente.

Resultados

Se recolectaron y procesaron muestras viables de ANF de 488 menores de 5 años con diagnóstico clínico de IRA, entre los meses de enero a diciembre de 2014, siguiendo un muestreo prospectivo no probabilístico de conveniencia. El período de mayor actividad muestral comprendió los meses de mayo-octubre, en el que se recolectó y procesó el 81% del total de los ANF analizados. El 60% de las muestras correspondieron a niños que requirieron internación debido a su compromiso respiratorio.

Se observó la presencia de BoV en 36 muestras de las estudiadas (7.4%). Del total de casos positivos, 34 (94.4%) se detectaron en pacientes menores de 2 años y 26 (72.2%) correspondieron a niños de 6-18 meses de vida. En el período junio-septiembre se registró la mayor detección de casos positivos en un total de 28 pacientes (77.8%).

La infección por BoV se presentó como una infección única en 18 casos (50.0%), acompañada por alguno de los otros agentes evaluados en 14 (38.9%) y en infecciones con dos microorganismos asociados en cuatro (11.1%). Epidemiológicamente, las más importantes de estas infecciones mixtas fueron la de BoV y VSR en siete pacientes (19.4%) y la de BoV y RV en cuatro pacientes (11.1%). Estas asociaciones pueden verse en la Fig. 1.

Discusión

En este estudio se hace un primer abordaje de detección sistemática de un año calendario completo de BoV en

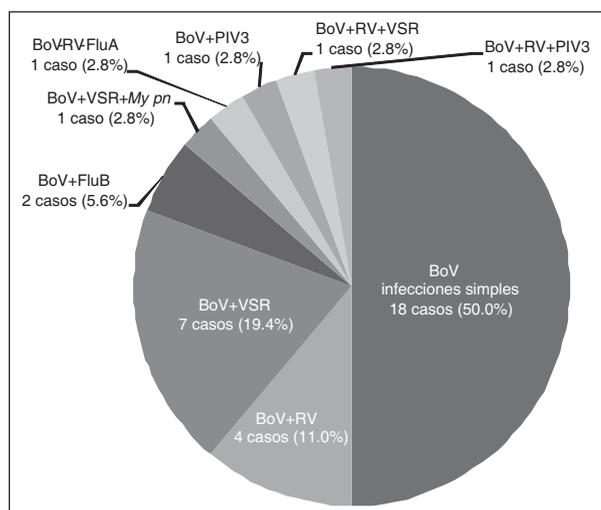


Fig. 1.— Infecciones por bocavirus en 488 pacientes menores de 5 años de la provincia de Chaco, Argentina. Detalle de las infecciones simples y concomitantes con otros microorganismos.

menores de 5 años en el norte argentino. Poco se conoce sobre su circulación en esta región del país, por lo que consideramos importante el aporte epidemiológico generado a partir de estudios exploratorios de frecuencia y estacionalidad, que permitan en un futuro próximo avanzar con investigaciones más específicas¹³.

Seguramente, una de las causas que ha ralentizado el estudio de este virus en la región es que implica necesariamente la existencia de laboratorios debidamente equipados para la aplicación de técnicas de detección molecular, dado que no existen en el mercado local *kits* diagnósticos serológicos o de detección de antígenos en ANF^{4, 6, 11}.

Sin duda, los estudios epidemiológicos y el diagnóstico de las infecciones respiratorias de origen vírico, han dado un giro rotundo a partir del desarrollo de las metodologías moleculares de detección genómica^{6, 8, 10, 21}. Hasta hace pocos años, la gran mayoría de las infecciones virales del tracto respiratorio eran frecuentemente diagnosticadas solo por la clínica^{3, 8, 11}. Actualmente, el hecho de diferenciar adecuadamente una infección viral de una bacteriana tiene un gran valor agregado, y esto solo pensando en el uso racional de los antibióticos^{7, 9, 23}.

Este trabajo muestra una frecuencia de infección por BoV de alrededor del 8% en menores de 5 años con diagnóstico presuntivo de IRA, un porcentaje similar al hallado por otros trabajos en el centro del país y que avala la hipótesis de una infección relativamente frecuente en determinadas épocas del año^{14, 16, 24}. Además, observamos una clara estacionalidad entre los meses de junio y septiembre para el año analizado, con proporciones de infección por este virus de entre 10 y 20% del total de casos positivos. También se desprende de este primer análisis estadístico que podría existir un segmento etario, entre los 6-24 meses de vida, en el que las infecciones por BoV tendrían mayor importancia^{25, 26}. Esta información es consistente con otros estudios realizados en el mundo, pero en nuestro caso particular no deja de ser una hipótesis que debiéramos confirmar cuando introduzcamos más años epidemiológicos en el análisis²⁶.

En nuestra serie, el BoV se presentó como una infección aparentemente única solo en la mitad de los casos, estando en la otra mitad acompañada por uno o dos agentes más, particularmente por VSR y RV. Y nos referimos a infecciones aparentemente únicas, porque existen virus productores de IRA que no fueron evaluados en nuestros paneles respiratorios. La infección mixta por BoV + VSR está ampliamente documentada por otros estudios, no habiendo certeza hasta el momento sobre si la presencia del BoV agravaría el cuadro por VSR. En relación con la infección de BoV + RV, tampoco hay claridad sobre cuál sería el responsable primario de la IRA. Ciertamente, un punto importante a destacar es la observación generalizada de que las infecciones virales respiratorias cursan frecuentemente como infecciones mixtas, lo cual también

complica el estudio del rol de BoV como agente etiológico primario de las IRA²⁶.

Finalmente, podemos concluir que existen todavía puntos que dilucidar respecto de la infección por este agente, y describir su circulación en distintas regiones de nuestro país es un primer paso hacia el objetivo de lograr mayor claridad sobre su rol patogénico.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

- Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Manual para el fortalecimiento de la vigilancia de la enfermedad tipo Influenza utilizando la estrategia de Unidades Centinelas de Infecciones Respiratorias Agudas Graves (IRAG). En: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/pdf/manual-ucirag.pdf>. Buenos Aires-Argentina 2011; consultado el 10/12/2015.
- Dirección de Epidemiología Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Abordaje Integral de Las Infecciones Respiratorias Agudas. Guía Para El Equipo de Salud No6 2o Edición. En: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/pdf/enf-resp-guia.pdf>. Buenos Aires-Argentina 2011; consultado el 15/12/2015.
- Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin Infect Dis* 2011; 52 (Suppl 4): S284-9.
- Kesson AM. Respiratory virus infections. *Paediatr Respir Rev* 2007; 8: 240-8.
- Bezerra PGM, Britto MC, Correia JB, et al. Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. *PLoS One* 2011; 6: e18928.
- Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 716-47.
- Shi T, McLean K, Campbell H, Nair H. Aetiological role of common respiratory viruses in acute lower respiratory infections in children under five years: a systematic review and meta-analysis. *J Glob Health* 2015; 5: 1-10.
- Olofsson S, Brittain-long R, Magnus L. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9: 615-26.
- Debiaggi M, Canducci F, Ceresola ER, Clementi M. The role of infections and coinfections with newly identified and emerging respiratory viruses in children. *Virology* 2012; 9: 247.
- Jartti T, Söderlund-Venermo M, Hedman K, Ruuskanen O, Mäkelä MJ. New molecular virus detection methods and their clinical value in lower respiratory tract infections in children. *Paediatr Respir Rev* 2013; 14: 38-45.
- Cardozo Tomas A, Ghietto LM, Insfran C, Wasinger N, Marchesi A, Adamo MP. First report of complete genome sequence and phylogenetic analysis of Human Bocavirus 1 isolated in Argentina. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 2015; 72: 161-9.
- Jartti T, Jartti L, Ruuskanen O, Söderlund-Venermo M. New respiratory viral infections. *Curr Opin Pulm Med* 2012; 18: 271-78.
- Broccolo F, Falcone V, Esposito S, Toniolo A. Human bocaviruses: Possible etiologic role in respiratory infection. *J Clin Virol* 2015; 72: 75-81.
- Ghietto LM, Cámara A, Zhou Y, et al. High prevalence of human bocavirus 1 in infants with lower acute respiratory tract disease in Argentina, 2007-2009. *Braz J Infect Dis* 2012; 16: 38-44.
- Ghietto LM, Majul D, Ferreyra Soaje P, et al. Comorbidity and high viral load linked to clinical presentation of respiratory human bocavirus infection. *Arch Virol* 2014; 160: 117-27.
- Salmón-Mulanovich G, Sovero M, Laguna-Torres VA, et al. Frequency of human bocavirus (HBoV) infection among children with febrile respiratory symptoms in Argentina, Nicaragua and Peru. *Influenza Other Respi Viruses* 2011; 5: 1-5.
- Sanghavi SK, Bullotta A, Husain S, Rinaldo CR. Clinical evaluation of multiplex real-time PCR panels for rapid detection of respiratory viral infections. *J Med Virol* 2012; 84: 162-9.
- Gunson RN, Collins TC, Carman WF. Real-time RT-PCR detection of 12 respiratory viral infections in four triplex reactions. *J Clin Virol* 2005; 33: 341-4.
- Thurman K, Warner AK, Cowart KC, Benitez AJ, Winchell JM. Detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella* spp. in clinical specimens using a single-tube multiplex real-time PCR assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70: 1-9.
- De Vos N, Vankeerberghen A, Vaeyens F. Simultaneous detection of human bocavirus and adenovirus by multiplex real-time PCR in a Belgian paediatric population. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 1305-10.
- Marcone DN, Carballal G, Ricarte C, Echavarría M. Respiratory viral diagnosis by using an automated system of multiplex PCR (FilmArray) compared to conventional methods. *Rev Argent Microbiol* 2015; 47: 29-35.
- Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Recomendaciones para la vigilancia, prevención y atención de las infecciones respiratorias agudas en Argentina. Actualización Mayo de 2015. En: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000476cnt-recomendaciones-vigilancia-prevencion-atencion-infecciones-respiratorias-agudas-abril-2015.pdf>; consultado el 15/07/2015.
- Bosch ATM, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EM, Bogaert D. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003057.
- Moreno L, Eguizábal L, Ghietto LM, Bujedo E, Adamo MP. Human bocavirus respiratory infection in infants in Córdoba, Argentina. *Arch Argent Pediatr* 2014; 112: 70-4.
- Pilger DA, Cantarelli VV, Amantea SL, Leistner-Segal S. Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106: 56-60.
- Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol* 2012; 22: 46-64.