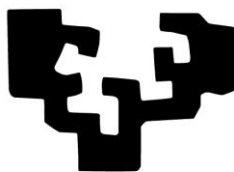


eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco      Euskal Herriko Unibertsitatea

Facultad de Medicina y Enfermería  
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública

**Características clínicas y epidemiológicas de las infecciones  
producidas por los virus parainfluenza humanos en niños  
hospitalizados durante el periodo 2007-2016.**

Tesis Doctoral

Nerea Echeverría Hernando

Octubre, 2017



*A todos los que han hecho posible esta tesis doctoral.*



## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible este proyecto.

Especial mención a los directores; al profesor Eduardo González Pérez-Yarza, por su profesionalidad y dedicación, por su accesibilidad y disponibilidad continuas durante todos estos años y por todas las palabras de ánimo; gracias por darme todas las facilidades para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Al Doctor Gustavo Cilla Eguiluz, por su profesionalidad, su precisión y su espíritu crítico. Gracias por tu exhaustivo trabajo.

Al servicio de Microbiología por su inestimable ayuda en la obtención e interpretación de datos microbiológicos.

A todos los miembros del servicio de Pediatría que con el trabajo que realizan diariamente en el servicio de Urgencias de Pediatría, han contribuido a que este trabajo sea posible.

A ellas, por todos los ánimos que he recibido durante tantos años, por haberme dado ese aliento cuando más lo he necesitado, porque son incansables. Gracias por creer en mí siempre.

A mis padres por apoyarme siempre en todo y con todo, por su sacrificio constante y por haberme inculcado sus valores y principios. A mi hermano por haberme transmitido su tesón, su dedicación y capacidad de esfuerzo. Gracias por confiar en mí.

A Unai, por ser mi compañero de equipo y mi referente a nivel profesional. Milesker bihotzez.



## ÍNDICES





# ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	21
1.1. CARACTERÍSTICAS VIRALES.....	22
1.1.1. Replicación viral.....	27
1.1.2. Serotipos y variabilidad.....	28
1.2. PATOGENIA.....	29
1.2.1. Tropismo de los tejidos y citopatología.....	31
1.2.2. Factores que contribuyen a la patogénesis del VPI.....	32
1.2.3. Contribución de las proteínas accesorias C y V del VPIH a la patogénesis.....	32
1.2.4. Respuesta inflamatoria e inmune.....	33
1.3. EPIDEMIOLOGÍA.....	37
1.3.1. Transmisión.....	37
1.3.2. Periodo de incubación, periodo de contagio y excreción.....	38
1.3.3. Factores de riesgo.....	38
1.3.4. Resistencia a condiciones ambientales.....	39
1.3.5. Estacionalidad.....	40
1.3.6. Codetecciones virales.....	40
1.3.7. Huéspedes.....	40
1.3.8. Otros datos epidemiológicos.....	42
1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	42
1.4.1. Laringitis.....	45
1.4.2. Bronquiolitis.....	45
1.4.3. Neumonía.....	46
1.4.4. Traqueobronquitis.....	47

1.4.5. Episodios de apnea.....	47
1.4.6. Faringitis .....	47
1.4.7. Conjuntivitis.....	48
1.4.8. Otitis media aguda .....	48
1.4.9. Rinitis .....	48
1.4.10. Afectación neurológica .....	48
1.4.11. Inmunodepresión.....	49
1.4.12. Otros síndromes o entidades.....	50
1.5. DIAGNÓSTICO .....	51
1.5.1. Muestras clínicas .....	52
1.5.2. Métodos de diagnóstico viral empleados en el laboratorio.....	54
1.5.2.1. Aislamiento mediante cultivo celular .....	54
1.5.2.2. Microscopía electrónica.....	57
1.5.2.3. Detección de antígenos.....	57
1.5.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	58
1.5.2.5. Serología.....	60
1.6. TRATAMIENTO .....	62
1.7. PREVENCIÓN .....	64
1.7.1. Medidas preventivas generales .....	64
1.7.2. Vacunas en desarrollo.....	64
1.8. IMPACTO EN SANIDAD .....	70
1.8.1. Morbimortalidad .....	70
1.8.2. Infección nosocomial.....	72
1.8.3. Impacto socioeconómico.....	72

2. JUSTIFICACIÓN.....	77
3. HIPÓTESIS.....	81
4. OBJETIVOS.....	85
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	89
5.1. ÁMBITO DEL ESTUDIO.....	89
5.2. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	90
5.2.1. Tipo de estudio.....	90
5.2.2. Selección de la población.....	91
5.2.3. Toma y procesamiento de muestras .....	91
5.2.3.1. Procedimiento para el aspirado nasofaríngeo .....	91
5.2.3.2. Procedimiento para el exudado faríngeo .....	92
5.2.3.3. Envío al laboratorio .....	93
5.2.3.4. Procesamiento de la muestra .....	93
5.2.3.5. Interpretación de los resultados.....	95
5.2.3.6. Instalaciones especiales y equipos de investigación .....	95
5.3. DATOS CLÍNICOS Y DEFINICIONES .....	96
5.3.1. Variables epidemiológicas.....	96
5.3.2. Variables clínico-analíticas .....	97
5.3.3. Variables del ingreso.....	98
5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	99
5.5. BIBLIOGRAFÍA .....	100
5.6. ASPECTOS ÉTICOS .....	100
6. RESULTADOS .....	103
6.1. EPIDEMIOLOGÍA GENERAL.....	103

6.1.1. Circulación de virus parainfluenza humanos en relación a otros virus respiratorios .....	103
6.1.2. Datos generales de VPIH .....	110
6.1.2.1. Distribución global por sexo y edad .....	110
6.1.2.2. Distribución anual y estacional de los casos de VPIH.....	110
6.1.2.3. Serotipos de VPIH: datos globales y distribución por edades .....	113
6.1.2.4. serotipos de VPIH: distribución anual y estacional .....	114
6.1.2.5. Pacientes con más de un episodio de infección por VPIH .....	121
6.1.2.6. Detección de múltiples virus .....	122
6.2. VPIH EN EL ÁMBITO HOSPITALARIO .....	124
6.2.1. Descripción general de la muestra .....	124
6.3. INFECCIÓN RESPIRATORIA ASOCIADA A VPIH .....	127
6.3.1. Epidemiología .....	127
6.3.2. Sintomatología clínica .....	133
6.3.3. Laboratorio .....	136
6.3.4. Radiología .....	139
6.3.5. Diagnósticos.....	141
6.3.6. Impacto sanitario .....	146
6.3.6.1. Hospitalización .....	146
6.3.6.2. Estancia media.....	149
6.3.6.3. Antibioticoterapia .....	151
6.3.6.4. Fiebre .....	153
6.3.6.5. Oxigenoterapia .....	154
6.3.7. Expresión clínica de la infección por VPIH .....	156
6.3.7.1. Infección de vías respiratorias superiores.....	156

6.3.7.2. Bronquiolitis.....	157
6.3.7.3. Bronquitis/Neumonía .....	159
6.3.7.4. Síndrome febril .....	160
6.3.7.5. Asma.....	162
6.3.7.6. Episodios de apnea.....	164
6.3.7.7. Laringitis.....	165
6.3.7.8. Patología gastrointestinal .....	168
6.3.7.9. Patología neurológica.....	168
7. DISCUSIÓN.....	171
7.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	171
7.2. ANTECEDENTES PERSONALES Y PATOLOGÍA PREVIA .....	179
7.3. CLÍNICA.....	180
7.4. SÍNDROMES CLÍNICOS.....	183
7.5. IMPACTO.....	189
7.6. LIMITACIONES.....	197
8. CONCLUSIONES .....	201
9. BIBLIOGRAFÍA.....	207
10. ANEXOS.....	239

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Relación taxonómica de los tipos de VPI dentro de la familia Paramyxoviridae.....	22
Tabla 2.-Tabla resumen de las proteínas estructurales, localización y función. ....	24
Tabla 3.- Características de las infecciones por VPIH. ....	44
Tabla 4.- Definición de temporadas durante el periodo de estudio .....	96
Tabla 5.- Virus respiratorios detectados en los distintos episodios durante el periodo de estudio. ....	104
Tabla 6.- Distribución de las detecciones únicas y múltiples durante el periodo de estudio.....	105
Tabla 7.- Distribución de la cohorte VPIH por grupos de edad. ....	110
Tabla 8.- Distribución de la cohorte VPIH global por temporadas.....	111
Tabla 9.- Distribución estacional de la cohorte VPIH global.....	112
Tabla 10.- Distribución de los serotipos según la edad en la cohorte VPIH global. ....	113
Tabla 11.- Características de las detecciones repetidas de VPIH durante el periodo de estudio.....	121
Tabla 12.- Detecciones de otros virus junto a VPIH durante el periodo estudiado. ....	122
Tabla 13.- Análisis de las detecciones múltiples y los serotipos VPIH de la cohorte VPIH global.....	123
Tabla 14.- Relación de otros virus respiratorios en la cohorte VPIH-infección respiratoria. ....	125
Tabla 15.- Infecciones bacterianas asociadas a VPIH en la cohorte VPIH-infección respiratoria. ....	126
Tabla 16.- Distribución de los serotipos en las infecciones nosocomiales de la cohorte VPIH-infección respiratoria. ....	127
Tabla 17.- Edad, sexo y serotipos en el grupo de infección respiratoria, excluyendo los casos con detecciones virales múltiples. ....	128
Tabla 18.- Relación entre las variables relacionadas con el paciente y los serotipos en la cohorte de VPIH-infección respiratoria, excluyendo las detecciones virales múltiples. ....	130
Tabla 19.- Relación entre las variables relacionadas con el paciente y los casos de VPIH único versus VPIH múltiple. ....	131
Tabla 20.- Relación entre las variables ambientales paciente y los casos VPIH único versus detecciones virales múltiples.....	132
Tabla 21.- Relación entre variables ambientales y los serotipos en la cohorte de VPIH-infección respiratoria, excluyendo las codetecciones de otros virus respiratorios. ....	132

Tabla 22.- Distribución de las variables clínicas de la cohorte VPIH-infección respiratoria y las diferencias entre VPIH único y detección en la misma muestra de otros virus (codetección viral).....	133
Tabla 23.- Distribución de las variables clínicas por serotipos en el grupo VPIH único.....	134
Tabla 24.- Relación entre las variables clínicas y los grupos de edad en el grupo VPIH único.....	135
Tabla 25.- Distribución de las variables clínicas en el grupo VPIH único entre los hospitalizados y no hospitalizados. ....	135
Tabla 26.- Datos analíticos de la cohorte infección respiratoria y diferencias entre el grupo VPIH único y VPIH múltiple. ....	136
Tabla 27.- Datos analíticos por serotipos en el grupo VPIH único. ....	137
Tabla 28.- Datos analíticos por grupos de edad en el grupo de VPIH único.....	138
Tabla 29.- Datos analíticos en el grupo VPIH único entre los hospitalizados y no hospitalizados. ....	139
Tabla 30.- Datos radiológicos de la cohorte infección respiratoria y diferencias entre el grupo VPIH único y VPIH múltiple.....	140
Tabla 31.- Datos radiológicos por serotipo en el grupo de VPIH único.....	140
Tabla 32.- Datos radiológicos por edades en el grupo VPIH único.....	141
Tabla 33.- Datos radiológicos en el grupo VPIH único entre los hospitalizados y no hospitalizados. ....	141
Tabla 34.- Relación entre el diagnóstico de alta y el grupo de VPIH único y VPIH múltiple. ....	142
Tabla 35.- Distribución de los diagnósticos al alta por serotipo en el grupo de VPIH único. ....	143
Tabla 36.- Diagnósticos al alta y edad media en el grupo de VPIH único.....	143
Tabla 37.- Distribución de los diagnósticos de alta por grupos de edad en el grupo de VPIH único.....	144
Tabla 38.- Distribución de los diagnósticos de alta entre hospitalizados y no hospitalizados. ....	145
Tabla 39.- Distribución de los diferentes destinos asistenciales de la cohorte de infección respiratoria en función de tres criterios: infecciones con detección VPIH único o con codetección de otros virus, serotipo y grupos de edad. ....	147
Tabla 40.- Incidencia anual estimada de detección de VPIH en pacientes atendidos en Urgencias de Pediatría.....	148
Tabla 41.- Incidencia media anual (casos/10.000 habitantes) estimada de ingresos hospitalarios en relación a la edad entre julio 2007 y junio 2016. ....	149

Tabla 42.- Incidencia media anual/10.000habitantes de ingresos hospitalarios en relación a la edad por serotipos entre julio 2007 y junio 2016 (teniendo en cuenta todas las detecciones de VPIH). .....	149
Tabla 43.- Distribución de los diferentes destinos asistenciales de la cohorte de infección respiratoria en función de tres criterios: infecciones con detección VPIH único o con codetección de otros virus, serotipo y grupos de edad. ....	150
Tabla 44.- Distribución de los antibióticos en la cohorte VPIH único-infección respiratoria.....	151
Tabla 45.- Empleo de antibioticoterapia en la cohorte VPIH-infección respiratoria y diferencias entre el grupo VPIH único y múltiples. ....	151
Tabla 46.- Antibioticoterapia por serotipos en el grupo de VPIH único. ....	152
Tabla 47.- Antibioticoterapia por grupos de edad en el grupo de VPIH único.....	152
Tabla 48.- Indicación de antibióticos y duración en los diferentes síndromes clínicos del grupo de infección por VPIH único (n=261). ....	153
Tabla 49.- Días de fiebre en la cohorte de infección respiratoria en función de tres criterios: infecciones con detección VPIH único o múltiple, serotipo y grupos de edad.....	154
Tabla 50.- Días de oxigenoterapia en la cohorte de infección respiratoria en función de tres criterios: infecciones con detección VPIH único o múltiple, serotipo y grupos de edad. ....	155
Tabla 51.- Distribución de los serotipos de VPIH en función de la edad, en niños con diagnóstico de infección de vía respiratoria superior. ....	156
Tabla 52.- Datos evolutivos de los pacientes hospitalizados por infección de vía respiratoria superior..	157
Tabla 53.- Distribución de los serotipos de VPIH en función de los grupos de edad con diagnóstico de bronquiolitis. ....	158
Tabla 54.- Variables de evolución relacionadas con el diagnóstico de bronquiolitis.....	159
Tabla 55.- Distribución de los serotipos de VPIH en relación a los grupos de edad con diagnóstico de bronquitis/neumonía.....	159
Tabla 56.- Variables de evolución en los pacientes con diagnóstico de bronquitis/neumonía. ....	160
Tabla 57.- Distribución de los serotipos de VPIH en relación a los grupos de edad con diagnóstico de síndrome febril. ....	161
Tabla 58.- Variables de evolución en los casos diagnosticados de síndrome febril. ....	162
Tabla 59.- Distribución de los serotipos por grupos de edad en los casos diagnosticados de asma. ....	162
Tabla 60.- Variables de evolución en los diagnosticados de asma. ....	163



Tabla 61.- Variables de evolución en los diagnósticos de episodios de apnea. ....	164
Tabla 62.- Distribución de los grupos de edad por serotipos en los casos diagnosticados de laringitis. .	165
Tabla 63.- Variables evolutivas de los pacientes con diagnóstico de laringitis. ....	166
Tabla 64.- Comparación de la incidencia de hospitalización obtenida en el presente estudio y en otros realizados en EEUU. ....	190
Tabla 65.- Comparación de la incidencia de hospitalización para diferentes virus respiratorios en diferentes estudios realizados en Gipuzkoa. ....	191
Tabla 66.- Trabajos realizados en España que analizan el papel de los VPIH en las infecciones respiratorias. ....	195

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Estructura del virus parainfluenza [modificado de Schmidt et al. 2011 (7)].	26
Figura 2.- Replicación viral del virus parainfluenza [modificado de Murray et al. 2007 (22)]	27
Figura 3.- Esquema ilustrativo de las vías respiratorias.	43
Figura 4.- Vacunas de virus vivo atenuado en desarrollo clínico [modificado de Schmidt et al, 2011 (7)]	69
Figura 5.- Municipios y comarcas de Gipuzkoa.	89
Figura 6.- Material de aspirado nasofaríngeo.	92
Figura 7.- Hisopo y medio de transporte para virus.	93
Figura 8.- Termociclador CFX96 (BioRad) empleado en pruebas de PCR en tiempo real multiplex.	94
Figura 9.- Extractor de ácidos nucleicos Easy-MAG.	95
Figura 10.- Diagrama de flujo de los episodios analizados en el periodo de estudio.	103
Figura 11.- Distribución de los virus respiratorios durante el periodo de estudio.	105
Figura 12.- Distribución por meses de los virus respiratorios detectados en los distintos episodios durante el periodo de estudio.	107
Figura 13.- Distribución por trimestres de los virus respiratorios detectados en los distintos episodios durante el periodo de estudio.	108
Figura 14.- Distribución por grupo de edad de los virus respiratorios detectados en los distintos episodios durante el periodo de estudio.	109
Figura 15.- Distribución de los serotipos de VPIH en cada temporada del periodo de estudio.	111
Figura 16.- Diagrama de barras de la distribución mensual de la cohorte VPIH. Los porcentajes situados encima de las barras son porcentajes relativos, respecto al total de VPIH detectados.	112
Figura 17.- Diagrama de barras de la distribución anual del VPIH-1 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-1 detectados).	114
Figura 18.- Diagrama de barras de la distribución mensual del VPIH-1 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-1 detectados).	115
Figura 19.- Diagrama de barras de la distribución anual del VPIH-2 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-2 detectados).	116

Figura 20.- Diagrama de barras de la distribución mensual del VPIH-2 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-2 detectados).....	116
Figura 21.- Diagrama de barras de la distribución anual del VPIH-3 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-3 detectados). .....	117
Figura 22.- Diagrama de barras de la distribución mensual del VPIH- 3 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-3 detectados).....	118
Figura 23.- Distribución de los VPIH-1 y VPIH-3 durante el periodo de estudio. ....	118
Figura 24.- Diagrama de barras de la distribución anual del VPIH-4 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-4 detectados). ....	119
Figura 25.- Diagrama de barras de la distribución por mensual del VPIH-4 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-4 detectados). ....	120
Figura 26.- Circulación mensual de los diferentes serotipos de la cohorte VPIH global durante el periodo de estudio.....	120
Figura 27.- Diagrama de flujo de la cohorte VPIH global. ....	124
Figura 28.- Diagrama de flujo de la cohorte VPIH-infección respiratoria. ....	125
Figura 29.- Gráfico de distribución global de la cohorte VPIH-infección respiratoria por destinos asistenciales.....	146
Figura 30.- Circulación mensual de VPIH y distribución mensual de casos de laringitis desde el 1-7-2013 hasta el 30-6-2016. ....	167
Figura 31.- Circulación de otros virus respiratorios desde el 1-7-2013 al 30-6-2016 (marcado con un rectángulo los periodos de aumento de casos de laringitis).....	168

## GLOSARIO GENERAL DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Ag	Antígenos
ANF	Aspirado nasofaríngeo
ARN	Ácido ribonucleico
ARNv	ARN viral
ARNm	ARN mensajero
dsARN	ARN bicatenario
ELISA	Enzimoinmunoanálisis
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
EEUU	Estados Unidos
F	Proteína de fusión
FIA	Fluoroinmunoensayo
GEMA	Guía española del manejo del asma
H	Hemaglutinina
HAd	Hemadsorción
HAdI	Inhibición de la hemadsorción
HI	Inhibición de la hemaglutinación
HN	Glicoproteína hemaglutinina-neuraminidasa
VPIH	Virus parainfluenza humano
VPIH-1	Virus parainfluenza humano serotipo 1
VPIH-2	Virus parainfluenza humano serotipo 2
VPIH-3	Virus parainfluenza humano serotipo 3
VPIH-4	Virus parainfluenza humano serotipo 4
HUD	Hospital Universitario Donostia
IFN	Interferón
IFR-3	Factor regulador del interferón 3
IF	Inmunofluorescencia

IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleuquina
IVRS	Infección de vía respiratoria superior
L	ARN polimerasa, proteína larga
LES	Lupus eritematoso sistémico
LCR	Líquido cefalorraquídeo
M	Proteína de la matriz
MAbs	Anticuerpos monoclonales
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MDA5	Gen asociado a la diferenciación del melanoma 5
MEM	Medio esencial mínimo
MPVH	Metapneumovirus
NIAID	Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas
NF-kB	Factor nuclear kappa b
NP	Proteína de la nucleocápside
OM	Otitis media
OMA	Otitis media aguda
OMS	Organización Mundial de la Salud
OUP	Observación de urgencias de pediatría
P	Fosfoproteína
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa a tiempo real
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
STAT	Transductor de la señal y activador de la transcripción
STAT 1	Transductor de la señal y activador de la transcripción tipo 1
STAT 2	Transductor de la señal y activador de la transcripción tipo 2
SeV	Virus Sendai
rSeV	Virus Sendai recombinante

TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
UCIP	Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos
VMNI	Ventilación mecánica no invasiva
VMI	Ventilación mecánica invasiva
VPI	Virus parainfluenza
VPIH	Virus parainfluenza humanos
VPIH-1	Serotipo 1 de los virus parainfluenza humanos
VPIH-2	Serotipo 2 de los virus parainfluenza humanos
VPIH-3	Serotipo 3 de los virus parainfluenza humanos
VPIH-4	Serotipo 4 de los virus parainfluenza humanos
VRS	Virus respiratorio sincitial







## **1. INTRODUCCIÓN**



## **1. INTRODUCCIÓN**

La infección respiratoria aguda es la enfermedad más frecuente a lo largo de la vida del ser humano, presentando variaciones en su etiología condicionadas, fundamentalmente, por la edad, las circunstancias medioambientales, el ámbito asistencial y las enfermedades de base.

En nuestro entorno, las enfermedades infecciosas son el motivo de consulta más frecuente en Pediatría. De ellas, aproximadamente el 70% corresponde a una infección respiratoria. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) las infecciones respiratorias agudas causan el 16% de las muertes de niños menores de cinco años que tienen lugar en todo el mundo. Los virus son responsables de un importante porcentaje de estas infecciones en la infancia y causan una considerable mortalidad; siendo los más frecuentemente implicados virus respiratorio sincitial (VRS), influenza, virus parainfluenza humano (VPIH), adenovirus, rinovirus y metapneumovirus (1). La mayoría de las infecciones respiratorias sólo afectan al tracto respiratorio superior y pueden ser consideradas leves, de curso benigno y autolimitado. Sin embargo, se estima que alrededor del 5% pueden afectar al tracto respiratorio inferior, siendo potencialmente más graves y requiriendo en muchos casos la hospitalización (2).

Los VPIH son patógenos respiratorios tanto en niños como en adultos. En Pediatría, se estima que la mayor parte de las infecciones producidas por VPIH se tratan de manera ambulatoria. Sin embargo, se ha considerado que VRS y VPIH son los patógenos virales que causan más infecciones del tracto respiratorio inferior en niños (3), siendo VPIH el segundo virus más frecuentemente detectado entre las hospitalizaciones por esta causa (4)(5), si bien, otros autores lo sitúan tercero tras VRS y adenovirus (6). Por último en algunos trabajos se ha encontrado a los VPIH responsables de un número mayor de hospitalizaciones en niños menores de cinco años que los virus influenza (7).

Los VPIH fueron descubiertos entre los años 1956 y 1960. Chanock informó del aislamiento de un nuevo virus en Cincinnati (USA) (que finalmente sería el primer virus parainfluenza), a partir de un niño con laringitis (8). En 1958 fueron descritos, en niños con infecciones del tracto respiratorio inferior, otros dos nuevos *mixovirus* humanos diferentes al anterior, en base a su capacidad para absorber eritrocitos de conejo de Guinea en cultivo celular (9). Los tres virus compartían muchas características biológicas y para ellos y para el virus murino Sendai se acuñó en 1959 el término para-influenza, en base a la naturaleza respiratoria de las infecciones que causan y las propiedades físicas y morfológicas de las partículas virales, incluyendo la posesión de una envoltura de naturaleza lipídica, así como hemaglutinina y neuraminidasa (10). En esta temprana publicación se sugirieron los nombres de virus parainfluenza 1, 2 y 3

[VPIH-1, VPIH-2 (el aislado en 1956) y VPIH-3, respectivamente]. Un cuarto virus con características similares (VPIH-4) fue identificado en 1960, en niños y adultos con enfermedad del tracto respiratorio superior e incorporado al nuevo grupo (11)(12)(13).

### 1.1. CARACTERÍSTICAS VIRALES

Los virus parainfluenza humanos (VPIH) pertenecen a la familia *Paramyxoviridae* y subfamilia *Paramyxovirinae*, dentro del orden *Mononegavirales*, que son los virus con genoma ARN no segmentado, de polaridad negativa. Dentro de esta subfamilia se encuentran los géneros *Respirovirus* que incluye a los virus (especies) humanos (VPIH-1 y VPIH-3) y *Rubulavirus* que incluye a los virus (especies) humanos (VPIH-2 y VPIH-4) y también al virus de la parotiditis (11)(12)(14). Es interesante que esta subfamilia incluye otros dos géneros de gran importancia en patología humana, concretamente los géneros *Morbillivirus*, con el virus del sarampión, y *Megamyxo* o *Henipavirus*, que agrupa a los virus Hendra y Nipah. Por otra parte, la familia *Paramyxoviridae* incluye la subfamilia *Pneumovirinae*, con los géneros *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*, que incluyen a otros dos destacados virus patógenos humanos como son los virus respiratorio sincitial y metapneumovirus, respectivamente. Además de en humanos, los virus de la familia *Paramyxoviridae* tienen un importante papel en patología veterinaria (tabla 1).

**Tabla 1.-** Relación taxonómica de los tipos de VPI dentro de la familia *Paramyxoviridae*.

Género	Especies	
	Humano	Animal
<b>Subfamilia <i>Paramyxovirinae</i></b>		
<b><i>Respirovirus</i></b>	VPIH-1, VPIH-3	Sendai (VPI-1 del ratón), VPI-3 bovino, VPI-10 simio
<b><i>Rubulavirus</i></b>	VPIH-2, VPIH-4, Parotiditis	NDV, virus Yucaipa, virus Kunitachi, VPI-3 aviar, VPI-4 aviar, y VPI aviar del 6 al 9. Paramixovirus La Piedad Michoacán (PVLPM), VPI-5 y VPI-41 simios
<b><i>Morbillivirus</i></b>	Sarampión	Virus canino, peste bovina, morbillivirus del delfín y de la marsopa, virus de los pequeños rumiantes
<b><i>Megamixovirus</i></b>	Virus Hendra, virus Nipah	Hendra equino, Nipah porcino y murciélago

<b>Subfamilia <i>Pneumovirinae</i></b>		
<b><i>Pneumovirus</i></b>	VRS	VRS bovino, virus de la neumonía de los ratones
<b><i>Metapneumovirus</i></b>	HMPV	Pneumovirus aviar

[Modificado de Henrickson et al, 2003 (4)]

Esta nomenclatura, vigente durante décadas, está experimentando pequeñas modificaciones (ejemplo re-denominación de VPIH-1 y 3 como respirovirus humanos 1 y 3 y VPIH-2 y VPIH-4 como rubulavirus humanos 2 y 4) siguiendo al *International Committee on Taxonomy of viruses* (ICTV) (<https://talk.ictvonline.org/>), pero en esta Tesis Doctoral, por razones de claridad, se mantendrá la terminología más ampliamente usada en la literatura médica, que sigue siendo la más común en la actualidad.

Los VPIH se dividen clásicamente en cuatro tipos en función de sus características genéticas y antigénicas, del 1 al 4, siendo los cuatro patógenos humanos. Además se han descrito subtipos dentro de la especie VPIH-4 (subtipos A y B) y genotipos de VPIH-1 y de VPIH-3 (4), conformando un grupo con variabilidad genética importante.

Los virus parainfluenza son virus pleomórficos, envueltos, que consisten en una partícula o virión, habitualmente esférica, de entre 150 y 200 nm de diámetro. Los viriones poseen una nucleocápside rodeada de una envoltura lipídica (bicapa) obtenida de la membrana plasmática de la célula huésped cuando el virus abandona la célula. La nucleocápside contiene un ARN helicoidal, con una única cadena de ARN de sentido negativo y aproximadamente 15.500 nucleótidos de longitud, y codifica seis proteínas virales estructurales comunes: la mayor es la ARN polimerasa (L), que junto con la proteína de la nucleocápside (NP) y la fosfoproteína (P) conforman la nucleocápside viral; las dos glicoproteínas, de fusión (F) y hemaglutinina-neuraminidasa (HN) se sitúan en la superficie de membrana y por último la proteína de membrana o matriz (M), no glicosilada, que se sitúa en la parte interna de la envoltura lipídica (12)(14). Algunas propiedades y funciones destacadas de estas proteínas son las siguientes:

- Proteína HN (tetramérica). Es una glicoproteína transmembrana de fijación viral, que permite la unión a la superficie de las células diana. También causa hemadsorción y hemoaglutinación, propiedades empleadas en el diagnóstico. Principal antígeno viral, estímulo para la generación en el huésped de una respuesta neutralizante.
- Proteína F (trimérica). Glicoproteína transmembrana que forma espigas salientes en la envoltura. Promueve la fusión de las membranas del huésped y de la célula viral, paso inicial en la infección. Se sintetiza como una forma biológicamente inactiva (F<sub>0</sub>), la cual es activada por una escisión proteolítica a una forma activa que tiene dos subunidades,

F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>, ligadas por un enlace bisulfuro. Es un antígeno viral importante, y un estímulo adicional para la generación en el huésped de una respuesta neutralizante.

- Proteína M. Hidrofóbica. Recubre la superficie interior de la envoltura.
- Proteína L. De alto peso molecular: es la ARN polimerasa (ARN-dependiente).
- Proteína P. Facilita la síntesis de ARN (es un cofactor para la ARN polimerasa). Ayuda a mantener la estructura del genoma.
- Proteína N (NP). La más abundante de la nucleocápside. Recubre el ARN genómico, a razón de una molécula por cada seis nucleótidos, dando estabilidad a la nucleocápside y ayudando a mantener la estructura del genoma.

**Tabla 2.-**Tabla resumen de las proteínas estructurales, localización y función.

Proteína estructural	Designación	Localización	Función
<b>Hemaglutina-neuraminidasa</b>	<b>HN</b>	Envoltura	Fijación a receptores en la célula huésped, actividad de hemaglutinina y neuraminidasa
<b>Proteína de fusión</b>	<b>F</b>	Envoltura	Fusión, penetración, hemólisis
<b>Proteína de matriz</b>	<b>M</b>	Dentro de la envoltura	Ensamblaje
<b>Nucleoproteína</b>	<b>NP</b>	Nucleocápside	Forma complejos con el genoma de ARN
<b>Fosfoproteína</b>	<b>P</b>	Nucleocápside	Parte del complejo de polimerasa del ARN
<b>Proteína mayor</b>	<b>L</b>	Nucleocápside	Parte del complejo de polimerasa del ARN

Los genomas de los VPIH-1, VPIH-2 y VPIH-3 tienen tamaño similar (15,5-15,7 kb), mientras que el del VPIH-4 es algo mayor (17,4 kb). El genoma de los cuatro virus comparte el mismo orden de seis genes: 3'-N-P-M-F-HN-L que se transcriben secuencialmente dando lugar a seis ARNm separados (12)(15).

Se ha demostrado, mediante electroforesis, que el tamaño de las proteínas es similar entre los cuatro serotipos, excepto la fosfoproteína; VPIH-2 y VPIH-4 (*Rubulavirus*) tienen una fosfoproteína con un peso molecular (pm) entre 49.000 y 53.000 Da, mientras que las de VPIH-1 y VPIH-3 tienen un pm entre 83.000 y 90.000 Da. La proteína más larga o de mayor peso molecular del VPIH es la proteína mayor (L) de la nucleocápside (pm de 175.000 a 251.000

Da), seguida de la proteína P. Las proteínas HN (pm 69.000 a 82.000 Da) y F (pm 28.000 a 66.000 Da), son glicoproteínas transmembrana que protruyen hacia el exterior de la cubierta lipídica y forman las principales dianas antigénicas para los anticuerpos neutralizantes. Sus colas hidrofóbicas se proyectan a través de la membrana hacia el virión, donde interactúan con la proteína M (se encuentra debajo de la membrana viral, pm 28.000 a 40.000 Da) (4) para ayudar al ensamblaje del virus (16). La nucleocápside se compone de las proteínas NP, P y L junto con el ARN viral. La proteína NP, como se ha referido antes, se une fuertemente al genoma viral. Esta proteína, crea un molde que facilita la acción de la ARN polimerasa ARN-dependiente compuesta por las proteínas P y L (17).

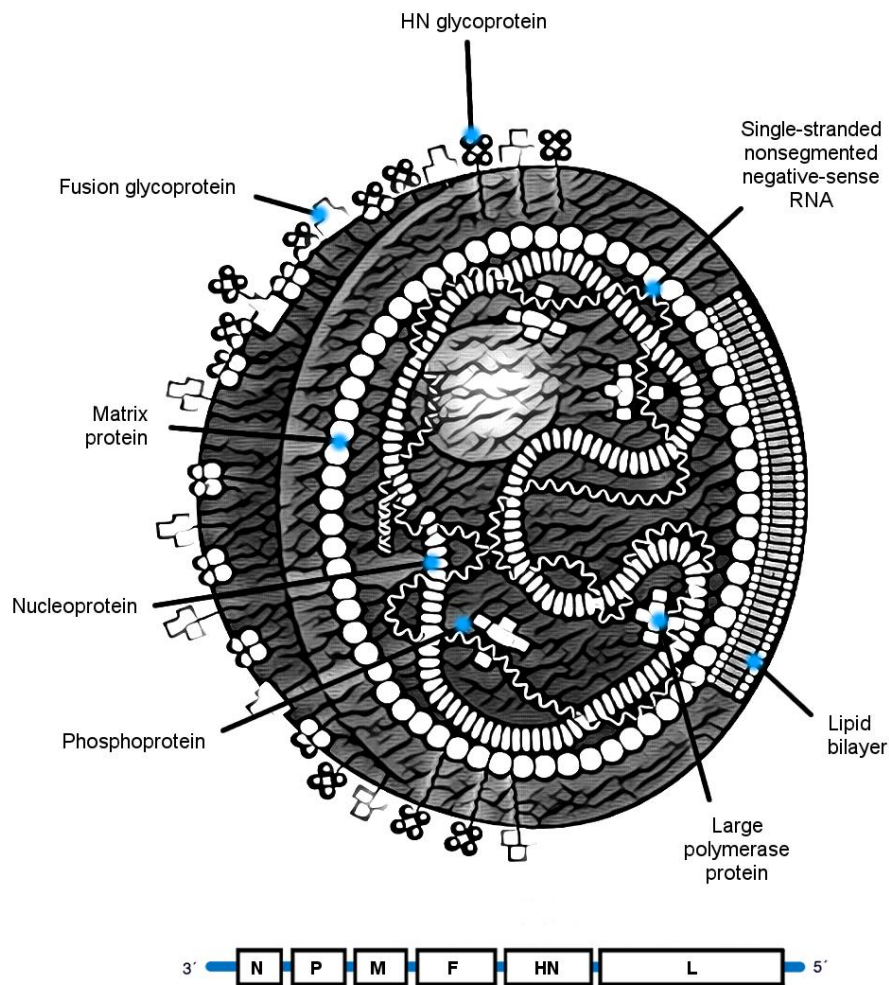
La glicoproteína HN está implicada en la unión del virus a la célula huésped mediante la interacción con los residuos de ácido siálico de la superficie celular. Esta interacción permite a continuación a la proteína F mediar la fusión entre el virus y la membrana celular, que es imprescindible para que la nucleocápside entre e infecte la célula huésped (18), es decir, las glicoproteínas son las responsables de la entrada de los VPIH en las células respiratorias epiteliales, donde se replican de manera exclusiva (19).

El gen P codifica además proteínas adicionales (no esenciales) que varían entre los diferentes serotipos (15). Cada tipo de VPIH expresa al menos una proteína no esencial para la replicación viral *in vitro* (llamada también proteína accesoria). Así, el gen P de VPIH-1 y de VPIH-3 codifica proteínas cortas C, exclusivas de los *Respirovirus*; el gen P de VPIH-2 y VPIH-3 codifica la proteína V; y el de VPIH-3 expresa también la proteína D. Las proteínas C y V inhiben la respuesta inmune innata de la célula huésped, suprimiendo la actividad de los interferones tipo I (IFN I), bloqueando tanto su inducción como su capacidad para señalar la respuesta antiviral de las células huésped. La función de la proteína D es desconocida (7)(12)(20)(21).

Como se ha referido antes el ARN viral o genómico (ARNv), junto con las proteínas NP, P y L conforman la nucleocápside. Durante el proceso de replicación, la proteína NP se une al ARNv, formando una plantilla que permite al complejo formado por las proteínas L y P transcribir (es decir, generar ARN mensajeros que serán traducidos a proteínas virales en los ribosomas celulares) y ocasionalmente replicar el genoma del VPI (a través de la creación de una copia complementaria exacta del ARNv llamada antígenoma por ser de polaridad positiva). La proteína M se sitúa en la cara interna de la membrana celular infectada y tiene un papel importante en la conformación viral: por un lado atrae a las nuevas nucleocápsides a las áreas en las que pronto se rodearán de la envoltura viral para generar los viriones maduros y por otro interactúan con las nuevas proteínas de superficie (HN y F) dirigiendo su inserción en la membrana y la agregación en localizaciones específicas de la membrana celular. Es en estas

localizaciones, donde tras la llegada de las nucleocápsides, se produce la emergencia (salida) de los virus de la célula. Esta fase final exige la intervención de la actividad neuraminidasa de la proteína HN, rompiendo las uniones entre la progenie de virus y la célula infectada, liberando la progenie en el espacio intercelular.

Existen diferencias significativas entre los sitios de glicosilación de HN entre los diferentes tipos de VPIH y las diferentes cepas dentro de un mismo tipo. Ésta puede ser una de las estrategias que utilizan los VPIH para escapar de los mecanismos inmunes de los huéspedes (4).



**Figura 1.-** Estructura del virus parainfluenza [modificado de Schmidt et al. 2011 (7)].

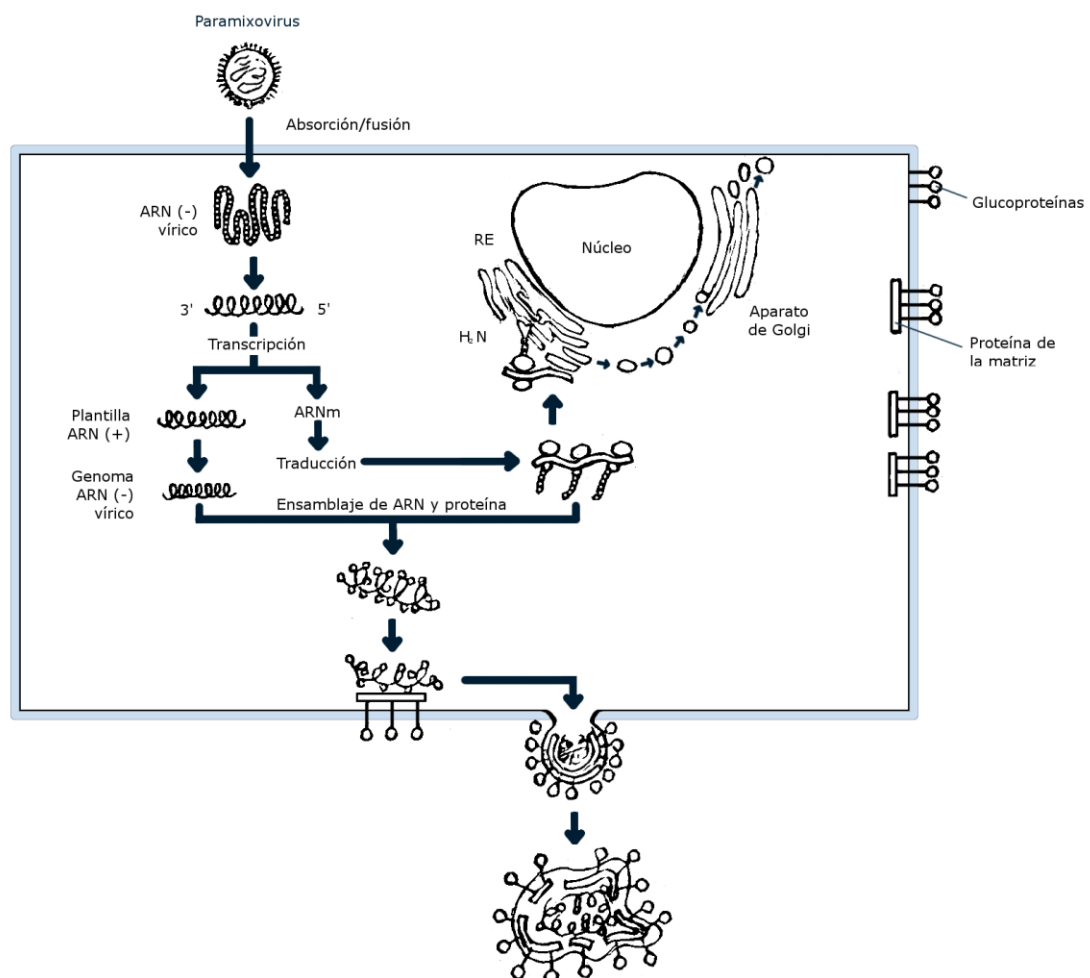
Aunque las en las últimas décadas se ha incrementado mucho el conocimiento sobre la estructura y funcionalidades (interacciones físicas entre proteínas de los VPIH, interacciones funcionales), el conocimiento es aún limitado y muchas áreas (tanto en relación a los VPIH



como a los *paramixovirus* en general siguen siendo objetos de estudios de investigación básica (4).

### 1.1.1. Replicación viral

La replicación de los virus parainfluenza es similar a la de otros virus ARN de cadena negativa. A continuación, de forma resumida se refieren ordenadamente los pasos que siguen los VPIH en su replicación viral.



**Figura 2.-** Replicación viral del virus parainfluenza [modificado de Murray et al. 2007 (22)]

El primer paso es la fusión del virus y la membrana lipídica de la célula del huésped. Para ello, la glicoproteína HN de la envoltura del virión se une al ácido siálico en los glicolípidos de la superficie celular junto con la proteína F, lo que favorece la fusión de la membrana viral con la membrana plasmática. Como otros *paramixovirus*, los VPIH son capaces también de inducir

fusión entre células para crear elementos gigantes multinucleados (sincitios) (22). Seguidamente tiene lugar la irrupción de las nucleocápsides virales en el citoplasma celular. Una vez allí, tiene lugar la transcripción del ARNv mediante la ARN polimerasa específica del virus (proteína L), lo que genera ARN mensajeros que son traducidos a las correspondientes proteínas virales en los ribosomas celulares. Simultáneamente, algunos ARNv son reproducidos a través de la síntesis de un ARN antígenómico, paso intermedio para la generación de nuevas hebras de ARNv. Las nuevas hebras individuales de ARN de sentido negativo son a continuación encapsuladas con las nuevas proteínas NP y L para formar nucleocápsides, que se unen con proteínas de la matriz que ya han alcanzado la cara interna de las membranas plasmáticas, a las que también se incorporan las glicoproteínas HN y F recién sintetizadas, de manera similar a como lo son las glicoproteínas celulares. Los viriones maduros atraviesan por gemación la membrana plasmática de la célula anfitriona y abandonan de la célula (22). Finalmente, el virus abandona la célula sin destruirla en muchos casos, lo que permite la liberación continuada de progenie viral a partir de las células infectadas.

### **1.1.2. Serotipos y variabilidad**

En los humanos se han referido cuatro serotipos predominantes de virus parainfluenza causantes de infecciones humanas (VPIH-1, VPIH-2, VPIH-3 y VPIH-4), basándose en los antígenos de superficie viral. Excepcionalmente se han referido infecciones humanas por virus parainfluenza tipo 5 (VPI-5), pero su papel como causa de enfermedad en humanos es todavía controvertido, relacionándose sobre todo con infecciones en animales (perro, gato, cerdos y ganado) (23)(24).

Los cuatro serotipos poseen antígenos comunes que durante la infección inducen la producción de anticuerpos heterotípicos, lo que imposibilita la determinación del serotipo mediante el estudio de la respuesta serológica dado lo frecuente de las reacciones cruzadas frente a antígenos similares de los diferentes serotipos.

Por el contrario, para la caracterización directa de cepas virales obtenidas en cultivos celulares, o de antígenos virales en tejidos, se desarrollaron sueros animales hiperinmunes específicos que permiten diferenciar entre estos virus a través de pruebas como la inhibición estándar de hemoaglutinación (HI), inhibición de la hemadsorción (HADl), fijación del complemento, neutralización o enzoinmunoanálisis (ELISA) (4). Dos subtipos de VPIH-4 (A y B) fueron descubiertos poco después de que este virus fuera identificado por primera vez poniendo de manifiesto una diversidad genética en este serotipo (25).

Durante los años siguientes, y también mediante el empleo de sueros animales hiperinmunes, se observó que diferentes cepas de VPIH-1 y VPIH-2 podían diferenciarse del virus prototipo del subtipo viral correspondiente mediante ELISA, inhibición estándar de hemoaglutinación y pruebas de neutralización (26)(27), mostrando también una cierta variación antigénica. Las pruebas serológicas que emplean antisueros policlonales pueden detectar la mayoría de las cepas de VPIH utilizando antígenos comunes, pero la identificación de los subgrupos de VPIH-1 y VPIH-3 es más difícil debido a los cambios antigénicos y genéticos progresivos que experimentan los VPIH (4).

Años después el análisis molecular de los cuatro tipos de VPIH demostró mayor heterogeneidad genética de la esperada. Los datos sugieren que los cuatro principales serogrupos de VPIH se pueden clasificar en subgrupos o poblaciones con características antigénicas y genéticas únicas. Incluso los subtipos A y B de VPIH-4 han demostrado esta variabilidad.

La variabilidad y los cambios que se observan en VPIH sugieren un patrón evolutivo parecido al del virus Influenza B, es decir, mediante la generación de múltiples linajes que pueden coexistir por periodos de tiempo considerables (28).

## 1.2. PATOGENIA

La infección por los VPIH se inicia habitualmente en el epitelio del tracto respiratorio superior, tras la exposición por contacto o inhalación. Inicialmente los VPIH infectan las células epiteliales de la nariz y la orofaringe, para extenderse después distalmente a las células ciliadas y alveolares del epitelio bronquial de las vías respiratorias grandes y pequeñas (29).

La infección con frecuencia se propaga a los senos paranasales, laringe y bronquios, y la obstrucción de la trompa de Eustaquio o de los senos paranasales puede conducir a una otitis media aguda (OMA) o sinusitis aguda (15).

La progresión de la enfermedad desde el tracto respiratorio superior al inferior estará influenciada por diferentes factores, como son la exposición previa al VPIH y al serotipo causante de la infección, el título (inóculo recibido) de virus en el tracto respiratorio superior, la respuesta inmune y la susceptibilidad individual (30).

A las 24 horas de la infección es posible detectar replicación viral en nariz y pulmones, con el pico máximo de replicación viral entre los dos y cinco días. La infección por VPIH, a diferencia del virus influenza, no muestra, *in vitro*, un efecto citopático extenso (29)(31). Esto sugiere que

la respuesta inmune del huésped puede contribuir significativamente a la patogénesis de la enfermedad. La infección por VPIH se limita generalmente al tracto respiratorio, sin afectación sistémica en sujetos inmunocompetentes. Por lo tanto la viremia es excepcional.

Cuando VPIH infecta una célula, se puede observar un aumento del tamaño del citoplasma y del núcleo, además de la disminución de su actividad mitótica en menos de 24 horas tras la inoculación. Otros cambios detectables son la formación de vacuolas citoplasmáticas simples o multiloculares, inclusiones basofílicas o eosinofílicas y la formación de células gigantes multinucleadas, observándose estas últimas en estadios más avanzados de la infección.

La destrucción tisular provocada por VPIH suele ser, focal, leve y además reparada con rapidez, pudiendo incluso no ser detectable. La infección en huéspedes inmunocomprometidos puede comportarse en cambio de manera más agresiva, dando lugar a una neumonía de células gigantes que puede conducir al paciente a la muerte.

La virulencia del VPIH está determinada por la capacidad de las células epiteliales del huésped de activar enzimáticamente la proteína F.

Como se ha señalado con anterioridad (apartado 1.1.1), se ha demostrado que las proteínas HN y F están implicadas en la fusión con la membrana celular, variando su papel con el subtipo del virus, habiendo algunos *paramixovirus* que sólo expresan la proteína F (32)(33). Esta fusión puede mostrar cinéticas diferentes dependiendo de si se produce de virus a célula o de célula a célula (33). Por otra parte, la actividad neuraminidasa de la proteína HN parece desempeñar un papel en la alteración de los receptores muscarínicos de acetil-colina, produciendo un broncoespasmo inducido por el nervio vago (34).

El citoesqueleto y la actina parecen desempeñar papeles importantes en la transcripción, maduración y expresión de las glucoproteínas virales a la superficie de las células infectadas. En las infecciones por VPIH-3 se forman microtúbulos celulares funcionales que promueven una liberación más eficiente (35). De forma similar, en las infecciones por VPIH-2 se forman estructuras filamentosas de 5-15  $\mu\text{m}$  de largo en células epiteliales polarizadas, y estas formaciones se basan esencialmente en la actina (36).

Los viriones maduros recién formados se liberan principalmente de la superficie apical de las células respiratorias ciliadas mediante gemación, en la luz de las vías respiratorias (29)(31). Se cree que esta gemación direccional o polarizada desempeña un papel importante en la limitación a la vía respiratoria del VPIH y otros virus como VRS. Además de la gemación

direccionales, otros factores, como el grado de inmunidad del huésped pueden ser necesarios para prevenir la diseminación sistémica (7).

La infección persistente con replicación viral activa ha sido demostrada tanto *in vitro* (cultivo tisular) como *in vivo* (infección humana) (37), esencialmente en el contexto de la inmunodepresión. La calidad de la respuesta inmunitaria o la ausencia de la misma, en un paciente infectado, afecta claramente a la eliminación de los VPIH y al desarrollo de infección persistente.

### 1.2.1. Tropismo de los tejidos y citopatología

Los VPIH se replican en las células epiteliales del tracto respiratorio, alcanzando título alto.

Los efectos en cultivos celulares varían en función de si se trata de células polarizadas (ej células de epitelio respiratorio) o no polarizadas. En modelos *in vitro* de células epiteliales del tracto respiratorio humano, VPIH-1, VPIH-2 y VPIH-3 infectan solo las células ciliadas superficiales de la parte apical y no se propagan a las células basales subyacentes (29). La liberación de la progenie de dichos serotipos ocurre igualmente sólo en la superficie apical. Por otra parte, en cultivos celulares VPIH-3 parece ser absorbido y liberado más ampliamente en los dominios apicales y solo posteriormente en los dominios basolaterales de las células A549. El antígeno viral ha sido localizado en la porción apical de células epiteliales en ratas algodóneras infectadas (38). Este tropismo selectivo se relaciona como se ha referido antes, con la ausencia de viremia en individuos sanos, pero también puede limitar la exposición del antígeno viral a las células presentadoras de antígeno, conduciendo a respuestas inmunes reducidas que pueden permitir reinfecciones. La baja infectividad de VPIH-3 para las células dendríticas humanas puede tener un efecto similar (39).

La infección por VPIH de cultivos de epitelio de las vías respiratorias causa destrucción celular mínima, sin evidencia de fusión célula a célula, a diferencia de la rápida destrucción de tejidos causada por el virus Influenza A (29)(40).

Por otro lado, la infección por VPIH de las líneas celulares no polarizadas se caracteriza por la formación de sincitios que causan destrucción celular. La falta de formación de sincitios en el modelo de vía respiratoria, puede estar relacionada con la localización de la proteína F del VPIH-3 únicamente en la superficie apical de los cultivos polarizados y, por tanto, sin contacto con células vecinas. En estudios *postmortem* de tejido pulmonar humano, se ha observado formación de sincitios en los pulmones de individuos infectados por VPIH con inmunosupresión o inmunodeficiencia severa, pero infrecuentemente en pacientes inmunocompetentes. Otro

efecto de las infecciones por VPIH es que suprimen la apoptosis celular, disminuyendo así la destrucción celular (15).

### **1.2.2. Factores que contribuyen a la patogénesis del VPI**

La edad temprana (primeros meses de vida) y la falta de exposición previa al serotipo de VPIH infectante han sido relacionados con ocurrencia de infección del tracto respiratorio inferior . El riesgo es mayor en los recién nacidos por la mayor susceptibilidad a la obstrucción que presentan en la vía respiratoria pequeña en esta etapa y por su inmadurez inmunológica (30). Factores genéticos del huésped, en particular los que afectan a la respuesta innata y las respuestas inflamatorias, probablemente desempeñen también un papel.

La patología respiratoria observada *in vivo* se puede atribuir a los altos niveles de replicación viral, produciendo efectos directos mediados por el virus y por la respuesta del huésped a la infección. Sin embargo, las contribuciones relativas de estos dos factores no están claras. Si bien la infección por VPIH no es rápidamente citopática en los cultivos de epitelio de las vías respiratorias humanas, puede tener consecuencias en el normal funcionamiento celular, y parece acelerar el mecanismo normal de excreción (ejemplo mucina) y de sustitución de las células epiteliales (29). El número de células que contienen mucina en los cultivos de epitelio de las vías respiratorias humanas aumenta durante la infección por VPIH, en consonancia con el aumento de la producción de moco observada en los individuos infectados. Además, la infección por VPIH inhibe la motilidad ciliar en cultivos de epitelio de las vías respiratorias humanas, un efecto que *in vivo* impediría la eliminación del moco y células exfoliadas de las vías respiratorias. De esta forma, la inflamación y la obstrucción de las vías respiratorias son factores importantes de la patogénesis de VPIH.

### **1.2.3. Contribución de las proteínas accesorias C y V del VPIH a la patogénesis**

Para los virus ARN citoplasmáticos, como lo son los VPIH, el estímulo más potente para la inmunidad innata es la síntesis del ARN viral, que puede activar receptores citoplasmáticos del huésped, como MDA5, RIG-I y PKR. Por consiguiente se activan varios efectos en cascada, entre los que se incluyen: la transducción de señales que activan la transcripción de los factores IRF3 y NF- $\kappa$ B e inducen IFN- $\beta$  y citoquinas proinflamatorias; la supresión de la traducción celular mediante PKR; y la señal inducida por IFN para inducir un estado antiviral (41)(42). Estas respuestas pueden restringir la replicación de los VPIH pero a su vez pueden ser inhibidas por las proteínas virales V y C (43).

La proteína C del VPIH-1 ha demostrado prevenir la inducción del IFN, la señalización del IFN y la apoptosis. Con la señalización de IFN, la proteína C del VPIH-1 se une a STAT1 (pero no a STAT2), secuestrando STAT1 en complejos que se acumulan en el citoplasma asociados a los endosomas, evitando así la translocación del STAT1 al núcleo (44). El mecanismo mediante el cual la proteína C del VPIH-1 inhibe la apoptosis no está claro; la infección de las células epiteliales respiratorias con un mutante de VPIH-1 modificado para no expresar las proteínas C produce cambios en la expresión de cientos de genes celulares controlados por el IRF3, NF- $\kappa$ B y otros factores, mostrando que la proteína C normal tiene un amplio impacto en la respuesta del huésped (21).

La proteína C del VPIH-3 es importante para una eficiente replicación en modelos animales experimentales. Esta proteína regula la síntesis del ARN viral pudiendo reducir la respuesta innata e inhibe la señalización del IFN uniéndose a STA1 e inhibiendo su fosforilación. Además mejora la activación de la vía MAPK/ERK, que promueve la respuesta celular a los factores de crecimiento que es necesario para una replicación viral eficiente (45).

La proteína V del VPIH-2 ha mostrado que inhibe la inducción del IFN, la señalización del IFN y la apoptosis. Además inhibe la señalización del IFN uniéndose al STAT2 y promoviendo su degradación (46).

Se conoce menos respecto a cómo interfiere el VPIH-4 con la inmunidad innata del huésped. Sorprendentemente, no parece interferir con la señalización del IFN (47), por lo que es posible que esto contribuya a su menor virulencia.

#### **1.2.4. Respuesta inflamatoria e inmune**

Los VPIH pueden inducir una potente respuesta humoral y celular en los huéspedes infectados, las infecciones por estos virus inducen una respuesta inmune innata, una respuesta local y sistémica de inmunoglobulinas G (IgG) e inmunoglobulinas A (IgA) y una respuesta CD8+ y CD4+ de las células T(7). Las respuestas inmunológicas en lactantes se reducen en magnitud, eficacia y duración, en comparación con niños mayores, debido a la inmadurez inmunológica y al efecto inmunosupresor de los anticuerpos (Ac) maternos (48). La inmunidad inducida por la infección de VPIH a menudo evita la reinfección sintomática durante unos meses, especialmente en lactantes. Sin embargo, la enfermedad producida por estas reinfecciones es generalmente más leve que la infección primaria, con replicación viral restringida y progresión a infección del tracto respiratorio inferior infrecuente (49).

Los mecanismos inmunitarios involucrados en la lesión de la célula y el daño tisular son en gran parte desconocidos. A pesar de que la respuesta celular es importante en la restricción de la replicación viral y la eliminación primaria de la infección por VPIH, los anticuerpos neutralizantes dirigidos a las glucoproteínas HN y F de VPIH juegan un papel importante en la protección a largo plazo de la infección por VPIH (15). La inmunidad mediada por células T contribuye a la eliminación del virus y confiere resistencia a la reinfección, pero este efecto disminuye en un periodo de semanas a meses (50).

**La respuesta innata** mediada por linfocitos T citotóxicos parece ser importante para la eliminación del virus de las vías respiratorias inferiores durante las infecciones por VPIH-3 (51). Las células T alfa-beta desempeñan un papel más importante en la eliminación viral que las células gamma-delta o *natural killer*, aunque todas pueden estar involucradas (52). Se ha mostrado que la respuesta citotóxica por parte de los linfocitos T está dirigida a determinantes antigénicos de las proteínas HN, P y NP del VPIH-1 y VPIH-3. El interferón puede inhibir la transcripción primaria del VPIH-3 (53) y este a su vez las vías mediadas por IFN en las células T, incluyendo la expresión del antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (54). Uno de los muchos mediadores inflamatorios producidos por la estimulación de las células T por VPIH-3 es la IL-10. Esta citoquina disminuye la respuesta proliferativa de las células T y ayuda a protegerlas de la apoptosis. Los niños con infecciones respiratorias de vía alta causadas por VPIH-3 producen IL-11, que se ha correlacionado con la producción de broncoespasmo (55). No hay una inmunidad duradera a la infección de vías respiratorias superiores por VPIH, y las infecciones continúan a lo largo de la vida.

La infección por VPIH del epitelio de las vías respiratorias provoca cambios extensos en la expresión génica celular y estimula el aumento de la producción de numerosas citoquinas y quimioquinas que tienen funciones antivirales o activan células que median una respuesta inmune. El análisis por *microarrays* de las células epiteliales infectadas por el VPIH-1 ha indicado que NF- $\kappa$ B, IRF3 e IFN I desempeñan un papel importante en la regulación celular antiviral y la respuesta inflamatoria a la infección por VPIH-1, y la proteína C del VPIH-1 normalmente suprime la activación de estas vías. En correlación con los datos de *microarrays*, en una serie de casos de niños con VPIH, se han descrito concentraciones elevadas en lavado nasal de citoquinas inflamatorias, incluyendo IL-8/ CXCL8, MIP1 $\alpha$ +1 $\beta$ /CCL3+4, RANTES/CCL5 y CXCL9 (56). Los ligandos CXCR3, tales como IP-10 e I-TAC, que atraen las células Th1 al epitelio infectado, son las quimiocinas dominantes y se producen durante la infección por VPIH, siendo segregadas por el epitelio de las vías respiratorias, así como por monocitos y neutrófilos.



Concentraciones elevadas de IL-8 e IP-10 se han correlacionado con enfermedad más grave (57). No está claro si la asociación entre la magnitud de la respuesta inflamatoria y la gravedad de la enfermedad refleja una característica patogénica específica de estos virus, o la magnitud de la replicación viral resulta en un aumento de la respuesta inmune o por ambos (15). Los antagonistas del IFN codificados por el virus permiten a VPIH replicarse eficientemente *in vivo*; sin embargo, la producción y actividad del IFN no suelen estar completamente bloqueadas y probablemente contribuyan a la defensa del huésped. Muchos pacientes con infecciones primarias por VPIH desarrollan una respuesta de IFN detectable durante la fase aguda de la enfermedad (7).

Se conoce menos sobre la respuesta del IFN tipo III durante la infección. Los IFNs tipo III se transmiten a través de un receptor heterodimérico único, IFN- $\lambda$ R1/interleuquina-10R2 (IL-10R2), expresado principalmente por células epiteliales. La infección por VPIH-3 está altamente restringida al epitelio de las vías respiratorias. En un estudio realizado en EEUU, se observó que los niveles de IL-29 se incrementaron significativamente durante la infección por VPIH-3. Se utilizó Western blot para examinar la fosforilación de STAT1 y STAT2 en células Vero y la línea celular del epitelio bronquial BEAS-2B. En las células Vero se observó una fosforilación reducida del sitio serina 727 (S727) en STAT1, mientras que en las células BEAS-2B la fosforilación STAT1 disminuyó en el sitio de la tirosina 701 (Y701) durante la infección por VPIH-3. Por lo tanto, VPIH-3 interfiere con la fosforilación de STAT1 del receptor del IFN tipo III.

Estos datos proporcionan nuevas luces sobre las estrategias empleadas por los virus parainfluenza para eludir eficazmente la inmunidad antiviral específica de las células epiteliales respiratorias. Los interferones son producidos por las células para interferir con la replicación viral. Se ha demostrado ampliamente que los *paramyxovirus* bloquean la producción y posterior señalización de los IFN tipo I. Por primera vez se muestra en un estudio (58) que VPIH-3 pueden inducir el efecto protector del IFN tipo III en las células epiteliales. Sin embargo, se encontró que VPIH-3 modula las vías de señalización del receptor del IFN tipo III bloqueando la producción de varias moléculas específicas que ayudan a una respuesta antiviral productiva; lo cual ayuda a entender como el VPIH-3 evita eficazmente la inmunidad innata del huésped.

Las infecciones por VPIH inducen una respuesta inmune innata (a través de CD8+ y CD4+, producción de interferón) y una respuesta local y sistémica de IgA e IgG, que contribuyen a eliminar el virus (7). VPIH no necesita Ac para activar directamente los componentes iniciales del complemento, el cual puede interferir directamente en la unión del virus con el receptor de la célula huésped, produciendo la neutralización viral directamente en la membrana del virus.

La defensa de la célula huésped contra VPIH es mediada en gran parte por **la inmunidad humoral** contra las dos glicoproteínas de superficie (HN y F), pero parece que los anti-HN

desempeñan un papel más importante (4). La mayoría de los niños nacen con anticuerpos neutralizantes maternos (IgG), se cree que pueden producir protección durante las primeras semanas o meses de vida, pero disminuyen rápidamente durante los primeros seis meses (11).

Las IgG séricas proporcionan la protección más duradera contra la reinfección, pero el transporte a la luz de la vía respiratoria es inespecífico y poco eficiente, y la protección depende de los títulos presentes. No obstante, hay estudios en adultos que han demostrado que los títulos de Ac neutralizantes (IgG) de la mucosa se correlacionan mejor con la protección que los títulos en suero (15). La respuesta a la infección es mediada principalmente por IgG1, aunque el 30% de los adultos tiene importantes incrementos además de IgG3, IgG4, IgA e IgM. Durante o poco después de una infección aguda por VPIH, la mayoría de los niños preescolares presentan producción de IgM. Como reflejo del orden habitual de adquisición de estas infecciones, la respuesta inmunitaria al VPIH-1 y VPIH-2 se desarrolla más tarde que la respuesta inmunitaria al VPIH-3, en general durante el segundo y tercer año de vida. Durante la edad escolar un porcentaje elevado de la población infantil desarrolla niveles de Ac contra VPIH-4 (4).

La inmunoglobulina E (IgE) específica del VPIH y la histamina pueden contribuir a la severidad de la enfermedad en niños (59), pudiendo producir una hiperrespuesta a nivel bronquial con broncoespasmo, inducido por la citoquina IL-11 (55).

La IgA secretora desempeña un papel importante, aunque no completamente definido, en la protección contra la infección por VPIH. La mayoría de los niños y adultos, después de una infección natural por VPIH desarrollan niveles elevados de este anticuerpo. Se ha observado que esta circunstancia está relacionada con la prevención y la curación en los adultos. Sin embargo, no se ha documentado en niños asociación entre los niveles de IgA y la capacidad de las secreciones nasales para neutralizar la infección o para mejorar la enfermedad (4). La IgA tiene la ventaja de ser transportada específicamente a través del epitelio a la luz de la vía aérea y puede neutralizar el virus dentro de las células epiteliales infectadas, aunque la protección puede ser relativamente corta en comparación con los Ac neutralizantes del suero (IgG). Es probable que se necesite más de una infección para mantener títulos protectores de IgA en las mucosas. La protección a largo plazo frente a las infecciones del tracto respiratorio superior es menos completa que frente a las del tracto respiratorio inferior, habiéndose constatado que la mayoría de las personas experimentan múltiples infecciones del tracto respiratorio superior por VPIH a lo largo de la vida (7).

La dificultad para mantener títulos protectores de IgA e IgG en el *lumen* respiratorio es un factor importante en la capacidad de los VPIH de volver a infectar a lo largo de la vida. A pesar de

ello, la inmunidad derivada de exposiciones previas normalmente limita las reinfecciones a enfermedad leve (15).

En resumen, la magnitud de la replicación del VPIH está estrechamente relacionada con la gravedad de la enfermedad. Las proteínas virales C y V son esenciales para permitir una replicación viral eficaz debido a que suprimen la respuesta inmune innata. A su vez la producción de citoquinas inflamatorias y la infiltración celular que se genera durante la infección, parecen contribuir en la patogénesis del VPIH (15).

Por otra parte el desarrollo de una adecuada respuesta inmune humoral y celular en las células huésped es decisiva para su protección contra la infección en curso y las posibles reinfecciones.

### **1.3. EPIDEMIOLOGÍA**

Los VPIH son virus de distribución mundial, relativamente ubicuos (11). El comportamiento de las infecciones por VPIH en adultos es menos conocido. Aunque mayoritariamente producen infecciones del tracto respiratorio superior con sintomatología leve, en la tercera edad o en pacientes inmunodeprimidos pueden generarse infecciones graves (60)(61).

#### **1.3.1. Transmisión**

En general, el virus se transmite por contacto directo de persona a persona a través de la exposición a secreciones nasofaríngeas contaminadas mediante gotas respiratorias o indirectamente mediante contacto con fómites y superficies contaminadas (19)(22). Se considera que estos virus no persisten largo tiempo viables en el medio ambiente.

Pocos estudios han investigado la transmisión de VPIH pero sugieren que todos los VPIH se transmiten de manera similar. Una publicación señala que VPIH-1 se aisló a una distancia de 60 cm en solo dos de 40 niños infectados por dicho virus. Por tanto, la transmisión de los VPIH persona a persona se considera improbable mediante dispersión de pequeñas partículas (mecanismo usado por los virus influenza), aceptándose que para la transmisión se necesita un contacto estrecho y grandes gotas (mecanismo más parecido a virus respiratorio sincitial).

VPIH-1, VPIH-2 y VPIH-3 sobreviven hasta 10 horas en superficies no porosas y hasta cuatro horas en superficies porosas. Por otra parte, se ha comunicado que VPIH-3, colocado de manera experimental en falanges, pierde el 90% de infectividad en los primeros 10 minutos y

podría no ser transferible a otras falanges. El contagio persona a persona por contacto directo con la mano parece ser un medio de transmisión poco eficaz (4).

A través de superficies contaminadas con gotas, se puede transmitir directamente la infección, mediante contacto de la superficie contaminadas con la mano después se lleva a ojos o nariz. Sin embargo, como se puede deducir de la resistencia mostrada por este virus a los agentes externos dada su condición de virus envuelto (como se ha mostrado en el apartado 1.3.4), VPIH puede ser eliminado fácilmente de las superficies con la mayoría de los detergentes comunes, desinfectantes y agentes antisépticos (4) siendo sensibles a las condiciones ambientales externas como el calor o sequedad.

### **1.3.2. Periodo de incubación, periodo de contagio y excreción**

El periodo de incubación habitual en niños no ha sido claramente definido. Sin embargo, estudios antiguos efectuados en el contexto de brotes institucionales ya sugirieron periodos de tiempo de dos a cuatro días (62). En estudios experimentales efectuados en adultos, el periodo de incubación parece ser algo más prolongado, de entre tres y seis días y la dosis infecciosa necesaria para causar una infección, pequeña (12).

El periodo de contagio no es bien conocido. La excreción viral en el paciente comienza un poco antes de que aparezcan los síntomas y podría presentar diferencias entre serotipos. En el caso del VPIH-3 la excreción se prolonga una media de 3-10 días durante la infección inicial, siendo este periodo más corto y excretando menor carga viral durante las reinfecciones, durante las que los pacientes también son infecciosos. En el caso de este virus (VPIH-3), la excreción puede ser más prolongada en lactantes y niños pequeños, hasta 3-4 semanas (19), habiéndose observado también excreción prolongada en el caso de pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades subyacentes del tracto respiratorio (12).

### **1.3.3. Factores de riesgo**

Los VPIH son patógenos respiratorios frecuentes adquiridos en la comunidad, sin que existan diferencias para la adquisición de la infección en función de la etnia, sexo, edad, geografía o diferencias socioeconómicas. Algunos factores se han relacionado con la predisposición para este tipo de infecciones y/o su evolución, y son comunes a otras infecciones virales respiratorias: malnutrición, superpoblación, lactancia artificial, déficit de vitamina A, humo ambiental y toxinas, entre otros (63).

La propagación en guarderías, familias e instituciones es fácil y a menudo extensa (64), produciendo en ocasiones brotes y epidemias. El VPIH-3 puede infectar a la mayor parte de los niños de una guardería en periodos de tiempo cortos, mientras que en el caso de los VPIH-1 y VPIH-2 la transmisibilidad es más limitada (12). Así mismo se han comunicado transmisiones de VPIH en el entorno hospitalario (infecciones nosocomiales) (4)(65). La vacunación frente a neumococo se ha asociado a la disminución de la incidencia de neumonía en niños con VPIH y otros virus respiratorios (66).

Una vez adquirida la infección por VPIH, diferentes factores como la etnia o el sexo tienen influencia en su gravedad. La bronquiolitis por VPIH parece ser una forma de expresión clínica más frecuente en los niños de etnia no caucásica. Se ha referido que los niños alimentados con lactancia materna tienen menor riesgo de desarrollar bronquiolitis y que una vez padecido bronquiolitis por VPIH, la exposición a humo de tabaco y lactancia artificial están asociados con un aumento de frecuencia de episodios de sibilancias recurrentes (59). La lactancia materna durante al menos cuatro meses se ha descrito como factor protector de infecciones respiratorias y hospitalización (67).

#### **1.3.4. Resistencia a condiciones ambientales**

Las condiciones ambientales tales como la humedad, temperatura o el pH, afectan a todos los microorganismos, y también a los VPIH. En relación a la temperatura, la supervivencia de los VPIH disminuye a partir de los 37°C, siendo todos los virus inactivados a 50°C en 15 minutos. La supervivencia a temperatura ambiente (10-25°C) es variable, normalmente en el rango de horas (menor de un día). Los VPIH presentan máxima estabilidad a 4°C o congelados, condiciones en las que deben ser mantenidas las muestras en los laboratorios si no van a ser procesadas inmediatamente. Es sabido que la congelación, idealmente a -70°C o temperaturas inferiores causa siempre una pérdida de virus viable, pero normalmente queda una parte suficiente para la recuperación del virus en cultivos. La adición al medio de transporte y almacenamiento de diferentes reactivos (albúmina bovina 0,5%, dimetilsulfóxido 5%, suero de pollo 2%, entre otros) previamente a la congelación facilita la supervivencia.

La estabilidad óptima de los VPIH ocurre con pH fisiológico (7,4 a 8,0), mientras que la capacidad de infectar se pierde con pH entre 3 y 3,4, tanto la humedad baja como la desecación del virus lo inactivan, igual que la irradiación ultravioleta, éter, formalina y solventes orgánicos (4) (14).

### **1.3.5. Estacionalidad**

Las infecciones por VPIH ocurren a lo largo de todo el año, predominando ciertos serotipos durante el otoño y primavera. Hay pocos estudios que hayan analizado por períodos de tiempo prolongados (ejemplo mayores de cinco años) la estacionalidad de estos virus.

Algunos estudios, especialmente en EEUU, han observado que en las regiones de clima templado, VPIH-1 provoca brotes bieniales durante el otoño de los años impares. Por el contrario, VPIH-3 y VPIH-2 son responsables de epidemias anuales en primavera y otoño, respectivamente (5)(68)(69). El mayor pico de frecuencia de VPIH-2 ocurre al inicio del invierno. Los años en los que VPIH-1 no circula, parece ocurrir un incremento de la actividad de VPIH-3, manifestada, ya sea como una temporada de primavera de VPIH-3 más larga o como un segundo pico más pequeño en otoño. A pesar de que el patrón estacional de VPIH-4 no está bien establecido se ha comunicado su detección más frecuentemente entre octubre y enero (70). En un estudio retrospectivo publicado recientemente, VPIH-4 estuvo presente durante todo el año, con características clínicas similares a las de VPIH-3 (71)(72).

En los países tropicales, en cambio, VPIH no presenta variación estacional (73). Se han encontrado niveles bajos de VPIH-1 y VPIH-3 durante todo el año (circulación endémica), al igual que ocurre con el VRS e influenza (4).

### **1.3.6. Codetecciones virales**

Las codetecciones con otros virus respiratorios son comunes, habiéndose comunicado porcentajes mayores del 40%. Actualmente existe gran controversia sobre las detecciones virales múltiples y la severidad de la clínica y el pronóstico de la enfermedad inducida.

### **1.3.7. Huéspedes**

VPIH tiene capacidad de infectar a diferentes animales tanto de manera natural como bajo condiciones experimentales. VPIH puede además infectar otras especies animales que no sean mamíferos. Puede inducirse una infección asintomática por los cuatro tipos de VPIH en hámsteres, cobayas y hurones adultos. Sin embargo, VPIH-1, VPIH-2 y VPIH-3 causan infecciones fatales en hurones recién nacidos. Curiosamente, VPIH-3 produce infección asintomática en hámsteres y ratas algodóneras, pero las necropsias objetivan patología pulmonar y replicación viral. VPIH-3 induce hiperreactividad traqueal en cobayas e hidrocefalia neonatal en hámsteres con inoculado durante la gestación.

Los primates se infectan muy fácilmente por VPIH, siendo la mayoría de las infecciones asintomáticas. Se ha objetivado que los chimpancés, macacos, ardillas, búhos y el macaco Rhesus se pueden infectar por VPIH-3 y VPIH-4, sin presentar sintomatología. Sólo los titíes desarrollan infección respiratoria de vías altas con VPIH-3. La ausencia de enfermedad significativa en la mayor parte de los animales de experimentación se ha asociado a replicación viral limitada (12).

Los VPIH tienen otros virus relacionados, próximos genéticamente, que afectan de modo natural a los animales. De hecho, según el *International Committee of Taxonomy of Viruses* (consulta efectuada el 09-09-2017), el género *Respirovirus* incluye tres virus animales (el virus parainfluenza 3 bovino, el virus Sendai murino y el virus parainfluenza 1 porcino) y el género *Rubulavirus* catorce (incluyendo el virus parainfluenza 5 y rubulavirus simio, porcino y de murciélago) algunos muy próximos a los correspondientes virus humanos. VPIH-1 tiene antígenos, genética y fisiopatología similar al virus Sendai (SeV) que infecta ratones, hámsteres y cerdos. El virus VPI- 5 y 41 simio están relacionados con VPIH-2.

Otro virus muy relacionado con los dos anteriores, es el denominado virus parainfluenza canino, causa laringitis e infección respiratoria inferior en perros. A su vez, se ha relacionado VPI-3 bovino con la denominada “fiebre de embarque” en el ganado, y se ha demostrado una relación antigénica con el VPIH-3. Este virus o similares pueden también infectar caballos, ovejas, cabras, búfalos, ciervos, perros, gatos, monos, cobayas, ratas y cerdos.

Excepcionalmente se han descrito infecciones en humanos relacionados con algún tipo de VPI no humano, como el VPI-5, aunque existe controversia a este respecto (4)(12). La mayoría de las pruebas que apoyan esta hipótesis son serológicas, y debido a la relación antigénica de los géneros *Respirovirus* y *Rubulavirus* son difíciles de corroborar.

Existen algunos casos en los que los VPI han causado infecciones fuera de sus huéspedes habituales como la infección en humanos por VPIH-3 bovino, infección en ratones por VPIH-1 e infección en monos verdes africanos por VPI-1 de ratones (SeV). Estas infecciones suelen ser asintomáticas.

El virus de la enfermedad de Newcastle es también un *paramixovirus*, que infecta pingüinos, aves de corral y muchos tipos de pájaros causando conjuntivitis en manipuladores de aves y trabajadores de laboratorio.

Algunas cepas de VPIH-1, VPIH-2 y VPIH-3 se replican en huevos de pollo embrionados, pero este comportamiento es irregular. Para el aislamiento de virus de pacientes, los huevos son menos válidos y sensibles que las células primarias de riñón de mono.

### **1.3.8. Otros datos epidemiológicos**

La infección primaria suele ocurrir habitualmente en lactantes y la práctica totalidad de los niños han sido infectados para cuando alcanzan los cinco años de edad. Las reinfecciones se producen a lo largo de la vida, lo que sugiere escasa duración de la inmunidad, y a menudo su sintomatología es leve o incluso ausente (22).

Algunas encuestas serológicas han mostrado que la mayor parte de los niños de 6-10 años tienen evidencia de infección pasada, sin haber padecido enfermedad respiratoria aguda grave, lo que sugiere que la infección primaria fue leve o asintomática (4).

Las encuestas serológicas indican también que VPIH-3 es el serotipo más prevalente. El 50% de los niños han sido infectados por VPIH-3 durante el primer año de la vida y el 90-100% tienen anticuerpos para la edad de cinco años (74). Los lactantes menores de seis meses son especialmente vulnerables a las infecciones por VPIH-3, siendo la neumonía y la bronquiolitis expresiones clínicas frecuentes. Por el contrario las infecciones por VPIH-1 y VPIH-2 son menos comunes y afectan con más frecuencia a niños preescolares, de 3-5 años de edad. El 50-74% presenta seropositividad a los cinco años de edad (4).

VPIH-4 causa diversas infecciones respiratorias pero, al ser un virus difícilmente cultivable, ha sido poco estudiado y su perfil clínico no es tan conocido. El 50% de niños a los seis años de edad y el 70-90% de los adultos jóvenes presentan anticuerpos para VPIH-4, a pesar de que la infección ha sido detectada con poca frecuencia (75). Se han constatado niveles significativos de anticuerpos para VPIH-4 tras el nacimiento (60-84% de los recién nacidos), posiblemente por paso transplacentario. Estos niveles disminuyen al 7-9% entre los siete y los doce meses, permaneciendo bajos durante meses, hasta que se elevan hasta alrededor del 50% entre los tres y los cinco años de vida. Los niveles de anticuerpos para VPIH-4 siguen aumentando durante la infancia hasta la edad adulta, donde alcanzan el 95% contra VPIH-4A y el 75% frente a VPIH-4B. Llama la atención que la mayoría de las infecciones por VPIH-4 con expresión clínica son del serotipo B (4).

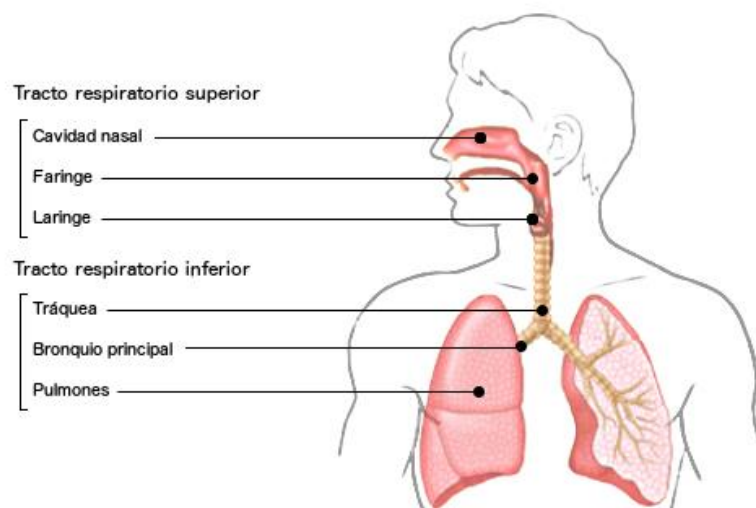
## **1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

Los VPIH pueden producir cualquier tipo de infección respiratoria de tracto superior o inferior, especialmente en niños, desde síndromes leves hasta neumonías graves. Muchas de las características clínicas de las infecciones por VPIH parecen ser comunes a las observadas por



otros virus, como los de la gripe (19). En los niños, las infecciones por VPIH implican más frecuentemente que en los adultos, las vías del tracto respiratorio inferior. El tropismo viral por esta región anatómica es consecuencia del gran número de células epiteliales ciliadas presente en la mucosa respiratoria de este área.

Se ha referido que, en población pediátrica, más del 50% de las infecciones por VPIH se circunscriben al tracto respiratorio superior (manifestándose con frecuencia con fiebre, tos, obstrucción nasal, estornudos, odinofagia) y que hasta el 30-50% se complican con otitis media aguda (OMA) (76). Aproximadamente el 15% de las infecciones por VPIH afectan el tracto respiratorio inferior. Como se ha referido antes, los pacientes inmunodeprimidos, especialmente pacientes que hayan recibido trasplante pulmonar o de médula ósea, pueden experimentar infecciones del tracto respiratorio inferior por VPIH de evolución grave, incluso mortal (77). Esta evolución también se ha observado en pacientes con patología crónica, especialmente del tracto respiratorio (19).



**Figura 3.-** Esquema ilustrativo de las vías respiratorias.

Aunque poco estudiado, en ocasiones, algunos sujetos con resultado positivo para VPIH no presentan signos de infección de las vías respiratorias (infecciones asintomáticas, normalmente observadas en grupos de control) (65). Sin embargo, esta situación es rara, en un estudio con 116 niños sanos sólo un niño fue VPIH positivo (78).

Las infecciones del tracto respiratorio producidas por los subtipos de VPIH pueden tener diferentes presentaciones clínicas que incluso pueden ocurrir de manera simultánea o sucesiva en un mismo paciente (4).

VPIH-1 y VPIH-2, clásicamente relacionados con la laringitis, tienen tendencia a infectar la laringe y parte alta de la tráquea, mientras que VPIH-3, asociado más frecuentemente bronquiolitis, sibilancias y neumonía, infecta más fácilmente la vía aérea distal o pequeña vía aérea (79). VPIH-4, aunque es detectado menos frecuentemente, se asocia también con infecciones del tracto respiratorio inferior en niños (80).

En resumen, los estudios existentes indican lo siguiente:

- VPIH-1 es el responsable principal de la laringotraqueobronquitis en población pediátrica. Inicialmente presenta fiebre, rinorrea y faringitis que va progresando a tos, muy frecuentemente “perruna”, con estridor y disnea y retracciones de la pared torácica. Los pacientes pueden necesitar ser hospitalizados por insuficiencia respiratoria aguda y, excepcionalmente, puede objetivarse hipoxemia con neumonía intersticial asociada.
- VPIH-2 también se asocia a laringitis, aunque la infección suele ser más leve que con el anterior serotipo.
- VPIH-3 es responsable principal de las infecciones del tracto respiratorio inferior, como bronquiolitis y neumonía, que ocurren principalmente en los meses de primavera y especialmente en lactantes menores de seis meses de edad.
- El VPIH-4 típicamente causa síntomas leves de infección del tracto respiratorio superior (72). Sin embargo, se ha sugerido que este virus no produzca síntomas tan leves como se pensaba; siendo detectado en casos de bronquiolitis, neumonía, laringitis y/o apnea (11)(70)(81).

**Tabla 3.-** Características de las infecciones por VPIH.

	VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3
<b>Estacionalidad</b>	Otoño	Sigue patrones del VPIH-1	Endémico. Picos a finales de primavera
<b>Síndrome predominante</b>	Laringitis, IVRS*	Laringitis, IVRS*	IVRS, infección de vía respiratoria inferior
<b>Edad de primoinfección</b>	2-5 años	2-5 años	6 meses-2 años
<b>Síntomas clínicos (%)</b>			
-IVRS*, OM**	46	40	64
-Laringitis	16-31	6-45	5-9
-Bronquiolitis, neumonía	5	2	9
-Fiebre	18	13	18

\*IVRS: infección de vía respiratoria superior. \*\*OM: otitis media. [Modificado de Weinberg et al, 2006 (68)].

### 1.4.1. Laringitis

La laringitis es una causa frecuente de obstrucción aguda de las vías aéreas superiores en la infancia, representando el 15-20% de las enfermedades respiratorias. Es un síndrome caracterizado por la presencia de un grado variable de tos “perruna” o “metálica”, afonía, estridor y dificultad respiratoria (82). Los pacientes pueden presentar fiebre y disnea.

El mayor número de casos tiene lugar entre el primer y segundo año de edad, con mayor frecuencia en varones (4). Los síntomas suelen prolongarse entre 3-5 días. En algunos niños pequeños, se puede observar sialorrea, disfagia y anorexia. Es necesario recordar que el babeo excesivo, el distrés respiratorio y la posición “de trípode”, son altamente sugestivos de epiglotitis, infección generalmente asociada a *Haemophilus influenzae tipo b*, que a día de hoy es muy infrecuente gracias a la vacunación universal en nuestro medio (19).

Los glucocorticoides son eficaces para mejorar los síntomas de la laringitis en las primeras seis horas del tratamiento. En un metaanálisis publicado en el año 2001 se objetivó que la ventaja de la dexametasona parenteral respecto a la budesonida nebulizada era muy pequeña. El uso de glucocorticoides disminuye la necesidad de otro tipo de tratamientos, como adrenalina, la necesidad de hospitalización y la estancia hospitalaria si la hospitalización llega a ser necesaria (83).

Aproximadamente el 10-25% de los casos de infección del tracto respiratorio superior en niños menores de cinco años se presentan como laringitis. El subtipo más frecuentemente asociado es el VPIH-1 (75%), habiéndose referido que causa epidemias en el otoño de los años impares en EEUU y Europa (19)(82)(84). En años en los que no hay epidemia de VPIH-1, VPIH-2 puede ser el causante de los brotes (65). Raramente el VPIH-3 se ha relacionado con casos de laringitis grave en adultos (4).

Los virus VRS, influenza A y B, adenovirus y rinovirus, así como *Mycoplasma pneumoniae* también se han relacionado con las laringitis (82). Un estudio retrospectivo publicado en 2002 observó que las laringitis causadas por virus influenza son más graves presentando más fiebre, requiriendo una estancia hospitalaria más prolongada y más oxigenoterapia que las producidas por los propios VPIH (85), puesto que las producidas por virus influenza tienden a ser febriles, con secreciones más espesas y una mayor obstrucción laríngea (19).

### 1.4.2. Bronquiolitis

Esta entidad clínica está muy ligada a la neumología pediátrica y mayoritariamente asociada a lactantes pequeños (menores de seis meses de edad), debido al menor calibre del bronquiolo

terminal y a la mayor distensibilidad que presentan haciéndolas más sensibles al colapso. Los síntomas predominantes son taquipnea, retracciones, atrapamiento aéreo, estertores crepitantes y sibilancias espiratorias, junto con febrícula y rechazo del alimento. La bronquiolitis se caracteriza por la obstrucción de las pequeñas vías de conducción aérea por restos de células inflamatorias y edema, así como por compresión externa de los bronquiolos por los folículos linfoides hiperplásicos (15).

El mayor número de infecciones (pico de incidencia) ocurre en el primer semestre de vida, y posteriormente la incidencia va disminuyendo hasta que prácticamente desaparece a los dos años de edad. En aproximadamente el 25-30% de los casos de infección del tracto respiratorio inferior ocurridos en niños de estas edades se diagnostica bronquiolitis (4).

Todos los subtipos de VPIH, pero especialmente VPIH-1 y VPIH-3 pueden provocar bronquiolitis, que clínicamente es indistinguible de la enfermedad causada por VRS o adenovirus, metapneumovirus u otros. Algunos investigadores encuentran que, de los casos diagnosticados de bronquiolitis el 5-15% se relacionan con VPIH. Los lactantes pequeños, especialmente los nacidos prematuramente pueden presentar episodios de apnea, por bloqueo de los receptores nicotínicos del centro respiratorio troncoencefálico.

En algunos estudios se ha observado que en los pacientes con bronquiolitis no hospitalizados se aísla con frecuencia similar VPIH-1 y VPIH-3. Sin embargo, entre los hospitalizados es más frecuente VPIH-3, siendo el segundo agente detrás de VRS (4), lo que sugiere mayor gravedad de las bronquiolitis asociadas a VPIH-3 respecto al resto de serotipos.

### **1.4.3. Neumonía**

La neumonía es una infección aguda del parénquima pulmonar que se caracteriza por fiebre y/o síntomas respiratorios con la presencia de infiltrados alveolares en la radiografía de tórax y/o dolor costal asociado (86). Se diagnostica neumonía, de cualquier etiología, en el 29-38% de los niños hospitalizados con infección del tracto respiratorio inferior y en el 23% de los tratados ambulatoriamente. El pico de incidencia máximo tiene lugar entre los 2-3 años de edad. Se ha referido que el 90% de los casos de infección del tracto respiratorio inferior están causados por virus, sobre todo en el primer año de vida. Este porcentaje disminuye al 50% en la edad escolar.

Los pacientes inmunocomprometidos, como son los que tienen deficiencias de células T o que han sido sometidos a trasplante de células hematopoyéticas, son susceptibles de

enfermedades graves como la neumonía. La neumonía en esta población puede representar una amenaza para la vida, con una tasa de mortalidad próxima al 30% (19)(87).

Las neumonías por VPIH están causadas principalmente por VPIH-1 y VPIH-3, aunque al igual que ocurre con la bronquiolitis, VPIH-3 se encuentra con mayor frecuencia entre los niños hospitalizados por neumonía (4).

#### **1.4.4. Traqueobronquitis**

La traqueobronquitis se caracteriza por tos crupal y espiración forzada, y los pacientes pueden además presentar fiebre, dificultad respiratoria y sibilancias. Aproximadamente un 20-30% de los pacientes con infección del tracto respiratorio inferior reciben este diagnóstico. Los virus constituyen la mayor parte de las etiologías en niños. La incidencia es baja en menores de cinco años, siendo sobre todo un diagnóstico que se realiza en la adolescencia y la edad escolar.

Más del 25% de las traqueobronquitis son producidas por el VPIH, siendo VPIH-3 el subtipo más frecuentemente relacionado. Por otra parte, varios estudios han registrado la traqueobronquitis como el diagnóstico más común en pacientes con infecciones por VPIH-4 (4).

#### **1.4.5. Episodios de apnea**

La apnea se define en adultos como la ausencia de respiración durante igual o superior a 20 segundos, con o sin disminución de la frecuencia cardiaca. En Pediatría, igual o superior a dos ciclos respiratorios según al frecuencia respiratoria por edad, se ha sugerido que las infecciones virales puedan tener un papel patogénico muy destacado dentro de los episodios de apnea. Las apneas centrales se han asociado a infección por VPIH, preferentemente en los dos primeros meses de vida (15), tanto en recién nacidos a término como en pretérminos, por bloqueo de los receptores nicotínicos del centro respiratorio troncoencefálico.

#### **1.4.6. Faringitis**

Se caracteriza por odinofagia asociada a disfagia. Es un proceso agudo con inflamación de las mucosas de la faringe, pudiendo presentar eritema, edema, exudado, úlceras o vesículas (88) causada por la inflamación de la mucosa que reviste la faringe. Pueden además presentar fiebre, cefalea, adenopatías laterocervicales y rechazo del alimento.

Los pacientes con infección por VPIH pueden presentar esta sintomatología, como se muestra en el estudio de Frost et al. (71).

### **1.4.7. Conjuntivitis**

Enfermedad que se caracteriza por hiperemia conjuntival, lagrimeo y secreción conjuntival blanca amarillenta o verdosa. La presencia del dolor es poco frecuente. Los niños mayores a veces refieren quemazón y prurito o sensación de cuerpo extraño. La visión no se altera, aunque la mucosidad puede originar visión borrosa. La duración de la enfermedad es variable, en general pocos días. Se observa conjuntivitis en más del 35% de los niños infectados por VPIH (19).

### **1.4.8. Otitis media aguda**

Diversos autores han demostrado que la OMA está asociada a infecciones respiratorias víricas en el 30-60% de los casos y que en ocasiones está precedida por infecciones causadas por VPIH (19)(89). El serotipo VPIH-3 es el que se asocia a esta entidad con más frecuencia (4). Se ha encontrado VPIH en el 1% de las supuraciones de oído medio y en el 2% de las secreciones nasofaríngeas de niños con OMA (90). En un estudio publicado en 2002 (85) el 17% de los niños con laringitis y detección de VPIH también presentó OMA.

### **1.4.9. Rinitis**

La mucosa nasal es una localización afectada frecuentemente en el contexto de infecciones por VPIH. La rinitis se caracteriza por una inflamación de la mucosa que recubre la nariz. Suele producir taponamiento nasal con sensación de obstrucción y dificultad de la entrada de aire al respirar, rinorrea, estornudos y prurito nasal.

### **1.4.10. Afectación neurológica**

Durante décadas, la infección por VPIH se ha asociado esporádicamente con enfermedad neurológica aguda y crónica.

VPIH-3 se ha aislado en LCR de un caso de síndrome de Guillain-Barré (91) y ocasionalmente en adultos con enfermedades desmielinizantes. A pesar de aislarse cepas del VPIH-1 en dos

pacientes con esclerosis múltiple, los estudios serológicos efectuados en suero o en LCR de pacientes con esta enfermedad no han podido establecer claramente una relación de VPIH con dicha patología (92).

Ocasionalmente, algunos autores han asociado la infección por VPIH a meningitis en población pediátrica (93)(94). A su vez, VPIH-1, VPIH-2 y VPIH-3 han sido aislados en secreciones respiratorias de niños con encefalitis aguda (95), si bien podrían tratarse de infecciones concomitantes. VPIH-3 fue detectado en la muestra nasofaríngea de un paciente con encefalitis aguda diseminada (96) y se han descrito aumentos de títulos de Ac contra VPIH-3 en madres gestantes de fetos con hidrocefalia (97).

Todos estos datos sugieren que algunas cepas de VPIH pueden tener neurotropismo en ciertos huéspedes. Hasta que se realicen más estudios para aclarar el papel que desempeña el VPIH en la enfermedad neurológica humana, su participación se debe considerar excepcional.

Por último, merece la pena comentar que en el contexto de las infecciones infantiles por VPIH ocasionalmente suceden convulsiones febriles. Las convulsiones febriles no son consecuencia de afectación neurológica viral, y se han relacionado con infección por diferentes serotipos VPIH (98).

#### **1.4.11. Inmunodepresión**

A pesar de que la mayor parte de las infecciones por VPIH son leves, en ocasiones pueden cursar de una manera más grave, particularmente en pacientes inmunocomprometidos. En niños y adultos inmunocomprometidos, incluyendo los afectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), una infección del tracto respiratorio superior leve puede progresar a neumonía grave con excreción viral prolongada y diseminación (99)(100). En este contexto las reinfecciones son también comunes y tienden a ser más graves que en el huésped inmunocompetente (19).

VPIH-2 y VPIH-3 se han asociado a neumonía de células gigantes en pacientes con inmunodeficiencia severa combinada (101), y VPIH-3 también en pacientes con inmunodeficiencia severa combinada, leucemia mieloide aguda (102) y tras un trasplante de médula ósea (103). Es común que en la autopsia de estos pacientes se encuentre más de un patógeno, pero hasta en un tercio de los casos se ha encontrado VPIH como patógeno único. Por otra parte, se ha descrito excreción prolongada e infección respiratoria persistente por VPIH-1, VPIH-2 y VPIH-3 en pacientes con inmunodeficiencia primaria e inmunodeficiencia combinada severa. Se ha observado a su vez infección persistente por VPIH-3 en un niño con

síndrome de Di George tras trasplante de timo y en un niño infectado por VIH (4). Se ha descrito que en niños infectados por VIH la infección severa no se presenta hasta que los linfocitos T descienden de manera muy significativa (104).

Tras trasplante de órgano sólido o médula ósea las infecciones por VPIH progresan más frecuentemente del tracto respiratorio superior al inferior, causando neumonía intersticial y alveolar (105)(106). VPIH-3 es el serotipo más frecuentemente aislado en niños inmunodeprimidos con infección del tracto respiratorio inferior, siendo una causa común de fiebre y neutropenia en niños oncológicos (107)(108)(109).

En pacientes receptores de trasplante de pulmón se ha comunicado que VPIH causa infecciones del tracto respiratorio inferior graves e incluso éxitus (8%) incluso a los cinco años del trasplante (110).

Se ha observado asimismo que VPIH-3 se asocia a parotiditis en pacientes con inmunodeficiencia combinada severa y con hipogammaglobulinemia común variable. Los pacientes inmunocomprometidos pueden tener afectación por VPIH en otros órganos y sistemas, como LCR, líquido pericárdico e hígado, como se ha podido objetivar en cultivos de necropsia de miocardio e hígado (4).

En un estudio retrospectivo se refirió que el 40% de los pacientes pediátricos con trasplante de médula ósea que sufren una infección por VPIH desarrollan neumonía y el 6% fallece (107). Los pacientes sometidos a trasplante de células hematopoyéticas tienen la mayor mortalidad, especialmente en los primeros 100 días del trasplante, cuando la linfopenia es más común. En un estudio publicado en 2011 se describió que el recibir un trasplante de donante no emparentado era un factor de riesgo para la infección por VPIH-3 (111).

Por tanto, en pacientes inmunodeprimidos, especialmente en pacientes con trasplante de células hematopoyéticas o con trasplante pulmonar, los VPIH pueden causar morbilidad grave y mortalidad (112)(113). En pacientes con trasplante de células hematopoyéticas, VPIH fue la causa principal de neumonía viral junto con VRS y en el líquido de lavado broncoalveolar se encontró frecuentemente carga viral elevada (114).

### **1.4.12. Otros síndromes o entidades**

Se ha asociado el síndrome de distrés respiratorio agudo con la infección por VPIH-1 (115), así como la infección por VPIH-3 se ha relacionado con la bronquiolitis obliterante y supraglotitis (116).



Se han descrito casos de parotiditis en niños sanos con infecciones por VPIH-1 y VPIH-3, además de en pacientes inmunodeprimidos o afectados de fibrosis quística (106)(117), lo cual podría entenderse teniendo en cuenta que el virus de la parotiditis es también un *Paramixovirus* (*Rubulavirus*).

Las infecciones por VPIH se han asociado a exacerbaciones del síndrome nefrótico debidas a infecciones víricas respiratorias (118).

Se han referido casos de miocarditis y pericarditis en pacientes con serología positiva para VPIH (119). VPIH-1 ha mostrado tener cierta actividad procoagulante, pudiendo jugar un papel en las enfermedades cardiovasculares (120). Se ha descrito que VPIH puede producir edema pulmonar en ratas hipóxicas, lo que sugiere que podría favorecer el edema pulmonar en condiciones de gran altura.

En pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) o con síndrome de Reiter se han encontrado niveles elevados de Ac frente a VPIH-1 aunque de manera poco significativa. Se ha asociado la aparición de mialgias y rabdomiolisis en algunos niños tras la infección con patógenos respiratorios comunes, incluyendo VPIH. Incluso se ha informado del fallecimiento de un niño por rabdomiolisis en el que se detectó VPIH-3 (4).

En muestras faríngeas y rectales en adultos con diarrea sanguinolenta se ha objetivado VPIH-3, aunque no pueda descartarse el hallazgo casual del virus en recto fruto simplemente de su tránsito paso por el tubo digestivo tras la deglución. En un estudio realizado en Taipei, el 10% de los pacientes pediátricos ingresados con infección por VPIH presentaron clínica gastrointestinal (65).

En resumen, numerosos cuadros clínicos diferentes a infecciones respiratorias se han asociado ocasionalmente con infecciones por los VPIH, asociaciones difíciles de estudiar por la baja frecuencia de algunas de ellas (ejemplo miocarditis, rabdomiolisis) y que en algunos caso pudieran ser circunstanciales (LES, síndrome de Reiter).

## 1.5. DIAGNÓSTICO

Un diagnóstico rápido y preciso de los patógenos virales respiratorios, ayuda en la terapia que va a recibir el paciente con infecciones respiratorias, al alcanzar en muchos casos un diagnóstico etiológico probable o de certeza. El diagnóstico temprano tiene el potencial de reducir la realización de pruebas de laboratorio innecesarias, el uso de antibióticos y las complicaciones (121)(122). El principal valor de las pruebas de detección viral en niños que

presentan una infección de las vías respiratorias es ayudar a diferenciar entre infecciones virales y bacterianas, lo que facilitará la toma de decisiones clínicas.

Una muestra clínica adecuada y el empleo de pruebas virológicas sensibles y específicas son los dos principales factores a considerar para efectuar el diagnóstico virológico de las infecciones por VPIH. El importante desarrollo tecnológico de los últimos años ha favorecido que en muchos Laboratorios de Virología Clínica se hayan ido modificando los métodos empleados, desde el clásico cultivo en líneas celulares, pasando por la detección de antígenos en métodos directos y de Shell-vial, hasta los más recientes métodos moleculares (PCR). No obstante, todos estos métodos siguen aún vigentes en unos u otros laboratorios.

### 1.5.1. Muestras clínicas

La nasofaringe y la orofaringe son las localizaciones primarias de la replicación inicial de los VPIH. Los virus se excretan en título alto en los primeros 2-4 días de la infección. Después, su excreción va disminuyendo, dejando de ser detectable en niños inmunocompetentes a los 6-10 días, en ocasiones algunos días más en lactantes y niños pequeños. El aislamiento del virus en adultos es más difícil, principalmente porque la carga viral producida en estos es menor que en los niños. Niños y adultos inmunodeprimidos y aquellos con patología pulmonar crónica pueden presentar excreción persistente de los VPIH, en ocasiones durante meses (4).

La muestra de elección para el diagnóstico virológico es el aspirado o lavado nasofaríngeo, preferiblemente obtenido en los primeros tres días después del inicio de los síntomas, dado que contiene abundantes células epiteliales y secreciones infectadas. Otras muestras del tracto respiratorio superior que también se consideran adecuadas, pero en las que cabe esperar un rendimiento algo menor, son los exudados nasales, exudados faríngeos, lavados nasales y gargarismos. Muestras del tracto respiratorio inferior como el lavado broncoalveolar, son también aceptables en casos con sospecha de infección del tracto respiratorio inferior.

Algunos sistemas de vigilancia de enfermedades respiratorias agudas realizan los test diagnósticos a partir de muestras nasofaríngeas y orofaríngeas. Sin embargo, pocos estudios han evaluado la diferencia entre ambas en cuanto al rendimiento. En un estudio publicado en el año 2011 (123) se recogieron pares de muestras (una nasofaríngea y otra orofaríngea) separadamente de pacientes pediátricos y adultos con enfermedad respiratoria en dos lugares de Kenia en los que se efectuó vigilancia respiratoria, que emplearon para este fin un método de qRT-PCR. En general, las muestras orofaríngeas tuvieron una mayor sensibilidad para adenovirus y virus influenza A de la pandemia del 2009 (H1N1) y las nasofaríngeas para virus influenza B, VPIH-2 y VPIH-3. Ambos tipos de muestras mostraron sensibilidad similar para

metapneumovirus humano, virus influenza A (H3N2), VPIH-1 o VRS. Los autores concluyeron que la sensibilidad de los dos tipos de muestras para la detección de virus respiratorios fue variable para los diferentes virus y que globalmente las muestras fueron similares en términos de eficacia.

En otro estudio realizado en Inglaterra (124) se analizaron muestras mediante frotis nasofaríngeos y orofaríngeos emparejados de 533 niños hospitalizados con infección del tracto respiratorio inferior mediante RT-PCR múltiple. Las muestras orofaríngeas permitieron aumentar el número de infecciones virales detectadas en un 15%, en comparación con la recolección únicamente de un hisopo nasofaríngeo. Esto ocurrió con mayor frecuencia en los casos con detección por virus influenza, VPIH y adenovirus.

En otro estudio (125) que englobaba niños hospitalizados por infección del tracto respiratorio inferior, no se encontraron diferencias en cuanto a la utilización de lavados/aspirados o frotis/hisopos para la detección de diferentes virus como VRS, VPIH, influenza, rinovirus, coronavirus y metapneumovirus. Aunque los lavados tuvieron un mayor rendimiento viral, no hubo diferencias significativas en la sensibilidad diagnóstica entre las dos muestras, excepto para adenovirus, que mostró una sensibilidad menor con el frotis respecto al lavado/aspirado. En conjunto los resultados de estos y otros estudios sugieren que para obtener el máximo rendimiento diagnóstico en el caso de los VPIH, de no disponer de lavado o aspirado nasofaríngeo, la combinación de ambas muestras sería la opción más adecuada, tal como se realiza actualmente en algunos Sistemas de Vigilancia de la Gripe (hisopo faríngeo + nasal).

Para obtener los exudados es recomendable que los hisopos utilizados sean de poliéster u otro material sintético, y no de algodón, alginato de calcio o con depresores de madera, ya que estos materiales, pueden contener inhibidores de pruebas moleculares y tóxicos para líneas celulares. Las muestras clínicas (hisopos o lavados nasales de 2 a 4 mL) se deben colocar en medio de transporte viral. Estos medios se basan en una base de proteínas de ternera o en medio esencial mínimo (tal como el medio de Eagle) suplementado con alguna fuente de proteína, como por ejemplo suero de ternera o albúmina bovina al 5%, contienen antibióticos y agentes antifúngicos para disminuir la contaminación y un buffer tamponado para que se mantenga un pH de 7,5 a 8 después de la adición de la muestra clínica. La muestra debe ser transportada al laboratorio para ser procesada en pocas horas, lo que es especialmente importante si el método diagnóstico es el cultivo celular ya que los diferentes serotipos de VPIH pierden rápidamente infectividad cuando la temperatura aumenta de 4 a 8°C. En caso contrario la muestra se debe mantener a 4°C en el medio de transporte. Si se prevé un retraso en el procesamiento superior a 24-48 horas la muestra debe ser congelada. Los mejores rendimientos para la detección de antígenos virales mediante ensayos de inmunofluorescencia

(IF) se obtienen si las muestras son procesadas 2-3 horas después de ser obtenidas y antes de 48 horas para el aislamiento de virus en cultivos celulares (2).

Es muy poco frecuente procesar muestras no respiratorias para VPIH. El LCR se procesa mediante métodos moleculares (PCR) o directamente en cultivos tisulares. Si se va a congelar se debe agregar medio de transporte 1:1 antes de la congelación.

### **1.5.2. Métodos de diagnóstico viral empleados en el laboratorio**

#### **1.5.2.1. Aislamiento mediante cultivo celular**

Desde hace más de 70 años se ha utilizado el aislamiento viral en cultivos celulares para establecer un diagnóstico virológico. El diagnóstico mediante cultivo celular se basa en que, tras la inoculación de las muestras en diferentes líneas celulares, se puede observar un efecto citopático que demuestra el crecimiento del virus en dichas células. Otros métodos permiten también detectar el crecimiento viral, así como realizar su identificación (hemadsorción, tinciones, inmunofluorescencia, molecular).

Una ventaja del cultivo celular es la confirmación de la viabilidad y la infectividad del virus. Una vez cultivado, se pueden estudiar los virus aislados para conocer la sensibilidad a determinados antivirales y la realización de estudios fenotípicos.

El aislamiento viral depende de diferentes factores entre los que destacan la calidad de la muestra clínica y que ésta sea adecuada al virus buscado, la idoneidad de las líneas celulares elegidas, los reactivos requeridos en el proceso y de manera especial la capacitación técnica del personal que realiza los diferentes procedimientos. Además de la carga viral de la muestra, otros factores que influyen en el éxito del aislamiento viral son el tiempo transcurrido desde la toma de la muestra hasta su procesamiento, la temperatura de conservación de la misma y el medio de transporte; como se ha referido previamente (2).

#### **Líneas celulares**

Varias líneas celulares primarias y secundarias apoyan el crecimiento de los VPIH. Las mejores son las células primarias de riñón de mono (PMK), incluyendo macaco Rhesus y mono *Cynomologus*, así como de mono verde africano. Entre las líneas secundarias, las células LLC-MK2 son aceptables para el aislamiento primario. Otras líneas celulares como las Vero, HEp-2, MDCK y HeLa pueden ser usadas para transferir aislamientos pero no son recomendadas para

aislamiento primario, a partir de muestra clínica (14). VPIH suele aislarse más fácilmente en líneas celulares de origen epitelial que en fibroblastos.

La recuperación de los VPIH mejora añadiendo de manera exógena una proteasa (normalmente tripsina 2-3 µg/mL) al medio de mantenimiento del cultivo celular. Esto es debido, a que como se ha comentado antes, los VPIH necesitan escindir la proteína  $F_0$  en  $F_1$  y  $F_2$  para un eficiente crecimiento en el cultivo celular (4), lo que se consigue mediante proteólisis. Por ejemplo, VPIH-3 crece eficientemente en células PMK y puede incluso hacerlo en células LLC-MK2 en un medio libre de suero, pero la adición de tripsina aumenta la infectividad, y mejora el rendimiento especialmente en células inicialmente menos permisivas como Hep-2. VPIH-1, VPIH-2 y VPIH-4 han demostrado una mayor replicación con la línea celular Vero, también en presencia de tripsina (126). En la actualidad la tripsina se considera esencial para el cultivo de los VPIH independientemente de la línea empleada. La combinación de líneas por ejemplo PMK y LLC-MK2 puede ser necesaria para un óptimo aislamiento de los VPIH.

Las células PMK infectadas no suelen mostrar efecto citopático con la mayoría de los VPIH aislados. Raramente se puede observar a los 4-8 días redondeamiento de células y la formación de algunos sincitios. Afortunadamente, los VPIH producen hemaglutinina, que se encuentra insertada en la membrana de las células infectadas y que puede ser puesta de manifiesto mediante hemadsorción y otras técnicas (14). No obstante, la hemadsorción, no es una propiedad exclusiva de los VPIH, siendo compartida con el virus de la parotiditis y otros *paramixovirus*, así como con otros virus como es el caso de los virus influenza, por lo que solo sirve de aproximación al diagnóstico. En caso de positividad deben ensayarse otras técnicas más específicas como es el caso de la inmunofluorescencia con Ac específicos.

Los VPI también pueden replicarse en cultivos de órganos de ratón, cobaya, hurón, en el epitelio respiratorio fetal humano, pero estos métodos solo se emplean en estudios de investigación. Aunque algunas cepas de VPIH pueden crecer en huevos embrionados, el rendimiento de este medio es malo y no se emplea para la recuperación de virus de estas especies.

### **Detección y tipaje**

Debido a que los aislamientos primarios de VPIH en cultivos tisulares rara vez producen efecto citopático, la observación directa de los cultivos en un microscopio de cabezal invertido no es útil para detectar cultivos positivos. Por ello, la hemadsorción (HAD) de glóbulos rojos de conejos de indias directamente sobre la monocapa del cultivo celular es un método indirecto

ampliamente usado para detectar el crecimiento de VPIH. El crecimiento de *Respirovirus* se detecta fácilmente utilizando HAd. La mayoría de los aislamientos de VPIH-1 se detectan al cuarto día (127) mientras que VPIH-3 precisa normalmente más tiempo. Sin embargo los *Rubulavirus* son más lentos: solo el 35% de los VPIH-2 son positivos al séptimo día por HAd (127), y los VPIH-4 pueden requerir incluso más de tres semanas. Curiosamente, la neuraminidasa de VPIH-4 parece ser sensible a la temperatura ya que la hemadsorción mejora a temperaturas de 37°C, mientras que el resto de serotipos reaccionan de manera adecuada a 4°C.

La principal alternativa a la HAd es la inmunofluorescencia (IF), actualmente el método más rápido y preciso tanto para detectar como tipar VPIH en cultivos tisulares y el más empleado en las últimas décadas (128). La IF es también más sensible y detecta cultivos positivos que no se detectarían mediante la HAd (127). Originariamente estas técnicas se realizaban con anticuerpos serotipo-específicos policlonales obtenidos en varias especies animales pero en la actualidad, la mayoría de los Laboratorios utilizan anticuerpos monoclonales (MAbs por sus siglas en inglés).

Otros métodos útiles de detección y tipificación del VPIH serían la HI, la fijación del complemento y la neutralización. Algunos de estos métodos están siendo abandonados (fijación de complemento, HAd, HI) ya que son lentos y poco sensibles, o han quedado restringidos a estudios de investigación (neutralización). Hasta que en la IF los reactivos comerciales (MAbs) han estado ampliamente disponibles, la HAdI era el método más usado para la identificación del serotipo de los VPIH. Por tanto, cada identificación necesitaba 3-5 días más después de que el cultivo fuera identificado como positivo. La IF se puede adaptar a un análisis de citometría de flujo, proceso automatizado que analiza los Ac fluorescentes que se unen a las superficies celulares e informa de esta unión cuantitativamente. De momento esta tecnología se realiza esencialmente en el contexto de estudios de investigación (4).

El largo tiempo requerido para obtener un resultado, la dificultad de la técnica y el tiempo de personal, son los principales factores que están haciendo que el cultivo celular, técnica consustancial a los laboratorios de diagnóstico virológico durante décadas, esté siendo reemplazada actualmente por las más modernas técnicas de detección directa de antígenos y especialmente por los métodos moleculares. El cultivo celular es además menos sensible y necesita virus viable (infectivo) para obtener resultados positivos. Sin embargo, sigue siendo empleado en los Laboratorios de referencia, puesto que es la única técnica que permite disponer de aislamientos virales.

### **1.5.2.2. Microscopía electrónica**

La microscopía electrónica puede detectar fácilmente VPIH. Sin embargo, muchos *paramyxovirus* son indiferenciables morfológicamente (ejemplo, el virus de la parotiditis). La principal limitación del método, además del elevado coste económico del microscopio, es que se necesita que la muestra posea una concentración de viriones elevada, por lo que es un método poco sensible. Estas razones hacen que sea una técnica poco utilizada en el diagnóstico clínico (a diferencia de en el terreno de la investigación básica), más aún con el desarrollo de técnicas alternativas de mayor utilidad (4).

### **1.5.2.3. Detección de antígenos**

Los métodos basados en la detección de antígenos virales tienen algunas ventajas importantes sobre los cultivos celulares como son su independencia de la infectividad del virus y una rápida obtención de resultados, que generalmente pueden estar disponibles pocas horas después de la recepción de la muestra en el laboratorio. Sin embargo, su sensibilidad puede ser algo menor, y pueden ser difíciles de interpretar (subjetividad) ya que dependen de la experiencia del personal que los realice. Los métodos de IF y enzimoimmunoanálisis (EIA) se emplean habitualmente para la detección de los antígenos virales directamente en la muestra clínica o bien en las células del cultivo en las que previamente se ha inoculado la muestra. La calidad de la muestra obtenida (con suficiente número de células infectadas) y su adecuado transporte son factores determinantes para obtener resultados adecuados en estas técnicas.

Los antígenos virales utilizados para el diagnóstico son, generalmente, antígenos superficiales, como la H y la N, que se encuentran frecuentemente en las membranas plasmáticas de las células infectadas. También es posible utilizar otras proteínas virales menos accesibles, como la NP (2).

Se han desarrollado métodos para detectar antígenos de VPIH usando ELISA, radioinmunoensayo y fluoroinmunoensayo (FIA), habiéndose comunicado una sensibilidad del 75-95% y mostrando una detección superior para los serotipos VPIH-1 y VPIH-2 (94-100%) con la técnica MAb-FIA (4).

Por otra parte, la detección rápida de antígenos de VPIH mediante inmunofluorescencia está disponible comercialmente pero con una sensibilidad menor a la PCR (129) (130).

La técnica *Shell vial* es otro método usado para la identificación rápida del VPIH. En esta técnica, muy empleada en los últimos 20-25 años, el cultivo tisular crece en portaobjetos. La muestra es centrifugada sobre la monocapa para acelerar la absorción viral y la infección

celular. La detección se realiza mediante la IF de las células del cultivo tisular, típicamente entre 48 horas y 5 días. A pesar de que se han comunicado resultados variables, la mayoría parecen demostrar una mejora en la detección utilizando este método. Se ha comparado la técnica *Shell vial* y el cultivo tisular para la detección de VPIH, mostrando sensibilidades con un promedio del 84%, pero la mayoría de las detecciones fueron de VPIH-3 (131). Los virus influenza y VRS son los dos virus más ampliamente buscados en muestras clínicas mediante *shell vial*, con excelentes resultados, formando parte esta técnica en la actualidad del arsenal diagnóstico de la mayor parte de los laboratorios de Virología Clínica.

En un intento por mejorar el rendimiento de la técnica de *Shell vial* se han utilizado monocapas con mezclas de dos o tres líneas celulares (ejemplo, células de pulmón de visón y células A549 cocultivadas o A549 y MDCK) pero los estudios para la detección de VPIH son escasos y los resultados no concluyentes (4). Las mezclas de células mostraron una sensibilidad de casi el 90% en relación al empleo individualizado de las líneas celulares PMK + LLC-MK2 + A549 (132).

### **1.5.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos y entre ellas la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de secreciones orofaríngeas o nasofaríngeas son actualmente el *gold standard* debido a su alta sensibilidad y especificidad y a la rapidez con la que se obtienen los resultados habiendo sustituido actualmente en muchos laboratorios al cultivo tisular y los métodos de detección de antígenos. Comparando con estos métodos, las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos han demostrado superioridad en términos de sensibilidad para la detección de los virus. Además, el uso de ensayos múltiples que permiten analizar simultáneamente varios virus reduce considerablemente el tiempo y el coste comparando con los métodos clásicos (121).

La técnica de PCR permite detectar VPIH y otros virus respiratorios en secreciones orofaríngeas y nasofaríngeas con una sensibilidad del 95-100% y una alta especificidad (133)(134)(135)(136). El rendimiento de la detección de VPIH por PCR es 1,5 veces mayor que mediante el cultivo viral (122). Tras la realización de un paso de transcripción inversa para efectuar copias de ADN a partir de los ARNv eventualmente presentes en las muestras, la PCR puede amplificar simultáneamente los ácidos nucleicos virales de virus ARN (VPIH, VRS, Influenza...) y también ADN (adenovirus, bocavirus).

La utilización generalizada en la presente década de métodos de amplificación molecular para la detección de virus respiratorios ha permitido incrementar de manera considerable el número



de muestras respiratorias en las que se detecta alguno de los virus respiratorios y ha contribuido a mejorar el conocimiento de las enfermedades asociadas a estos virus. Particularmente evidente es el caso de algunos virus de difícil aislamiento, como VPIH-4, que ha pasado de ser considerado un patógeno poco frecuente y causante de infecciones leves del tracto respiratorio superior, a tener una repercusión clínica al menos tan importante como la que tienen algunos virus incluidos en el diagnóstico sistemático de la infección del tracto respiratorio.

Además de mejorar el rendimiento en el diagnóstico, la aplicación de técnicas moleculares ha permitido identificar nuevos virus relacionados con la afección respiratoria en seres humanos. En los últimos años se han descubierto los virus metapneumovirus humano, bocavirus humano y nuevos coronavirus (NL63, HKU1, MERS) y rinovirus (rinovirus C). Además, se han descrito en profundidad el comportamiento de virus ya conocidos, como es el caso del enterovirus D68.

La secuenciación de los productos obtenidos en la amplificación posibilita la realización de estudios adicionales de genotipificación, epidemiología molecular y sensibilidad a determinados antivirales.

Sin embargo, la elevada sensibilidad de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos no está exenta de inconvenientes, como la detección ocasional de virus en personas asintomáticas o la detección prolongada de ARN viral en pacientes que ya están recuperados de una infección respiratoria, en ocasiones de difícil valoración clínica. Sin duda, un gran reto que plantean las infecciones virales respiratorias es determinar si un virus detectado en el tracto respiratorio es el causante de la afección respiratoria.

Un hallazgo común con las infecciones virales respiratorias y que es relativamente frecuente son las denominadas infecciones dobles, coinfecciones o infecciones por múltiples virus. En efecto, la detección de dos o más agentes virales en un mismo proceso respiratorio puede interpretarse como infección doble (múltiple) de las células del tracto respiratorio. Sin embargo, debería contemplarse también la posibilidad de que sólo uno de los virus sea el verdadero causante del síndrome y el segundo o el resto refleje una colonización asintomática del tracto respiratorio o la detección de ARN viral residual de una infección precedente recién superada. Por lo tanto, sería más preciso hablar de codetección o detección múltiple de virus en una misma muestra respiratoria. Una opción para tratar de determinar la verdadera implicación de un virus en la afección respiratoria podría ser su cuantificación en las muestras respiratorias mediante técnicas de PCR en tiempo real. No obstante, este tipo de estudios presentan problemas importantes ya que sus resultados pueden variar en función de la localización de la muestra obtenida, del método de obtención, y de la cantidad y homogeneidad de la misma. Además, no está estandarizada la determinación de carga viral en muestras respiratorias.

Con la aún reciente llegada de la PCR en tiempo real, un refinamiento de la PCR convencional, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el propio tubo de reacción, con tiempos de respuesta mejores (68). La detección de los productos amplificados se produce mediante detección de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN que se va sintetizando. La fluorescencia en una reacción puede ser medida con el empleo de agentes intercalantes, que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen al ADN bicatenario formado durante la amplificación, o bien sondas marcadas con fluorocromos. Además de la rapidez y la disminución del riesgo de contaminación, los sistemas de PCR en tiempo real permiten aproximarse a la cuantificación de la carga viral de manera sencilla, es decir a la concentración inicial de ADN o ARN viral presente en una muestra clínica. Para ello, sólo se necesita incluir unos controles externos con concentraciones conocidas y crecientes del ADN diana para generar una curva patrón. Sin embargo, como se ha referido antes, aún no hay procedimientos estandarizados para muestras respiratorias.

Un método molecular no empleado de rutina pero que ha sido usado en años previos es la detección del ARN de VPIH directamente mediante hibridación o análisis Dot Blot con sondas de ADN específicas del virus. Sin embargo, el método necesita horas para ser realizado, y es poco sensible, ya que la cantidad de ARNv que hay en muchas de las muestras no es suficiente como para realizar una detección VPIH sin amplificación biológica (cultivo tisular) o molecular.

Por último, diversos ensayos basados en RT-PCR (en ocasiones acopladas a enzimoimmunoanálisis, técnica de hibridación) múltiples permiten la detección simultánea de VPIH-1, VPIH-2, VPIH-3, influenza A y B, VRS-A, VRS-B y otros virus respiratorios. En general estas pruebas han mostrado una sensibilidad del 95-100% y una especificidad del 97-100% en comparación con los cultivos tisulares, obteniendo resultados en 3-7 horas (122)(137)(138)(139).

En la actualidad existen varias técnicas comerciales basadas en diferentes métodos de amplificación molecular y variantes de la RT-PCR multiplex, con cada vez más implantación en los laboratorios clínicos.

### **1.5.2.5. Serología**

El diagnóstico serológico se basa en la demostración de las diferencias entre niveles de anticuerpos en fase aguda y de convalecencia, ya que la detección de IgM específica no es posible utilizando reactivos comerciales y, aunque se genera tras la primoinfección, la

existencia de cuatro serotipos y de reinfecciones hacen la búsqueda de este anticuerpo poco útil. Existen muchos métodos para detectar Ac contra VPIH, incluyendo ELISA, radioinmunoensayo, inhibición de la hemaglutinación, fijación del complemento, Western blot, ensayos de neutralización, entre otros.

Para efectuar el diagnóstico serológico se precisa disponer de dos muestras de suero. La primera muestra de suero (fase aguda) debe ser recogida de la persona infectada lo antes posible tras el inicio de la infección. La segunda muestra de suero (fase de convalecencia) debe ser recogida cuando se produce la cantidad máxima de anticuerpos, normalmente 3-5 semanas después de la infección o cuando se espera que la diferencia sea significativa (unas dos semanas después de la primera). Ambas muestras, la de fase aguda y de convalecencia deben ser analizadas al mismo tiempo y los títulos obtenidos comparados (4).

En técnicas como la fijación de complemento o la inhibición de la hemaglutinación, un aumento de cuatro veces en la titulación de anticuerpos se considera resultado positivo, con valor diagnóstico. No obstante, el diagnóstico serológico es de valor limitado dado que los anticuerpos generados son heterotípicos, con fuertes reacciones cruzadas entre VPIH diferentes, así como, en menor medida, con el virus de la parotiditis. Este problema es mayor cuando se intenta diferenciar la infección por VPIH-1 de la infección por VPIH-3, ambos del mismo género (*Respirovirus*).

Un importante número de sueros de niños infectados con uno u otro virus presentan títulos similares frente a ambos virus. Aunque la fijación del complemento es el método menos sensible, es el que menos problemas tiene de reactividad cruzada. Por el contrario, ELISA es el ensayo más sensible y detecta el mayor número de aumento de títulos en pacientes con patología respiratoria, pero es el menos específico y detecta muchos Ac duales. VPIH-2 ha mostrado la menor reactividad cruzada.

Por tanto, un aumento de los títulos de Ac de cualquiera de los serotipos debe ser interpretado como infección por VPIH y no debe ser utilizado para determinar el serotipo del VPIH. El aislamiento del virus y el tipado con MAbs o métodos moleculares pueden establecer con precisión el serotipo.

Debido a la existencia de técnicas de diagnóstico directo rápidas, sensibles y específicas, como la PCR, y a las importantes limitaciones comentadas de las técnicas serológicas en el contexto de la infección por VPIH, estas técnicas no son utilizadas de manera rutinaria para el diagnóstico de infección por VPIH.

## 1.6. TRATAMIENTO

En general, las infecciones por VPIH son autolimitadas, pero la mortalidad puede ser alta en pacientes con patología crónica o inmunosupresión importante, como ocurre en pacientes sometidos a trasplantes de células hematopoyéticas.

El tratamiento de las infecciones por VPIH es de soporte, basado en antitérmicos y una adecuada hidratación para facilitar la movilización de secreciones. Sin embargo, la inhalación de aire humidificado no parece producir un beneficio demostrable para el niño con laringitis (19). En casos de laringitis moderada, el tratamiento con adrenalina nebulizada y corticoides puede ser efectivo (15). La utilización de glucocorticoides y adrenalina nebulizada ha conllevado una disminución en la frecuencia de hospitalizaciones por laringitis, lo que puede estar relacionado con la disminución del porcentaje de ingresos hospitalarios por VPIH-1 (140) (141). En casos graves, el tratamiento de las infecciones por VPIH puede incluir la administración de oxígeno suplementario y la supresión o disminución de dosis de fármacos inmunosupresores, en el caso de receptores de trasplantes (142).

En el tratamiento de la laringitis el uso de budesonida nebulizada y de dexametasona intramuscular y oral es beneficioso, con disminución de la estancia hospitalaria y el número de consultas (143) y en los estudios comparativos ambos fármacos parecen ser igualmente eficaces (144). La epinefrina nebulizada se asocia con una reducción de los síntomas de la enfermedad, pero hay que considerar que la mayoría de los profesionales administran dicho fármaco en combinación con un glucocorticoide (145). Diferentes estudios han demostrado que la morbilidad y la hospitalización por laringitis pueden disminuir con la pronta administración de budesonida nebulizada o glucocorticoides vía oral/ intramuscular (68). Así mismo numerosos estudios han demostrado que la administración oral o intravenosa de glucocorticoides mejoran los síntomas de la laringitis a las seis horas siguientes de la administración de la medicación (83).

No existe terapia antiviral aprobada para el tratamiento de las infecciones por VPIH y no se utiliza ninguna para las infecciones por VPIH habituales. Sin embargo, la ribavirina ha mostrado actividad antiviral *in vivo* e *in vitro* contra VPIH y ha sido empleada en forma intravenosa en niños inmunocomprometidos y adultos con enfermedad grave (87)(146). La mayor parte de la experiencia proviene de ensayos no controlados o informes anecdóticos. Sobre la base de los resultados favorables de estos ensayos limitados, su uso podría tal vez considerarse en el niño inmunocomprometido con una enfermedad respiratoria menor. Sin embargo, una reciente revisión en el Centro de Cáncer Fred Hutchinson, demostró que las neumonías por VPIH-3 responden mal a la ribavirina nebulizada, no así las causadas por VRS (147).

El DAS181 es un nuevo antiviral inhibidor de la proteína de fusión sialidasa. Parece ser eficaz contra la infección por VPIH *in vivo* e *in vitro*. Se trata de una proteína que escinde el ácido siálico que contienen los receptores de VPIH en las células respiratorias, evitando que VPIH se una a éstas células (142). El DAS 181 tiene actividad antiviral contra influenza y VPIH y se han tratado con éxito infecciones por VPIH en pacientes con trasplantes de pulmón y células hematopoyéticas (148)(149)(150). En un estudio, cuatro niños inmunodeprimidos que habían recibido trasplante de células hematopoyéticas presentaron infección del tracto respiratorio inferior que se trató con DAS181 inhalado de cinco a diez días. Todos los pacientes toleraron el tratamiento y mejoraron clínicamente, con disminución de los requerimientos de oxígeno y mejoría radiológica. En todos los casos se observó descenso en las cargas virales y en los síntomas tras el inicio de la terapia. Los efectos adversos observados fueron leves y autolimitados, no modificando la duración del tratamiento. Efectos adversos como el alargamiento del tiempo parcial de tromboplastina, descrito en publicaciones anteriores, parece estar en relación con la interferencia del fármaco con las pruebas de laboratorio y no se debe a una anomalía real en la coagulación (142).

Se ha descubierto que algunos fármacos empleados en el tratamiento de otras infecciones y patologías tienen actividad *in vitro* contra los *paramyxovirus* aunque no han tenido repercusión clínica en este contexto, al menos por el momento. Entre ellos se encuentran los inhibidores de la neuraminidasa (ejemplo, zanamivir), inhibidores de la síntesis de proteínas (puromicina), inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos, ácido ascórbico, elenolato cálcico, derivados de benzotiazol (151)(152). Sin embargo, la amantadina no disminuyó la gravedad de las infecciones de vías respiratorias superiores en adultos voluntarios infectados con VPIH-1, a pesar de que tiene actividad anti-VPIH a altas concentraciones.

Diversos estudios han demostrado que los inmunoestimuladores no específicos como el imiquimod pueden proteger contra la infección por *paramixovirus*. Parte de este efecto protector parece deberse a la estimulación de las citoquinas endógenas, siendo el interferón (alfa y gamma), el factor estimulante de colonias de granulocitos humano y la IL-1 $\beta$  humana algunas de las citoquinas que han sido probadas.

La utilización de inmunoterapia (incluyendo inmunoglobulina intravenosa) y corticoides de manera combinada han demostrado reducir el título del virus y la inflamación pulmonar en un modelo animal con ratas algodoneras. La inmunoterapia puede ofrecer una opción terapéutica en pacientes con enfermedades graves hasta que estén disponibles vacunas y antivirales seguros y efectivos (4).

## 1.7. PREVENCIÓN

### 1.7.1. Medidas preventivas generales

La educación de la población sobre las medidas de higiene personal, como cubrirse la boca al toser y estornudar, la eliminación sanitaria de los exudados de la boca y la nariz (incluyendo el uso de pañuelos de papel, no de tela), así como el lavado de manos y evitar la contaminación de superficies y fómites con secreciones respiratorias y limpiarlos si pueden haberse contaminado, son medidas esenciales para el control de la infección y limitar la diseminación de los VPIH. Otras medidas incluyen evitar el contacto estrecho con personas con signos evidentes de infección de vías respiratorias superiores (ejemplo cruce de manos) y llevarse las manos a ojos, nariz y boca evitando así las autoinoculación. Se ha sugerido que la lactancia materna puede ser un factor protector de la infección, debido a la transferencia de anticuerpos (<https://www.cdc.gov/parainfluenza/about/prevention-treatment.htm>).

En el entorno hospitalario, deberían seguirse precauciones estándar y de contacto (la higiene de manos y la prevención de contaminación de las superficies con secreciones respiratorias) mientras dure la enfermedad, a lo que algunos expertos añaden precauciones de gotas en caso de bronquiolitis o neumonía por VPIH en lactantes y niños pequeños (153). Es conveniente separar a todos los niños ingresados con signos de infección respiratoria, así como el cumplimiento de las medidas de higiene general, incluyendo durante la atención sanitaria el estricto lavado de manos entre pacientes y utilizar guantes que sean desechados tras la visita. Los pacientes con alto riesgo de complicaciones deben ser separados de los pacientes posiblemente infectados. Además, normativas institucionales que limiten la exposición del paciente a los visitantes o al personal con síntomas respiratorios pueden ayudar a disminuir las infecciones nosocomiales por VPIH (4).

Todas estas medidas preventivas tienen utilidad limitadas y no evitan la diseminación de los VPIH en la comunidad. Sin embargo, el desarrollo de vacunas, iniciado poco después del descubrimiento de estos virus, ofrece una oportunidad para dar un salto cualitativo importante en el control de estas infecciones.

### 1.7.2. Vacunas en desarrollo

Actualmente no hay vacunas aprobadas contra los VPI (7)(20)(46)(154)(155)(156). La infección natural causa inmunidad parcial, incompleta, permitiendo la ocurrencia de reinfecciones posteriores incluso en ausencia de variaciones genéticas (154). Varias vacunas candidatas están siendo estudiadas en las poblaciones humanas, y está en una fase avanzada

de desarrollo una vacuna pensada para ser usada en lactantes, niños pequeños y adultos inmunocomprometidos.

Aunque los VPIH parecen un objetivo fácil para el desarrollo de vacunas, ya que causan enfermedad aguda, generalmente autolimitada y no establecen una infección persistente, esta idea ha demostrado estar lejos de la realidad debiendo superar varios obstáculos para que llegue a ser materializada.

En primer lugar, la inmunidad inducida por una sola infección con una cepa natural de VPIH no previene de reinfecciones sintomáticas y, de hecho la mayoría de los niños y adultos experimentan múltiples infecciones sintomáticas por VPIH a lo largo de la vida. Sin embargo, las reinfecciones generalmente inducen una enfermedad más leve y en ellas, la afectación grave del tracto respiratorio inferior es infrecuente.

En segundo lugar, la enfermedad grave por VPIH-3 ocurre a menudo en los lactantes menores de seis meses de edad y es sabido que en niños pequeños una respuesta de anticuerpos contra las glucoproteínas de superficie viral o bacteriana suele ser menos importante que en niños mayores. Además, los niños pequeños tienen un menor número de células B y una maduración de la afinidad de los anticuerpos menos eficiente (157)(158).

En tercer lugar, los anticuerpos maternos pueden bloquear la inmunogenicidad de la administración parenteral de las vacunas no vivas y preferentemente de las vacunas vivas administradas por vía mucosa (48). Por tanto, se necesitaría una vacuna frente a los VPIH que fuera inmunogénica en recién nacidos en presencia de IgG maternas para proteger de la infección del tracto respiratorio inferior durante la primera infección de la cepa salvaje del virus y que además fuera bien tolerada y segura (7).

El desarrollo de vacunas frente a los VPIH se inició en los años sesenta, no mucho después del descubrimiento de estos virus. Pronto se demostró que la protección contra la cepa salvaje de VPIH-1 se correlacionaba con la presencia de Ac neutralizantes en la mucosa nasal. Los Ac séricos también contribuyeron a la protección, pero solo cuando el título de Ac en el suero era alto (7). Inicialmente se desarrolló una vacuna inactivada, conteniendo VPIH-1, VPIH-2 y VPIH-3, que se observó no protegía a los niños de la infección natural. La mayoría de los niños desarrollaban Ac contra los tres serotipos, pero los niveles eran considerablemente menores que los que se desarrollaban tras una infección natural por dicho germen (159). Algunos estudios adicionales relevaron que algunos de los Ac producidos contra los virus inactivados no podían neutralizar el virus nativo y no se desarrollaba inmunidad (160) .

La protección cruzada entre los serotipos de VPIH es de corta duración o casi nula, siendo VPIH-3 responsable de más hospitalizaciones que VPIH-1 y VPIH-2 juntos. En esta situación,

una vacuna frente a VPIH-3 sería deseable, para su administración en lactantes pequeños (1-2 meses de edad), ya que gran parte de la enfermedad grave ocurre en los primeros meses de vida. VRS y VPIH-3 pueden infectar a edades muy tempranas en la vida y en presencia de anticuerpos maternos, por lo que una vacuna combinada VRS/VPIH-3 que pudiera inducir inmunidad protectora en esta población de lactantes pequeños es probablemente el objetivo más importante en el desarrollo de vacunas contra las enfermedades respiratorias virales en pediatría.

Se podría administrar una vacuna frente a VPIH-1/VPIH-2 en edades más avanzadas que la VRS/VPIH-3, porque la enfermedad por estos serotipos es menos frecuente en los primeros seis meses de vida. Dado que la carga estimada de morbilidad en lactantes y niños es aproximadamente 4:2:1 para VPIH-3, VPIH-1 y VPIH-2, respectivamente, la vacuna monovalente contra VPIH-2 sería de menos interés. Sin embargo, una vacuna VPIH-1/VPIH-2 podría desarrollarse como vacuna única o podría combinarse con VRS (7).

A través de genética inversa, se han desarrollado varias vacunas de VPIH-1 y VPIH-2 y algunas están en fase de ensayo clínico (20)(161)(162).

Las líneas de investigación actuales entorno a las vacunas contra el VPIH incluyen la administración intranasal de células vivas atenuadas, vacunas de subunidades (proteínas HN y F), vacunas obtenidas de virus bovinos/humanos recombinantes y vacunas obtenidas a partir de cepas diseñadas mediante genética inversa (4), habiéndose desarrollado mediante este método un ADNc derivado de un virus recombinante rPIV3-cp45 que es un punto importante de desarrollo en la actualidad. La principal ventaja de esta tecnología es la capacidad para producir rápidamente virus vacunales con características concretas predefinidas con un riesgo mínimo de contaminación biológica. El uso de vacunas de virus vivos atenuados obtenidos mediante esta tecnología, en lugar de muertos e inactivos, imita la infección natural generando tanto inmunidad humoral como celular, pero disminuye el riesgo de reconversión al tipo de virus salvaje (68). Además, ensayos clínicos de fase 1 y 2 han demostrado que la vacuna recombinante de virus vivo atenuado rPIV-3-cp45, es bien tolerada e inmunogénica en niños de 6-36 meses de edad, pero se requeriría un régimen de tres dosis para obtener la protección en lactantes menores de seis meses de edad, lo que supone un obstáculo de primer orden para la introducción de esta vacuna (20)(163).

Las vacunas de subunidades contienen las glucoproteínas HN y F del VPIH purificadas, que inducen anticuerpos funcionales en modelos animales (164). Por último, una vacuna recombinante modificada, Ankara (MVA), que expresa la proteína HN o F de VPIH-3, fue probada en primates mostrando una protección significativa de las vías respiratorias inferiores,



pero no demostró protección del tracto respiratorio superior frente a la infección por VPIH-3 (165).

### **VPI-3 bovino y VPI-3 bovino/humano**

El VPIH-3 bovino (VPIB-3), virus relacionado antigénicamente con el VPIH-3, ha sido evaluado en ensayos clínicos como candidato a vacuna para proteger a niños y lactantes del VPIH-3. Sin embargo, globalmente, las tasas de seroconversión a VPIH-3 han sido bajas (166)(167), si bien muy diferentes en función del grupo de población estudiado. En ensayos clínicos en humanos, los adultos con serología positiva para VPIH no producían respuesta inmune significativa al VPIB-3, pero los voluntarios seronegativos respondieron aceptablemente (168). Además, en ensayos en fase I en lactantes y niños seronegativos se ha visto que la vacuna BPIV-3 es altamente inmunogénica y segura (169)(170), sin embargo el título de Ac inhibidores de la hemaglutinación fue inferior contra VPIH-3 que contra VPIB-3. Para mejorar la inmunogenicidad contra VPIH-3 se construyeron mediante genética inversa dos versiones similares pero independientes de un virus quimérico VPIB/VPIH-3 derivado de cDNA (rB/VPIH-3). Estas quimeras fueron diseñadas para contener los genes HN y F de la cepa salvaje de VPIH-3 (171).

Los virus quiméricos rB/VPIV-3 modificados para expresar la proteína F del VRS o las proteínas de este virus F y G, son candidatos para vacunas bivalentes y su utilidad para prevenir infecciones por VRS y VPIH-3 está siendo actualmente investigada (7)(156)(172). Se genera, por tanto, un virus vacunal bivalente que expresa los principales antígenos protectores de VRS y VPIH-3. Estas vacunas fueron desarrolladas por MedImmune y NIAID y se ha observado buena tolerancia (173) y tasas de seroconversión a VRS y VPIH-3 de 67% y 100% respectivamente, en niños seronegativos de 6-23 meses de edad.

### **VPIH-3-cp45**

Otra vacuna objeto de estudio es la VPIH-3 adaptada al frío con virus vivo atenuado, denominada VPIH-3-cp45, derivada de la cepa salvaje JS del VPIH-3. Desarrollada en los años 90 (7), se mostró adecuadamente atenuada e inmunogénica en niños y lactantes de tan sólo un mes de edad (155). Del mismo modo, se encontró que esta vacuna era segura e inmunogénica en un ensayo clínico de fase II con lactantes y niños sanos seropositivos y seronegativos, con dos o tres dosis necesarias para inducir una inmunidad duradera (174).

En un ensayo en el que participaron 380 niños de entre 6-18 meses que incluía 226 lactantes y niños seronegativos, una dosis única fue bien tolerada, segura e inmunogénica (175). No hubo

diferencias significativas en la frecuencia de reacciones adversas (rinitis, tos, fiebre u otitis media) durante las primeras dos semanas después de la vacunación y el 84% de los vacunados seronegativos presentaron seroconversión indicando que la vacuna era segura, debidamente atenuada e inmunogénica (174).

Posteriormente, usando una técnica de genética inversa se ha desarrollado un prototipo VPI3-cp45 recombinante (rVPI3-cp45) muy prometedor, que actualmente está siendo utilizado para el desarrollo de vacunas en dos ensayos en fase I patrocinados por el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades infecciosas (NIAID) de USA. Se ha observado que rVPI3-cp45 parece seguro, bien tolerado, inmunogénico y bioequivalente al virus de la vacuna derivado biológicamente (176)(177)(178).

### **VPIH-3-cp45/VRS**

Se ha estudiado una vacuna experimental combinada, VPIH-3-cp45/VRS, en niños seronegativos de 6-18 meses de edad, que muestra que las respuestas de los anticuerpos son similares a los componentes de la vacuna monovalente (175). Se evaluó la compatibilidad de VRS vivo atenuado y los componentes de VPIH-3 en una vacuna bivalente experimental mediante la vacunación simultánea intranasal en niños seronegativo de entre 6-18 meses de edad, observándose una disminución de las infecciones tras la coadministración con el componente del VRS. Sin embargo la respuesta de anticuerpos frente a VPIH-3 fue similar en sujetos que recibieron anticuerpos monovalentes respecto a la vacuna bivalente (175).

### **VPI-1 murino (SeV)**

El VPI murino (virus Sendai), otro virus que esta antigénicamente relacionado a VPIH, se ha evaluado en ensayos clínicos como candidato a vacuna de virus vivos atenuados por vía intranasal frente a VPIH-1 (179). Los resultados sugieren que administrar SeV en niños pequeños seronegativos puede proteger contra las enfermedades graves del tracto respiratorio causadas por la infección del VPIH-1 (180).

### **Vacunas vivas atenuadas frente al VPIH-1**

Una vacuna VPIH-1 de virus vivo atenuado que se encuentra actualmente en desarrollo en ensayos clínicos contiene tres conjuntos de elementos atenuados (mutaciones) y se denomina

rPIV1-C<sup>R84G/Δ170</sup>HN<sup>T553A</sup>L<sup>Y942A</sup>. Esta vacuna confiere protección contra la infección de VPIH-1 en monos verdes africanos y la atenúa en adultos y niños seropositivos (7).

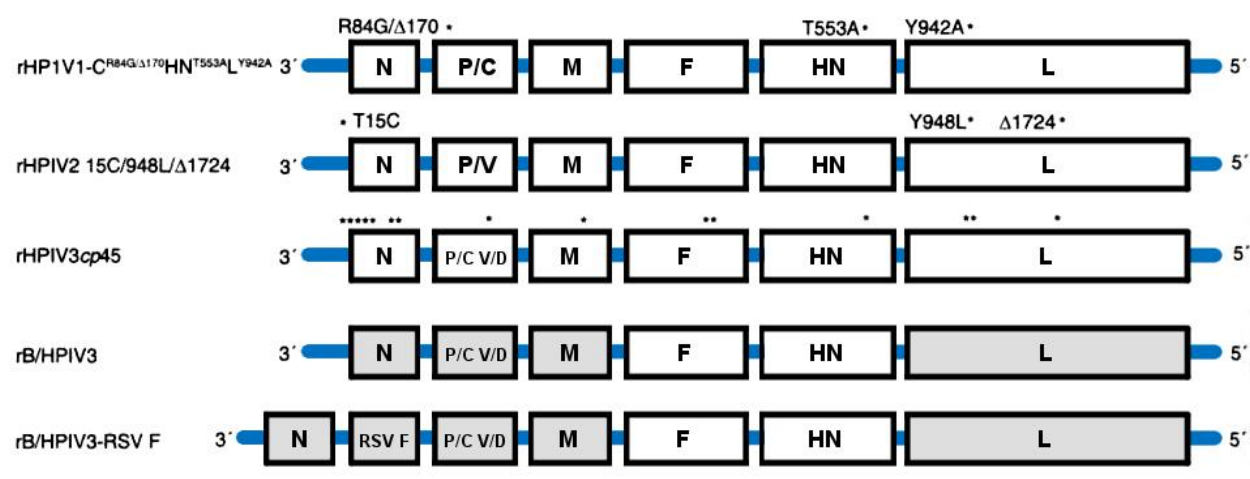
Una segunda vacuna de virus VPIH-1 vivo atenuado (rVPIH1/84/del170/942A) se ha estudiado en un ensayo clínico de fase I, pero resultó ser insuficientemente inmunogénica en niños seronegativos (170).

Por último, una vacuna recombinante de virus vivos atenuados bivalente VPIH-1/VRS (rVPIH-1/VRS-F) está en fase de evaluación preclínica (181).

### Vacunas vivas atenuadas frente a VPIH-2

El desarrollo de una vacuna viva atenuada VPIH-2 se basa en una longitud de ADN derivada de cADN de VPIH-2. Una vacuna candidata llamada rVPIH2-15C/948L/Δ1724 fue desarrollada utilizando una mutación combinada con una sustitución de aminoácidos y delección en la proteína L; produciendo protección contra la cepa salvaje de VPIH-2 (182). La vacuna está siendo estudiada en niños seropositivos.

Se ha descrito la utilización de una mezcla que expresa VPIH2-HN y dos rSeV adicionales (que expresan la proteína F de VRS y la proteína HN de VPIH-3) como protectora contra el VPIH-1, VPIH-2, VPIH-3 y VRS. Los resultados identifican los vectores de SeV como vacunas prometedoras para los cuatro serotipos diferentes de los *paramyxovirus* (183).



**Figura 4.-** Vacunas de virus vivo atenuado en desarrollo clínico [modificado de Schmidt et al, 2011 (7)]

## 1.8. IMPACTO EN SANIDAD

### 1.8.1. Morbimortalidad

Las infecciones del tracto respiratorio inferior son una de las causas más frecuentes de morbimortalidad en todo el mundo (184)(185). Globalmente la infección aguda del tracto respiratorio inferior sigue siendo la causa más importante de mortalidad infantil en niños menores de cinco años de edad, lo que representa aproximadamente 1,6 millones de muertes cada año (185).

Además de patógenos bacterianos como *S. pneumoniae* y *H. influenzae* tipo b, que se estima representan aproximadamente la mitad (36% y 16% respectivamente) de la mortalidad por neumonía global en niños menores de cinco años (186)(187), los principales contribuyentes a estas infecciones en la infancia se consideran los virus, concretamente VRS, VPIH e influenza. La mayoría de la enfermedad que produce el VPIH ocurre en niños menores de cinco años (188).

En EEUU alrededor de cinco millones de infecciones del tracto respiratorio inferior ocurren cada año en lactantes y preescolares, y mediante extrapolaciones de estudios de incidencia se ha atribuido al VPIH hasta un tercio de estas infecciones (61)(189). En ese país, VPIH se ha considerado responsable de un 30-40% de las infecciones respiratorias agudas y del 7% de las hospitalizaciones por fiebre e infección respiratoria aguda en niños menores de cinco años (142). Esta estimación se traduce en 23.000 hospitalizaciones atribuibles al VPIH cada año en este país, siendo VPIH-3 responsable de la mitad de las mismas (5).

En el año 2013 se publicó un importante trabajo (190) sobre la carga global y regional de los ingresos hospitalarios por infección aguda grave del tracto respiratorio inferior en niños durante el año 2010 en todo el mundo. Se estimó que ocurrieron 11.900.000 episodios graves y 3.000.000 de episodios muy graves de infección del tracto respiratorio inferior en niños de todo el mundo. Además se estimó que ocurrieron 265.000 muertes aproximadamente, el 99% en países en vías de desarrollo.

En EEUU las infecciones por VPIH se han considerado la segunda causa de infección respiratoria aguda del tracto respiratorio inferior en lactantes y niños preescolares (7) (84), después de las infecciones por VRS y por tanto responsables de una carga de enfermedad importante en la población infantil, al igual que ocurre en otros lugares como Corea (191).

En un estudio realizado por el nuevo centro de vigilancia de vacunas de EEUU, con un periodo de estudio de cuatro años, el 6,8% de la muestra de niños ingresados por fiebre o infección respiratoria (menores de cinco años de edad) pertenecía al grupo de infección por VPIH. La tasa anual promedio de hospitalizaciones por VPIH fue de 1,02 por 1.000 niños de 0-59 meses de edad, con la tasa más alta de 3,01 por 1.000 en niños de 0-5 meses de edad. Las tasas de hospitalización para cada tipo de VPIH fueron más altas en los niños más pequeños, con tasas de hospitalización para VPIH-3 (84) en general mayores que para VPIH-1 o VPIH-2 (5).

Abedi et al. (192) observaron que el 6,8% de las bronquiolitis que requirieron hospitalización en pacientes menores de dos años se asociaron a VPIH, siendo la mayoría producidas por el serotipo VPIH-3. El 47% de las laringitis que precisaron hospitalización se asociaron a VPIH, siendo el serotipo VPIH-1 el más frecuentemente detectado y afectando a los niños entre 1-2 años de edad con mayor frecuencia. El 5,5% de las hospitalizaciones por neumonía en menores de cinco años fueron atribuidas a VPIH, preferentemente al serotipo 3, con mayor incidencia entre 6-11 meses de edad.

En modelos animales de infección del tracto respiratorio inferior por VPIH se han mostrado cambios en la mecánica pulmonar e hiperreactividad bronquial. Se ha planteado la hipótesis de que las infecciones graves por VPIH en los niños pequeños pueden tener a veces efectos a largo plazo sobre la función pulmonar y la inmunidad (15). Niños que fueron seguidos a los años de haber tenido un episodio de laringitis demostraron tener más reagudizaciones bronquiales, es decir, una mayor hiperrespuesta bronquial. Es evidente que estos virus causan cambios inflamatorios agudos directamente en las vías respiratorias y también son capaces de inducir las respuestas inmunes y sistémicas que conducen a cambios pulmonares agudos (193).

La mortalidad inducida por VPIH es inusual en los países desarrollados y se observa casi en su totalidad en lactantes pequeños, inmunocomprometidos y ancianos. Sin embargo, la población preescolar en los países en vías de desarrollo tiene un riesgo considerable de infección grave e incluso muerte inducida por VPIH. Ya sea por enfermedad viral primaria o por facilitar infecciones bacterianas secundarias en niños desnutridos, la infección del tracto respiratorio inferior es responsable de un 25-30% de las muertes que ocurren en este grupo de edad, y VPIH al menos del 10% de estas infecciones (4).

Sin embargo la mayoría de las infecciones causadas por el VPIH son leves y por lo tanto se tratan de manera ambulatoria, no obteniéndose el diagnóstico etiológico, lo que indica que la carga o el impacto de esta infección está subestimada (7).

Aproximadamente el 10% de las infecciones del tracto respiratorio inferior tratadas ambulatoriamente están asociadas a VPIH.

### **1.8.2. Infección nosocomial**

Los hospitales, centros de salud y otras instituciones sanitarias, son lugares donde los virus respiratorios son frecuentemente transmitidos entre pacientes. Se ha calculado que los niños con infección por VPIH-3 pueden transmitir este virus al 20% de los niños que residen en la misma sala. De estos un tercio desarrollará síntomas respiratorios leves, pero alguno, si tiene patología subyacente grave (especialmente pulmonares, oncohematológicas), puede desarrollar infecciones graves del tracto respiratorio inferior e incluso fallecer (4).

La duración media de la hospitalización en los casos de infección nosocomial se incrementa en varios días, incluso para aquellos con síntomas leves, debido a las pruebas diagnósticas y terapias que se realizan a consecuencias de los nuevos signos y síntomas.

### **1.8.3. Impacto socioeconómico**

Las condiciones socioeconómicas dentro de un país constituyen en conjunto el determinante principal del coste final de la infección por VPIH. En las regiones en vías de desarrollo el principal coste de las infecciones respiratorias, también las debidas a los VPIH, está en las muertes atribuibles a las infecciones producidas por este virus. Por el contrario, en los países desarrollados, la mortalidad es inusual y el coste de las infecciones causadas por estos virus se debe principalmente a la utilización de recursos sanitarios (atención de la salud, hospitalización), pérdida de productividad para los padres y quizás las secuelas de las vías respiratorias a largo plazo en los niños. El tiempo perdido de un padre, tanto del trabajo como del hogar, secundario a infecciones por VPIH no ha sido cuantificado, pero es considerable también desde un punto de vista económico.

Las extrapolaciones basadas en hospitalizaciones hace dos décadas indican que el coste anual de la infección por VPIH-1 y VPIH-2 podría superar los 186 millones de dólares a nivel nacional en EEUU.

Otra estimación basada en un muestreo de una base nacional de datos, para la laringitis producida por VPIH-1 estimó un coste de 30 millones de dólares por epidemia de laringitis para ese país (194). Extrapolaciones separadas e independientes, utilizando datos más recientes del Hospital Infantil de Wisconsin (CHW), sugieren que el coste anual de las hospitalizaciones por

infecciones por VPIH en los EEUU supera los 200 millones de dólares. Además esta estimación no tiene en cuenta el número de infecciones respiratorias superiores causadas por estos virus, el hecho de que VPIH-3 causa estancias más largas y costosas que VPIH-1 y VPIH-2, o la carga económica de las infecciones por VPIH en adultos y pacientes inmunocomprometidos (4).





## **2. JUSTIFICACIÓN**



## **2. JUSTIFICACIÓN**

Las infecciones respiratorias en la población infantil son mayoritariamente de origen vírico, estando los virus parainfluenza humanos (VPIH) entre los posibles agentes etiológicos.

A pesar de que la epidemiología y la expresión clínica de las infecciones causadas por los VPIH no son tan conocidas como las causadas por otros virus como VRS o virus influenza, hay datos bibliográficos que refieren para las infecciones por VPIH una frecuencia nada desdeñable, una expresión clínica muy variable e incluso mortalidad elevada en pacientes con determinadas patologías de riesgo, dando lugar a un impacto socioeconómico y sanitario elevados.

Los VPIH han sido objeto de búsqueda (detección viral) en el laboratorio clínico durante décadas mediante el empleo de cultivos celulares y/o métodos inmunológicos. Sin embargo, el desarrollo y la rápida expansión de las nuevas técnicas diagnósticas de amplificación molecular (como la PCR) dotadas de una mayor sensibilidad y facilidad de uso, y su introducción en los hospitales solo desde años recientes, debe permitir contrastar, y en su caso consolidar y ampliar los conocimientos ganados en épocas previas sobre la epidemiología, carga de la enfermedad y espectro clínico de las infecciones causadas por estos virus.

Se han realizado pocos estudios centrados en VPIH en la infancia, cubriendo con frecuencia periodos de tiempo de estudio cortos por lo que no ofrecen una visión temporal longitudinal, siendo excepcionales en España y nulos en nuestro medio geográfico próximo.

Por todo lo expuesto, hemos estimado de interés desarrollar este proyecto de investigación traslacional que *a priori* deberá incrementar el cuerpo de conocimiento sobre estos virus y las enfermedades relacionadas con los mismos. Las conclusiones que se obtengan entendemos que justificarán también esta Tesis Doctoral.



### **3. HIPÓTESIS**



### **Hipótesis conceptual**

Los virus parainfluenza humanos presentan diferentes expresiones clínicas en el ámbito de la Pediatría, y la morbilidad que generan requiere hospitalizaciones. Sus serotipos muestran características epidemiológicas y clínicas diferenciales entre los mismos.

### **Hipótesis nula**

Los virus parainfluenza humanos no generan expresiones clínicas diferentes ni hospitalizaciones en Pediatría. Sus serotipos presentan características epidemiológicas y clínicas similares.

### **Hipótesis operativa**

Los virus parainfluenza humanos presentan características epidemiológicas y clínicas diferenciales con otros virus y son responsables de un número importante de hospitalizaciones. Los serotipos de virus parainfluenza humanos tienen características epidemiológicas y clínicas específicas.





## **4. OBJETIVOS**



## **4. OBJETIVOS**

### **Objetivos principales**

1. Describir las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones por los virus parainfluenza humanos en un espacio temporal prolongado, en un área geográfica determinada.
2. Describir las características clínicas y epidemiológicas de los cuatro serotipos de los virus parainfluenza humanos en el mismo periodo y área.

### **Objetivos secundarios**

1. Analizar los factores de riesgo asociados a la infección por los virus parainfluenza humanos.
2. Valorar el impacto de la infección por los virus parainfluenza humanos en el sistema sanitario hospitalario, mediante el estudio de la carga asistencial en Urgencias Hospitalarias y la incidencia de hospitalización en la infancia según la edad.
3. Establecer las tasas de hospitalización y la morbilidad según los diferentes serotipos de virus parainfluenza humanos.
4. Analizar la expresión clínica del serotipo 4 de los virus parainfluenza humanos y las diferencias respecto a los restantes serotipos de este grupo de virus.
5. Comparar la circulación de virus parainfluenza humanos respecto a otros virus respiratorios.
6. Describir las codetecciones virales que se asocian a las infecciones por VPIH y determinar si su asociación influye en la clínica.



## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. ÁMBITO DEL ESTUDIO

Gipuzkoa es un Territorio Histórico de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) que se localiza al norte de España y su capital es San Sebastián. Limita con el departamento francés de Pirineos Atlánticos por el noreste, Navarra al este, Vizcaya al oeste, Álava al suroeste y el golfo de Vizcaya al norte. Se halla situada en el extremo este del mar Cantábrico, en el golfo de Vizcaya, entre los 42° 53' 10" y los 43° 23' 45" de latitud norte y entre 1° 43' 45" y 2° 36' 7" de longitud oeste de Greenwich. Posee 92 km de costa. Tiene un área de 1.997 km<sup>2</sup>, cuenta con 88 municipios y una población de 710.699 habitantes (2016).

Gipuzkoa está dividida en siete comarcas: Bajo Bidasoa, Donostialdea, Tolosaldea, Goierri, Urola costa, Bajo Deba y Alto Deba (figura 5).

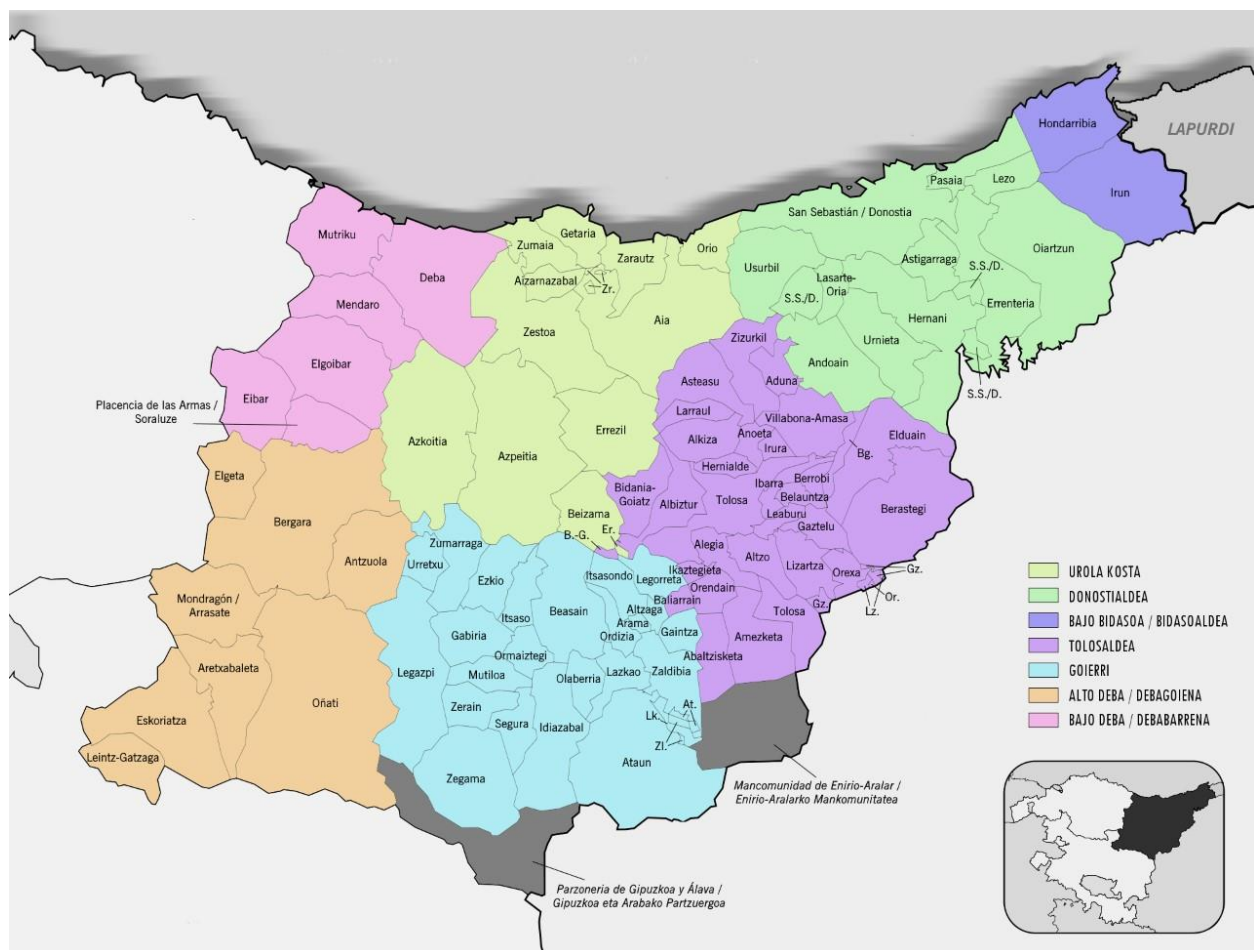


Figura 5.- Municipios y comarcas de Gipuzkoa.

Este proyecto de investigación se ha realizado en el área sanitaria dependiente del Hospital Universitario Donostia (HUD), que comprende las comarcas de Donostialdea, Tolosaldea y Urola Costa. El HUD es el hospital terciario de referencia en Gipuzkoa y único centro hospitalario que dispone de una Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP). El HUD atiende igualmente todas las hospitalizaciones procedentes de la comarca del Bidasoa puesto que su hospital comarcal (Hospital Bidasoa, Hondarribia) no cuenta con planta de hospitalización pediátrica. Esta área cuenta con 525.121 habitantes, lo que supone el 73,9% de la población total de Gipuzkoa y un 24,2% de la Comunidad Autónoma Vasca. En ocasiones, el HUD, también recibe ingresos por traslado de los otros tres hospitales comarcales, que son el Hospital de Zumárraga (Zumárraga), Hospital Alto Deba (Mondragón) y el Hospital de Mendaro (Mendaro), cuando se requiera el concurso de las especialidades pediátricas oportunas o la gravedad así lo estime.

## **5.2. DISEÑO DEL ESTUDIO**

### **5.2.1. Tipo de estudio**

Estudio no EPA (epidemiológico que no cumple las características de un Estudio Post-Autorización), retrospectivo y prospectivo, observacional, no intervención, por revisión de historias clínicas, que incluye los pacientes menores de 14 años de edad con infección respiratoria por VPIH detectado en el aspirado nasofaríngeo y/o frotis faríngeo, realizados en el HUD en el periodo comprendido desde el 1 de julio 2007 hasta el 31 de enero 2014 (estudio retrospectivo mediante revisión de historias clínicas) y desde el 1 de febrero de 2014 hasta el 30 de junio de 2016 (estudio prospectivo mediante una base de datos diseñada al efecto).

Una relación de niños con detección de VPIH fue obtenida de los registros informatizados del Servicio de Microbiología, comprobándose posteriormente cuántos de estos niños cumplían los criterios de inclusión. En el periodo de estudio prospectivo los niños fueron valorados tras su diagnóstico virológico, con la posibilidad de entrevistar a los pacientes si la revisión de historia clínica lo requería.

Para estudiar la frecuencia de las infecciones por VPIH en relación a las causadas por los restantes virus respiratorios se empleó una segunda relación que recogía todos los episodios investigados para virus respiratorios (VRS, influenza A y B, metapneumovirus humano, adenovirus, rinovirus, coronavirus y bocavirus humano) y su resultado, en niños de la misma edad y área geográfica atendidos durante el periodo de estudio en las diversas instalaciones dependientes del Servicio de Pediatría del HUD.



### 5.2.2. Selección de la población

Criterios de inclusión:

- Niños y niñas menores de 14 años.
- Confirmación virológica (detección de PCR positiva a VPIH en aspirado nasofaríngeo o frotis faríngeo).
- Muestras procesadas en el Laboratorio de Microbiología del HUD.
  - o Atendidos en la Sección de Urgencias de Pediatría o en la planta de hospitalización (Hospital de Día, Oncología Pediátrica, Cuidados Intensivos Pediátricos, Sección de Hospitalización y Sección de Neonatología) del HUD, así como de los Centros de Atención Primaria de las comarcas Donostialdea, Bidasoa, Tolosaldea y Urola Costa.

Criterios de exclusión:

- Las muestras obtenidas del mismo paciente en un plazo de ocho semanas, fueron consideradas formaban parte del mismo episodio, a no ser que los resultados indicaran una nueva infección respiratoria debida a un nuevo virus. La excreción de un mismo virus durante ocho semanas fue considerada siempre el mismo episodio.
- Para valoración epidemiológica: no cumplimiento de criterios de inclusión.
- Para valoración clínica, además de lo anterior, no disponer de los datos clínicos de las muestras positivas recogidas en el hospital de día, de otros hospitales no incluidos y de otros centros de salud.

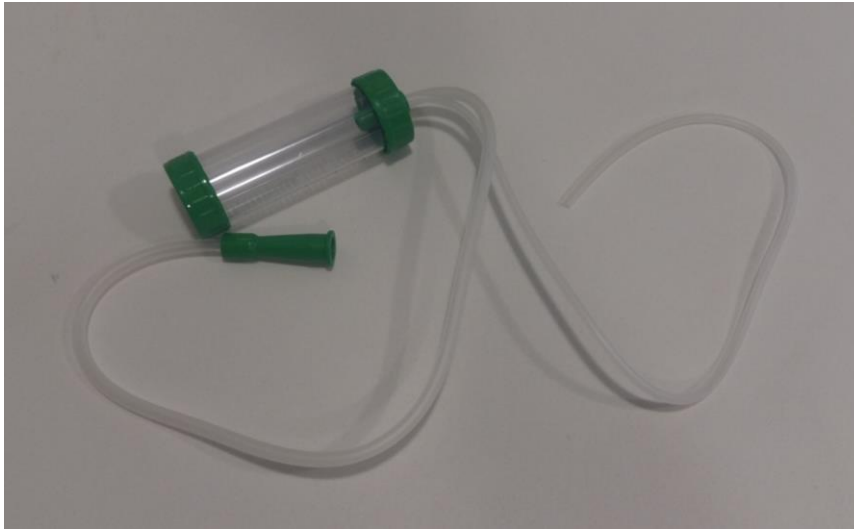
### 5.2.3. Toma y procesamiento de muestras

La toma de muestras se efectuó a través de aspirado nasofaríngeo o frotis faríngeo y se realizó con condiciones de asepsia, siempre con guantes estériles y mascarilla facial. La muestra fue obtenida por el pediatra o enfermería de Pediatría, tras su correcta instrucción, empleando un recipiente estéril con cierre hermético y convenientemente identificado (datos del paciente y tipo de muestra).

#### 5.2.3.1. Procedimiento para el aspirado nasofaríngeo

Las secreciones se aspiraron a través de un catéter conectado a un bote sellado del que sale otro catéter que se conecta a una fuente de vacío. El catéter se introdujo a través de una de las

fosas nasales hasta alcanzar la nasofaringe. En ese momento se aplica la aspiración (descubriendo el orificio en el catéter, realizándose así el vacío) y al mismo tiempo se va retirando el catéter lentamente con un movimiento de rotación. A continuación se introduce el catéter por la otra fosa nasal repitiendo el mismo procedimiento. Y finalmente se lava el catéter con 3 ml del medio de transporte o suero fisiológico y se cierra el bote con la consiguiente identificación de la muestra, fecha de recogida y datos del paciente.



**Figura 6.-** Material de aspirado nasofaríngeo.

#### **5.2.3.2. Procedimiento para el exudado faríngeo**

Se necesita un depresor lingual, un hisopo y el medio de transporte viral.

Con el paciente con la cabeza ligeramente hiperextendida o con el paciente en decúbito supino, bajo visión directa y con ayuda del depresor lingual, se toma la muestra haciendo rodar el hisopo sobre las criptas tonsilares y la faringe posterior, tocando en todas las zonas con exudado, membranas o inflamación. Debe evitarse tocar la mucosa oral, la lengua o la úvula. El hisopo se introduce en el tubo de ensayo (que contiene solución salina estéril), la parte del hisopo que contiene la muestra se mantiene dentro del tubo, el resto se corta y se desecha y el tubo se cierra perfectamente. Cada tubo se identifica con el nombre del paciente y la fecha de la recogida de la muestra. Los tubos con las muestras se mantienen a 4°C (o en la hielera con refrigerantes si van a ser transportados), hasta su procesamiento en el Laboratorio central con un plazo de entrega recomendado inferior a cuatro horas y un límite máximo de 24 horas.



**Figura 7.-** Hisopo y medio de transporte para virus.

#### **5.2.3.3. Envío al Laboratorio**

Cuando las muestras se recogen en las diferentes Unidades asistenciales del Servicio de Pediatría se envían a través de un tubo neumático al Laboratorio central del Servicio de Microbiología del HUD.

Si las muestras se obtienen en los Centros de Atención Primaria, el envío se realiza en vehículo de transporte *ad hoc*.

#### **5.2.3.4. Procesamiento de la muestra**

El ADN y ARN viral se obtuvieron con el extractor automático BioRobot® M48 (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) utilizando el kit MagAttact® Virus Mini M48, hasta el año 2007 y a partir del año 2008 empleando el equipo NucliSens en el extractor automático EasyMAG (BioMérieux, Marnes-la-Coquette, France).

La transcripción de ARN en cADN se realizó con la retrotranscriptasa inversa M-MuLV (Promega, Madison, WI) usando cebadores aleatorios. En cada tanda de pruebas de PCR se introdujo un control negativo (control de agua) que se trata idénticamente a la muestra original. Todos los procedimientos fueron ejecutados siguiendo las recomendaciones establecidas para evitar contaminaciones. Se utilizaron cuatro métodos diferentes de PCR multiplex para investigar la presencia de los siguientes virus:

- Virus parainfluenza tipos 1-4 (195)
- Virus influenza (genes de las nucleoproteínas A, B y C (195) y de las hemaglutininas H1 y H3 (196))

- Virus respiratorio sincitial A y B (196)
- Coronavirus empleando un juego para “pan-coronavirus” (197) y otro específico del coronavirus NL63 (198)

La presencia de MPVH (199) y rinovirus (200) se investigó mediante métodos de PCR anidada y la presencia de adenovirus (201) y el gen de la matriz del virus influenza A (202), utilizando un método de PCR. El bocavirus humano (HBoV) se detectó con técnicas de PCR, utilizando sondas derivadas del gen NP1 (203) con la subsiguiente investigación de la presencia del gen VP1 en muestras positivas (técnica de confirmación) (204).

Desde julio de 2012 estas técnicas caseras fueron sustituidas por técnicas comerciales en tiempo real multiplex, concretamente Luminex xTAG Respiratory viral panel™ (USA) hasta julio 2013 y Seegene Anyplex™ II RV16 /Allplex™ Respiratory Panel (Korea) desde entonces hasta el final del estudio. Estos reactivos permiten la detección agrupada en un ensayo multiplex de todos los virus antes referidos, incluyendo los cuatros tipos de VPIH. Las distintas PCRs se efectuaron en los correspondientes termocicladores validados (figura 8).



**Figura 8.-** Termociclador CFX96 (BioRad) empleado en pruebas de PCR en tiempo real multiplex.

Además de los métodos moleculares, hasta el año 2014 se investigó la presencia de los virus respiratorio sincitial, influenza A y B, parainfluenza 1-3 y adenovirus mediante el empleo de una técnica de *Shell-vial*, que fue abandonada en ese año debido a su menor rendimiento.

### 5.2.3.5. Interpretación de los resultados

Los resultados virológicos fueron interpretados por personal facultativo experto del Servicio de Microbiología del HUD.

### 5.2.3.6. Instalaciones especiales y equipos de investigación

El Laboratorio del Servicio de Microbiología del HUD posee la infraestructura e instalaciones necesarias para el procesamiento y manipulación de las muestras biológicas y sus derivados, cumpliendo las condiciones de bioseguridad en el trabajo.

Para el trabajo de virología convencional dispone de congeladores a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la conservación de las muestras y de líneas celulares de cultivo viral, campanas de seguridad biológica para el procesamiento de muestras biológicas contaminadas y la preparación de medios de cultivo viral, manejo de líneas celulares y equipo de fluorescencia para cultivo de virus respiratorios.

Además, dispone de infraestructura adecuada para el desarrollo de técnicas moleculares con salas independientes, dotadas de gradientes de presión para manejo de muestras, preparación de reactivos, reacciones de amplificación, detección de productos de PCR y aparatos especiales como: lector de ADN (NanoDrop 1000<sup>TM</sup>), termocicladores convencionales (Applied ByoSystems<sup>TM</sup>), cubetas y fuentes de alimentación para realización de electroforesis en gel de agarosa, Light-Cycler<sup>TM</sup> (Roche) y CFX<sup>TM</sup> (Bio-Rad) para realización de PCR en tiempo real, extractores automáticos de ácidos nucleicos (EasyMag<sup>TM</sup>, BioMerieux) (figura 9), etc.



**Figura 9.-** Extractor de ácidos nucleicos Easy-MAG.

También dispone del aparataje necesario y común a otras técnicas como baños de agua, agitadores-vortex, centrífugas refrigeradas, neveras, estufas, microscopios, soporte informático adecuado para el registro de resultados, etc.

### 5.3. DATOS CLÍNICOS Y DEFINICIONES

#### 5.3.1. Variables epidemiológicas

##### Temporada

Debido a la estacionalidad invernal de los principales virus respiratorios (VRS, gripe), los periodos anuales se definieron como “temporadas de estudio”, correspondiendo cada temporada a un año, abarcando el periodo comprendido entre 1 de julio de un año y 30 de junio del año siguiente (tabla 4).

**Tabla 4.-** Definición de temporadas durante el periodo de estudio

Temporada	Fecha
1	01/07/2007-30/06/2008
2	01/07/2008-30/06/2009
3	01/07/2009-30/06/2010
4	01/07/2010-30/06/2011
5	01/07/2011-30/06/2012
6	01/07/2012-30/06/2013
7	01/07/2013-30/06/2014
8	01/07/2014-30/06/2015
9	01/07/2015-30/06/2016

##### VARIABLES DEL PACIENTE

- Edad. Se recogió la edad en meses que presentaban los pacientes y se realizó una división por subgrupos para el análisis de los datos:

- < 6 meses
  - 6-11 meses
  - 12-23 meses
  - 24-59 meses
  - $\geq$  60 meses
- Antecedentes gestacionales. Se consideró prematuridad/pretérmino a los niños nacidos antes de la semana 37 de gestación y postérmino a los nacidos después de la semana 42 de gestación.
  - Patología previa. Se recogieron los antecedentes personales patológicos, encuestando siempre neumopatía, cardiopatía, enfermedad neurológica o inmunodeficiencia.
    - Asma: cuando el diagnóstico médico constaba en la historia clínica o cuando la anamnesis era compatible con esta definición (según GEMA).
    - Bronquiolitis: primer episodio de dificultad respiratoria aguda, con disnea espiratoria y con crepitantes/sibilancias, en el contexto de un proceso catarral, en menores de dos años.
  - Tabaquismo pasivo: exposición al humo del tabaco en domicilio.
  - Hermanos: existencia y el número de hermanos.
  - Escuela/guardería: asistencia a guardería o escuela.
  - Lactancia materna: lactancia materna exclusiva al menos cuatro meses.
  - Calendario vacunal y administración de la vacuna neumocócica (VANC): estado de vacunación en el momento del episodio así como de la vacuna antineumocócica conjugada 7-valente, 10-valente y/o 13-valente.

### 5.3.2. Variables clínico-analíticas

- Fecha de recogida de la muestra nasofaríngea.
- Detección: resultado positivo de PCR de VPIH en aspirado y/o frotis nasofaríngeo.
  - VPIH único, detección única de VPIH en la muestra nasofaríngea (aspirado y/o frotis).

- VPIH múltiple, detección de VPIH y otros virus respiratorios en la muestra nasofaríngea (aspirado o frotis).
- Infección: resultado positivo en la muestra nasofaríngea con expresión clínica compatible.
- Episodio: contexto clínico en el que tiene lugar la detección de VPIH en muestra nasofaríngea.
- Síntomas relacionados, tales como fiebre (valor máximo y su duración), definida como temperatura rectal  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  o axilar  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ ; cuadro catarral; dificultad respiratoria, entendida como taquipnea (frecuencia respiratoria en función de cada edad) y tiraje supraesternal y/o subcostal y/o intercostal; tos; estridor; broncoespasmo, entendido como espiración alargada y/o sibilancias y/o disminución de la entrada de aire bilateral; vómitos; apnea; convulsión.
- Días totales de fiebre: la duración total de la fiebre de todos los pacientes ingresados, incluyendo los días de fiebre previos al ingreso.
- Días totales de antibioticoterapia: los días totales de tratamiento antibiótico que han recibido los pacientes analizados con infección respiratoria asociada a VPIH.
- PCR elevada, PCR sanguínea mayor de 40 mg/dL.
- Leucocitosis, número absoluto de leucocitos superior a 14.000/ $\mu\text{L}$ .
- Neutrofilia, número absoluto de neutrófilos superior a 10.000/ $\mu\text{L}$ .
- Los hallazgos radiológicos se clasificaron en condensaciones alveolares, infiltrados intersticiales y atrapamiento aéreo.

### 5.3.3. Variables del ingreso

- Fecha de ingreso en planta de hospitalización, y en caso de ingreso en la UCIP su fecha correspondiente, y días de hospitalización.
- Motivo de ingreso.
- Días de fiebre en total.
- Oxigenoterapia, ventilación mecánica invasiva o no invasiva.
- Antibioterapia, el tipo de antibiótico y los días de tratamiento.
- Diagnósticos al alta (se englobaron dentro del término asma las reagudizaciones/crisis asmáticas y las bronquitis sibilantes recurrentes o asma del lactante).
- Infección nosocomial: detección de VPIH en muestra nasofaríngea tras 72 horas del ingreso en pacientes previamente asintomáticos o con muestra previamente negativa.



## 5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables se recogieron en una base de datos diseñada al efecto con el programa Microsoft Access™.

Previamente a realizar el análisis estadístico, se depuró la base de datos para evitar incongruencias y se realizó el test de Kolmogorow-Smirnov con corrección de significación de Lilliefors para las variables cuantitativas, para comprobar si cumplían una distribución normal.

Las variables cuantitativas continuas de distribución normal se presentan como media y desviación estándar de la media, y las que no presentaron una distribución normal como mediana y rango. Las variables categóricas se han descrito en proporciones.

La comparación de las medias de una variable cuantitativa de distribución normal en dos grupos independientes se realizó con la prueba de t de Student, y cuando la variable no siguió una distribución normal se utilizó la prueba estadística U de Mann Whitney. Para la comparación de las medias de una variable cuantitativa en más de dos grupos independientes de distribución normal se realizó el análisis de la varianza ANOVA, y cuando la variable no siguió una distribución normal se utilizó el test de Kruskal Wallis.

Para la comparación de proporciones de una variable cualitativa de grupos independientes se realizó el test Ji cuadrado de Pearson o la prueba exacta de Fisher.

Para medir el efecto de varias variables independientes sobre una variable dependiente, se empleó el análisis multivariante. Aquellas variables que presentaron en el análisis univariante un valor de  $p < 0,20$  fueron introducidas en un análisis multivariante utilizando la prueba de regresión logística binaria. Se utilizó el odds ratio (OR) para estimar el riesgo con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

Los datos se procesaron mediante el paquete estadístico SPSS 23®. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

Para describir la frecuencia de la infección por VPIH con respecto a las causadas por los otros virus respiratorios (listado 2, punto 5.2.1) se efectuó un conteo de los episodios causados por los diferentes virus en relación al mes/año de ocurrencia así como a la edad. Por último, para el estudio de incidencia de hospitalización se incluyeron los niños habitantes en las poblaciones de las comarcas Donostialdea, Bidasoa, Tolosaldea y Urola Costa, empleándose como denominadores los correspondientes a su edad obtenidos del Censo de población de 2011 (Instituto Vasco de Estadística/EUSTAT).

## 5.5. BIBLIOGRAFÍA

Se realizó una revisión académica de la literatura seleccionada, utilizando entre otros los descriptores siguientes: “human parainfluenza virus”, “infant”, “children”, “laringitis”, “multiple viral respiratory infections”, “hospitalizations for parainfluenza virus”, “epidemiology”, “viral diagnostic tests”, entre otros.

La revisión bibliográfica se acotó inicialmente a los últimos cinco años, revisando a partir de ella la bibliografía anterior más relevante.

Para el manejo de las citas bibliográficas se utilizó la aplicación Mendeley®, que permite gestionar y compartir referencias bibliográficas y documentos de investigación. El diseño de las referencias bibliográficas es el procedimiento automático por dicha aplicación.

## 5.6. ASPECTOS ÉTICOS

Este proyecto de Investigación fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del HU Donostia, de acuerdo a la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, Principios Éticos de la declaración de Helsinki y resto de principios éticos aplicables con el código de protocolo NEH-VIP--2016-01 (Anexo 1).

Los datos personales de los sujetos incluidos son confidenciales y se recogieron en una base de datos diseñada para este estudio. Los datos se almacenaron de forma disociada y exclusivamente el investigador principal ha tenido acceso a ellos. Las identidades de los pacientes se mantuvieron anónimas durante la realización del estudio de acuerdo con la vigente Ley de Protección de Datos de Carácter Personal (L.O.P.D. 15/9 1999 de 13 de diciembre de 1999).

La investigadora principal, Nerea Echeverría Hernando, y los codirectores de esta Tesis Doctoral, Eduardo González Pérez-Yarza y Carlos Gustavo Cilla Eguiluz, declaran no tener conflicto de intereses en ninguno de los aspectos contenidos en esta memoria científica.

## **6. RESULTADOS**

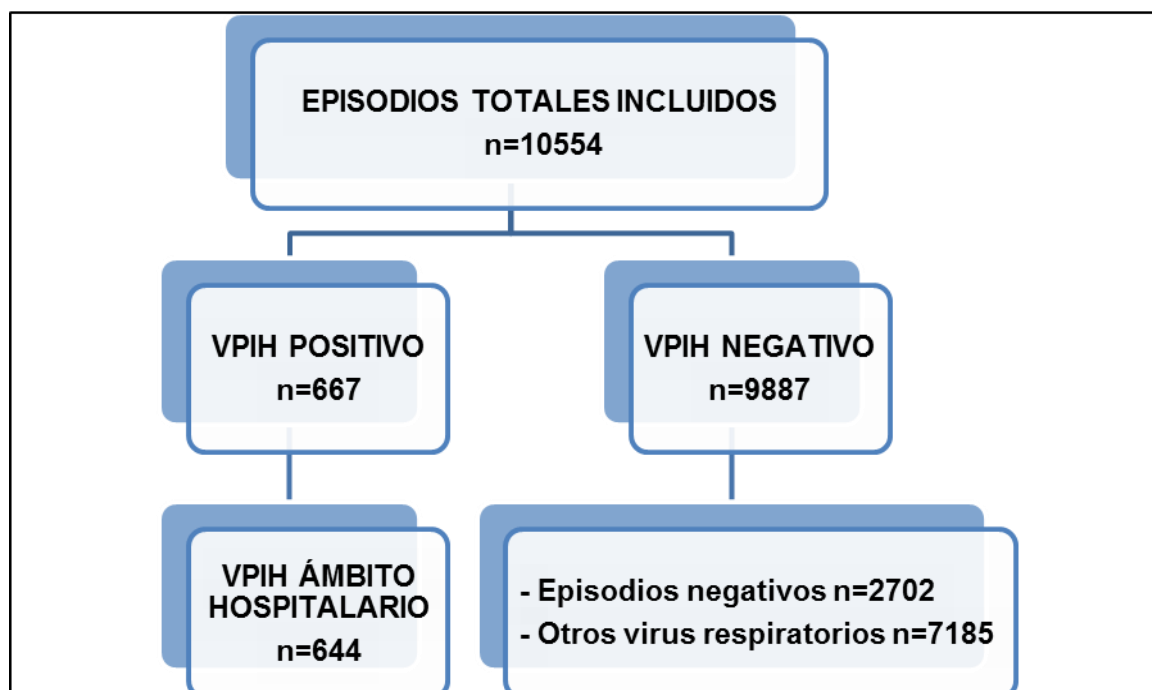


## **6. RESULTADOS**

### **6.1. EPIDEMIOLOGÍA GENERAL**

#### **6.1.1. Circulación de virus parainfluenza humanos en relación a otros virus respiratorios**

En el periodo analizado (1-julio-2007 a 30-junio-2016), en las diversas instalaciones del Servicio de Pediatría del área de estudio, se recogieron muestras de exudado o aspirado nasofaríngeo de 10.554 episodios mayoritariamente de pacientes con infección respiratoria aguda, que fueron remitidas para estudio virológico al Laboratorio de Microbiología del HUD. Se detectó algún virus respiratorio en 7.852 episodios (74,4%) y VPIH en 667 (6,3%) (figura 10), siendo la información procedente de todos ellos empleada en el estudio epidemiológico. Seis cientos cuarenta y cuatro episodios procedieron del ámbito hospitalario y fueron utilizados en el estudio clínico (ver apartado 6.2; figura 27).



**Figura 10.-** Diagrama de flujo de los episodios analizados en el periodo de estudio.

Como se expone en la tabla 5 (figura 11), el grupo de virus que más frecuentemente se detectó fue *picornavirus* (rinovirus y enterovirus) en el 38,5% de los episodios investigados, representando el 51,8% de los virus encontrados, seguido de VRS que se detectó en el 20,5%

de los casos y supuso el 27,6% de los virus detectados, y de virus influenza A (8,6% y 11,6% respectivamente).

Los VPIH, como se ha dicho con anterioridad, representaron el 6,3% de los casos investigados (el 8,5% del total de virus respiratorios detectados), sin variaciones importantes en las distintas temporadas (anexo II), oscilando entre un máximo de 13,8% (quinta temporada del estudio, julio 2011-junio 2012) y un mínimo de 8,8% (primera temporada, julio 2007-junio 2008).

La cifra global de VPIH fue similar a la de adenovirus y bocavirus, y superior a la de metapneumovirus, influenza B y coronavirus.

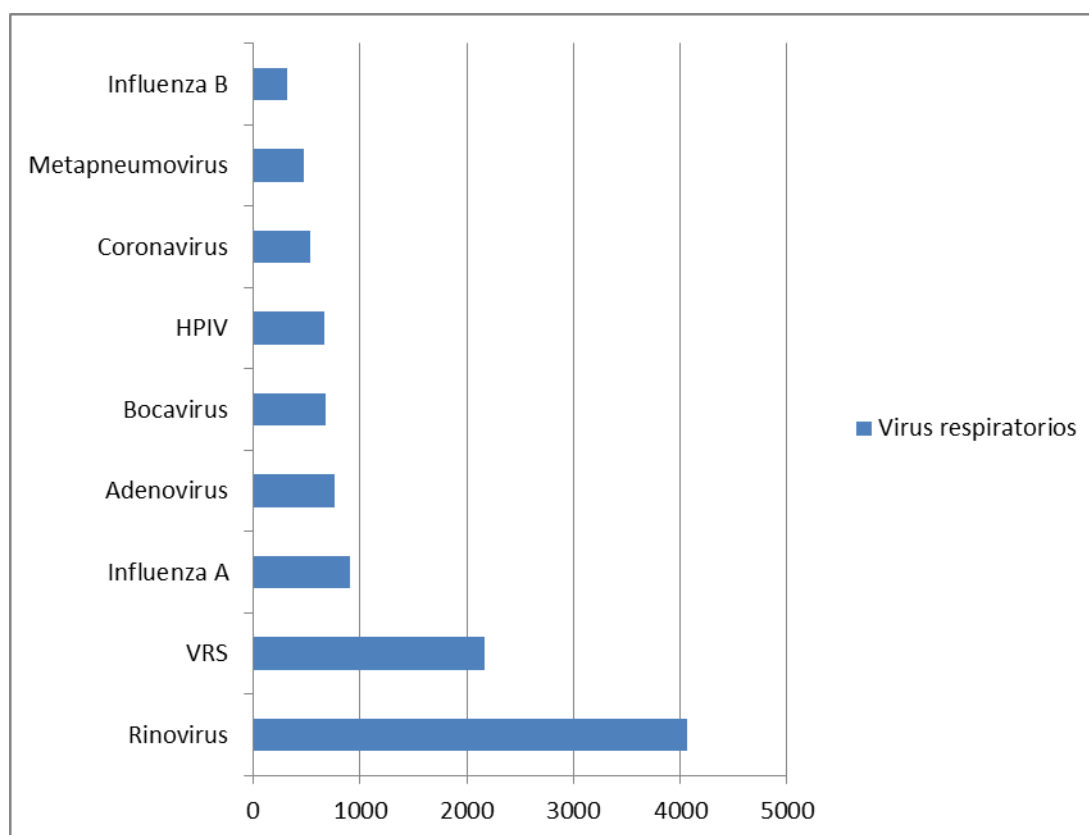
**Tabla 5.-** Virus respiratorios detectados en los distintos episodios durante el periodo de estudio.

<b>Virus respiratorios (n=10.554)</b>	<b>Casos</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Porcentaje relativo<sup>1</sup></b>
Rinovirus <sup>2</sup>	4.065	38,5	51,8
VRS	2.164	20,5	27,6
Influenza A	908	8,6	11,6
Adenovirus	764	7,2	9,7
Bocavirus	677	6,4	8,6
VPIH	667	6,3	8,5
Coronavirus	540	5,1	6,9
Metapneumovirus	474	4,5	6,0
Influenza B	317	3,0	4,0
Negativo	2.702	25,6	-

VRS: virus respiratorio sincitial. VPIH: virus parainfluenza humano.

<sup>1</sup>Porcentaje relativo, respecto al total de virus detectados.

<sup>2</sup>En el periodo trabajado entre julio de 2012 y junio de 2013 (técnica Luminex), un pequeño porcentaje de estos virus puede corresponder a enterovirus. En el resto de periodos solo se detectaron rinovirus (por tanto de la cifra total de picornavirus, más del 95% del total de 4065 correspondieron a rinovirus).



**Figura 11.-** Distribución de los virus respiratorios durante el periodo de estudio.

Se detectó un único virus en 5.597 casos analizados y detecciones múltiples (dos o más virus) en 2.255 casos (anexo IIIA y IIIB), lo que representa un 28,7% del total de casos positivos y un 21,4% de los casos investigados.

Como se muestra en la tabla 6, el porcentaje de casos con detección de más de un virus osciló considerablemente para los diferentes virus estudiados, siendo elevado para todos ellos. Virus influenza presentó el menor porcentaje en detecciones múltiples y el más elevado bocavirus, seguido de adenovirus y coronavirus. La proporción de detecciones múltiples, en el caso de VPIH, se situó en una posición intermedia, más próxima a rinovirus, VRS y metapneumovirus.

**Tabla 6.-** Distribución de las detecciones únicas y múltiples durante el periodo de estudio.

Virus respiratorios		Casos	Porcentaje
Rinovirus	Único	2.421	59,6
	Múltiple	1.644	40,4

VRS	Único	1.211	56,0
	Múltiple	953	44,0
Influenza A	Único	652	71,8
	Múltiple	256	28,2
Adenovirus	Único	198	25,9
	Múltiple	566	74,1
Bocavirus	Único	107	15,8
	Múltiple	570	84,2
VPIH	Único	312	46,8
	Múltiple	355	53,2
Coronavirus	Único	177	32,8
	Múltiple	363	67,2
Metapneumovirus	Único	267	56,3
	Múltiple	207	43,7
Influenza B	Único	252	79,5
	Múltiple	65	20,5

VRS: virus respiratorio sincitial. VPIH: virus parainfluenza humano.

Al igual de lo que ocurrió con rinovirus (presente en el 100% de los meses estudiados), y en menor medida con adenovirus (presente en el 88% de los meses estudiados), la circulación de VPIH fue continua, siendo detectado en 107 de los 108 (99,1%) meses del periodo de estudio (anexo IV).

Otros virus respiratorios, como VRS, metapneumovirus y virus influenza A y B presentaron una circulación más polarizada o epidémica, estando presentes en el 72%, 66%, 37% y 31% de los meses estudiados respectivamente (figura 11) y concentrándose el 90% de sus detecciones en 3-4 meses cada año.

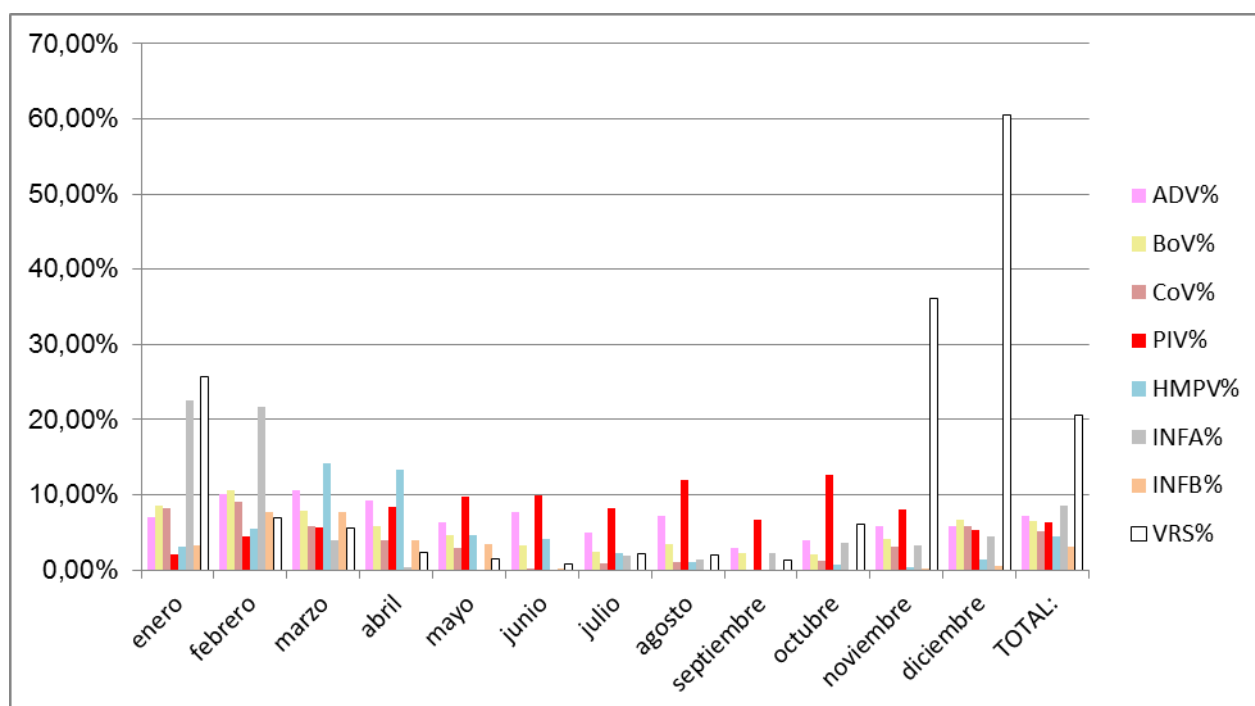
VRS presentó circulación epidémica habitualmente en el trimestre noviembre-enero, virus influenza A en dos de los meses comprendidos en el trimestre diciembre-febrero, observándose circulación de virus influenza B ligeramente retrasada en relación a la de influenza A (3-4



semanas) (anexo V). La circulación de metapneumovirus se observó algo más retrasada, detectándose con mayor frecuencia en marzo (figura 12).

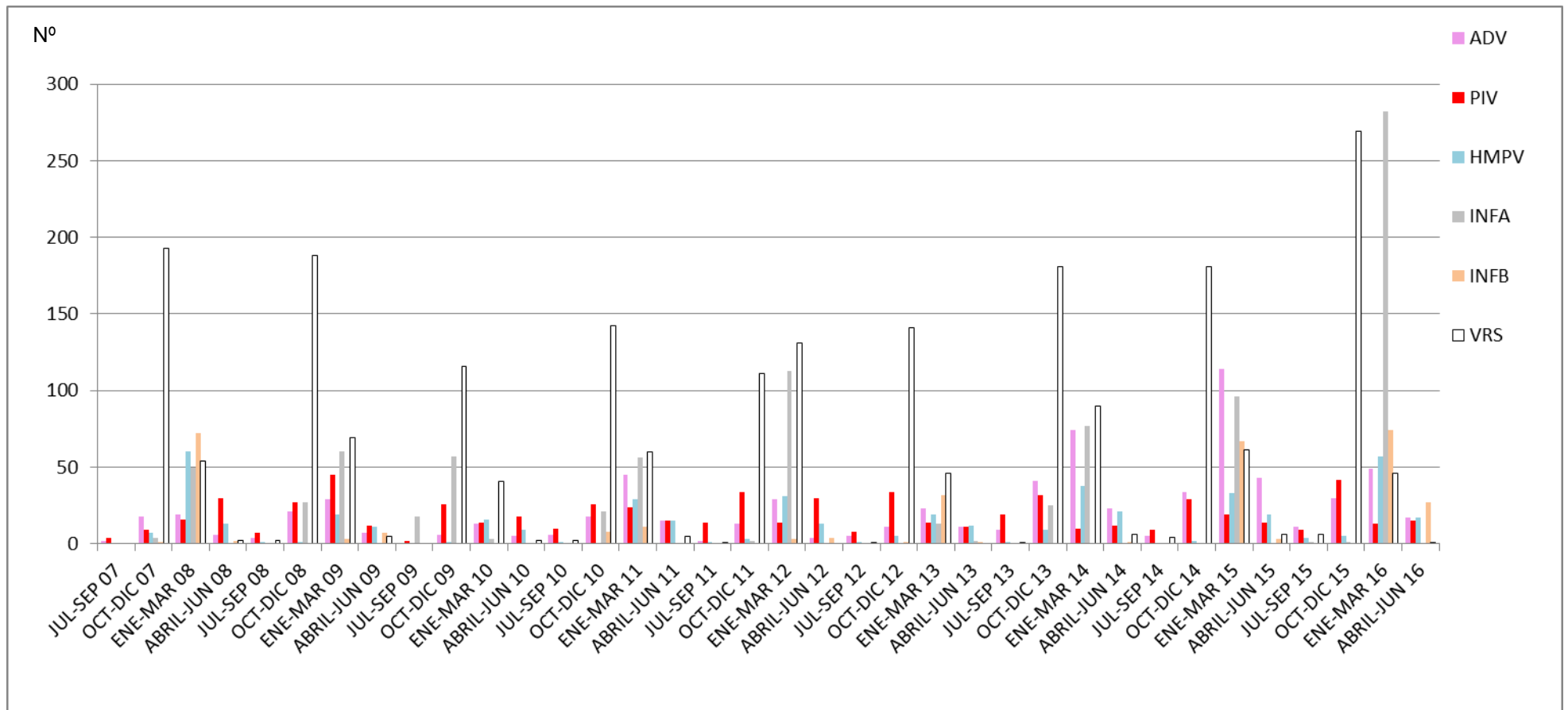
En relación a VPIH se constataron periodos de intensificación de la circulación en los nueve años del estudio, observándose oscilaciones menos acusadas que en otros virus. En concreto, se observaron aumentos de detecciones de VPIH en primavera y/u otoño, en varios años en ambos periodos, a diferencia de los virus antes referidos, en los que puede observarse una única onda epidémica anual, normalmente invernal.

Excluyendo rinovirus que fue el virus respiratorio ampliamente dominante durante casi todo el año, VPIH fueron los virus dominantes durante el semestre del año comprendido entre mayo y octubre. Concretamente lo fueron en 12 de los 18 trimestres de los periodos (de primavera y verano) (66,6%) que cubre este estudio, en los que el porcentaje mensual de resultados positivos a estos virus osciló entre el 6,6 y el 12,7% (media 9,8%) (figura 13).



**Figura 12.-** Distribución por meses de los virus respiratorios detectados en los distintos episodios durante el periodo de estudio.

ADV: adenovirus, BoV: bocavirus, CoV: coronavirus, PIV: parainfluenza, HMPV: metapneumovirus, INFA: influenza A, INFB: influenza B, VRS: virus respiratorio sincicial. Se ha excluido de la gráfica rinovirus para poder apreciar con claridad los datos del resto de los virus respiratorios investigados.



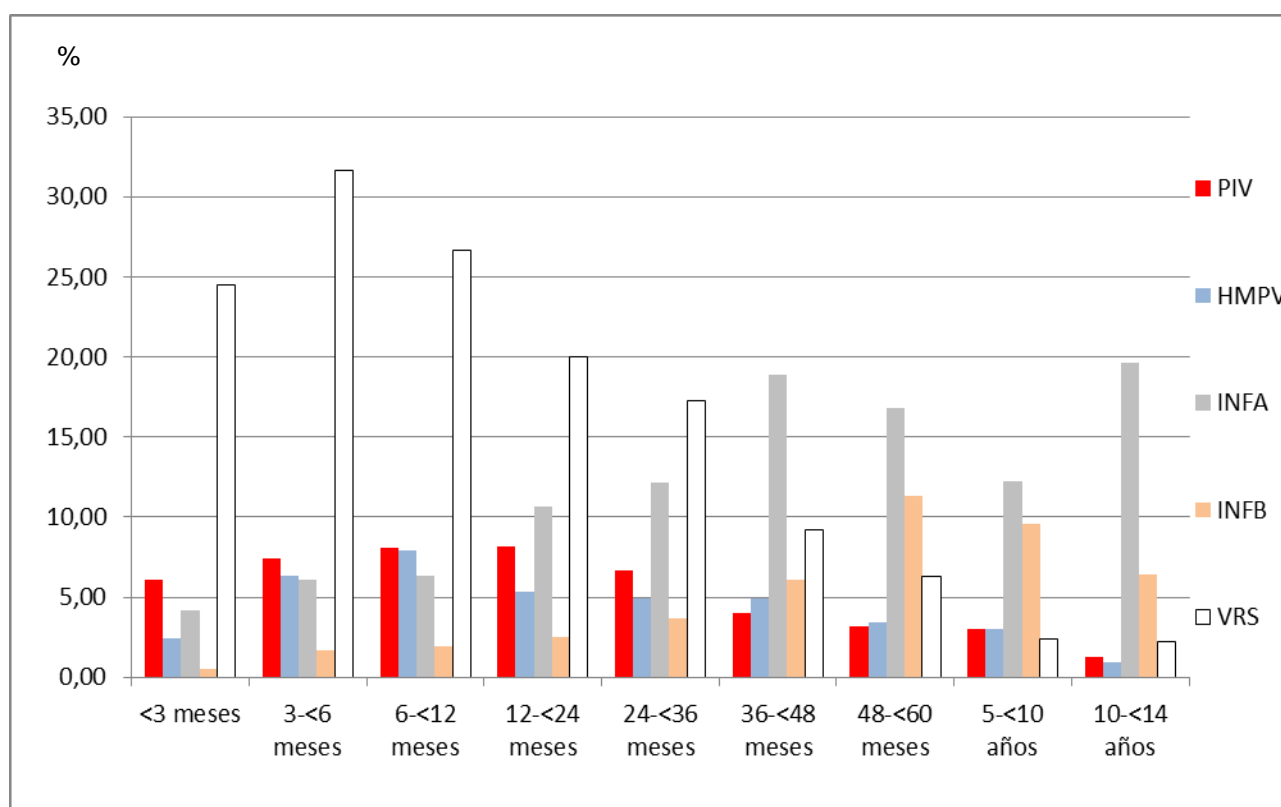
**Figura 13.-** Distribución por trimestres de los virus respiratorios detectados en los distintos episodios durante el periodo de estudio.

ADV: adenovirus, PIV: parainfluenza, HMPV: metapneumovirus, INFA: influenza A, INFB: influenza B, VRS: virus respiratorio sincitial. Se ha excluido de la gráfica rinovirus para poder apreciar con claridad los datos del resto de los virus respiratorios investigados.

En los pacientes menores de tres años de edad (y en los diferentes tramos de edad considerados en este grupo), los VPIH se detectaron en el 6-8% de los episodios investigados (figura 14) (anexo VI), disminuyendo su frecuencia de detección a partir de esa edad, siendo el porcentaje de detección en los niños mayores de tres años menor al 5%.

Exceptuando rinovirus que fue claramente más frecuente en todas las franjas de edad, VPIH fue, tras VRS, el virus más frecuentemente detectado en los menores de doce meses de edad.

La distribución de los VPIH fue similar a la de metapneumovirus humano en casi todos los tramos de edad considerados, aunque el porcentaje de detección fue algo mayor para VPIH en los pacientes menores de 36 meses de edad y muy superior en los menores de tres meses. La forma de la gráfica de VRS fue también similar, pero con porcentajes superiores en relación a VPIH y metapneumovirus humano. Por el contrario los virus influenza fueron detectados más frecuentemente en niños de mayor edad, rebasando influenza A a los VPIH en el segundo año de vida, y a partir de los 36 meses en el caso del virus influenza B, alcanzando este último virus porcentajes próximos al 10% en niños de 4-10 años de edad.



**Figura 14.-** Distribución por grupo de edad de los virus respiratorios detectados en los distintos episodios durante el periodo de estudio.

PIV: parainfluenza, HMPV: metapneumovirus, INFA: influenza A, INFB: influenza B, VRS: virus respiratorio sincitial. Se ha excluido de la gráfica rinovirus para poder apreciar con claridad los datos del resto de los virus respiratorios investigados.

## 6.1.2. Datos generales de VPIH

### 6.1.2.1. Distribución global por sexo y edad

La cohorte fue constituida por 667 episodios de VPIH, de los cuales el 58,3% (n=389) ocurrieron en varones y el 41,7% (n=278) en mujeres. La mediana de edad fue de 8 meses (rango: 0-177). Los 667 episodios correspondieron a 653 personas distintas, ocurriendo dos episodios en trece personas, y detectándose tres episodios de VPIH en una persona durante el periodo de estudio. La distribución en los grupos de edad considerados (Material y Métodos, apartado 5.3.1 pag 96-97) de los 667 episodios en los que se detectó VPIH puede observarse en la tabla 7.

**Tabla 7.-** Distribución de la cohorte VPIH por grupos de edad.

Edad en meses	Casos investigados	VPIH	Porcentaje	Porcentaje relativo <sup>1</sup>
< 6	4.336	282	6,5	42,3
6-11	1.656	132	8	19,8
12-23	1.617	131	8,1	19,6
24-59	1.722	91	5,3	13,6
≥ 60	1.175	31	2,6	4,7
Total	10.506 <sup>2</sup>	667	6,3	100

<sup>1</sup> Porcentaje relativo, respecto al total de virus parainfluenza detectados.

<sup>2</sup> 48 episodios de edad desconocida.

### 6.1.2.2. Distribución anual y estacional de los casos de VPIH

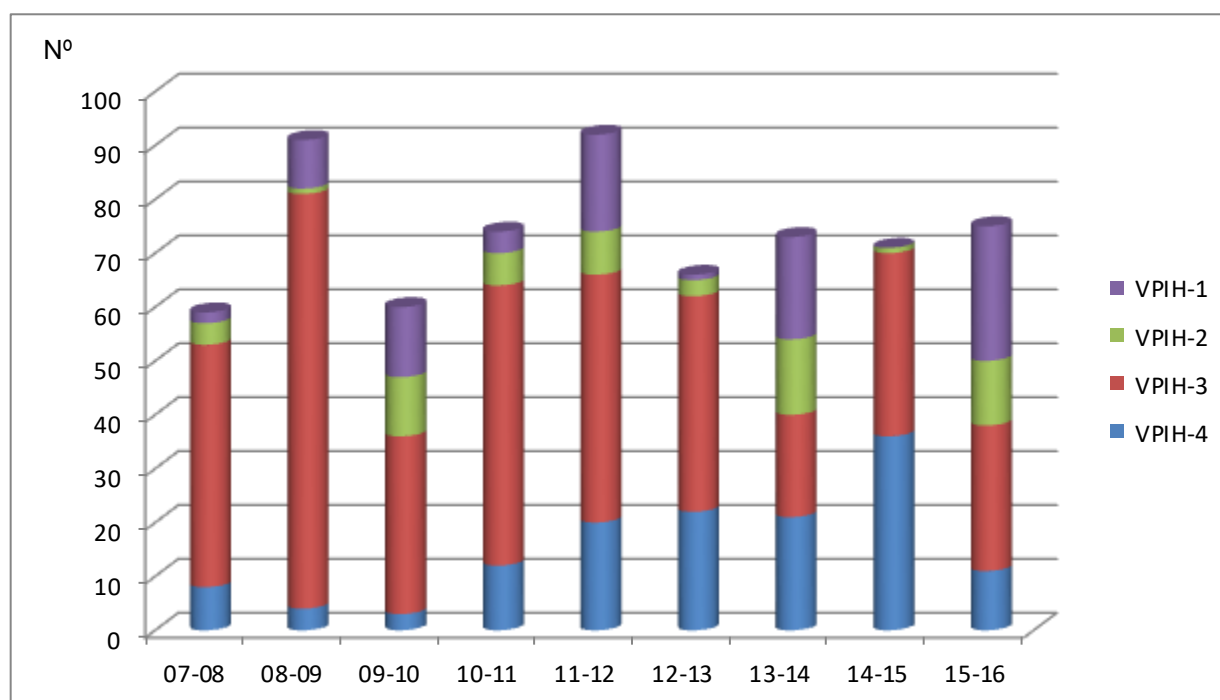
En cada temporada (cada temporada agrupa los resultados de 12 meses, definidas en Material y Métodos apartado 5.3.1, tabla 4) se registró un número de casos similar, con pocas oscilaciones (rango: 59-92), destacando las temporadas 2008-09 y 2011-12, en las que se registró un número de casos ligeramente superior (91 y 92 casos, respectivamente) (tabla 8). Los porcentajes anuales de positividad y los porcentajes relativos (respecto al total de VPIH detectados en el periodo de estudio) oscilaron poco (4,8-8,7% y 8,8-13,8%, respectivamente). En la figura 15 se puede observar la distribución de los cuatros serotipos en cada temporada,

siendo predominante el serotipo VPIH-3 en todas las temporadas, excepto la temporada 13-14, donde la distribución de los serotipos fue más homogénea.

**Tabla 8.-** Distribución de la cohorte VPIH global por temporadas.

Temporadas	Nº de episodios	Casos	Porcentaje	Porcentaje relativo <sup>1</sup>
2007-2008	1.071	59	5,5	8,9
2008-2009	1.046	91	8,7	13,6
2009-2010	873	60	6,9	9,0
2010-2011	1.283	75	5,8	11,3
2011-2012	1.228	92	7,5	13,8
2012-2013	975	67	6,9	10,1
2013-2014	1.115	73	6,5	10,9
2014-2015	1.332	71	5,3	10,6
2015-2016	1.631	79	4,8	11,8
Total	10.554	667	6,3	100

<sup>1</sup>Porcentaje relativo, en relación al total de VPIH detectados.



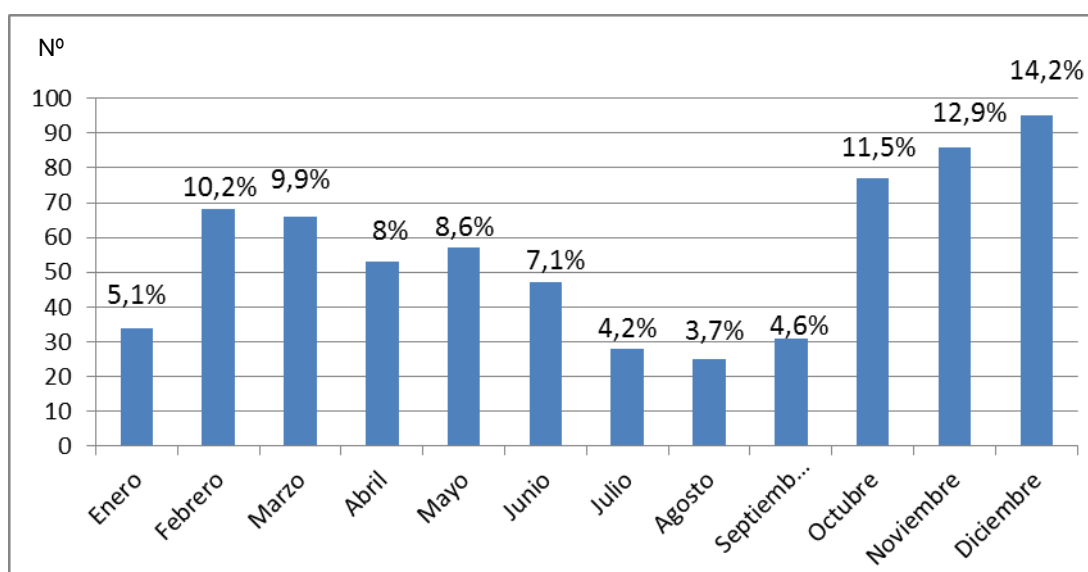
**Figura 15.-** Distribución de los serotipos de VPIH en cada temporada del periodo de estudio.

En las cuatro estaciones del año se detectó un número importante de infecciones por VPIH. El número de casos detectados en la estación en la que se detectaron más infecciones (otoño, n=242) no llegó a triplicar el número de casos en la estación en la que se detectaron menos (verano, n=88). El número de casos detectados en primavera (n=163) e invierno (n=174) se situó en una zona intermedia y fue entre sí similar (tabla 9).

**Tabla 9.-** Distribución estacional de la cohorte VPIH global.

Estación	Casos	Porcentaje
Primavera	163	24,4
Verano	88	13,2
Otoño	242	36,3
Invierno	174	26,1
Total	667	100

Se detectaron VPIH todos los meses del año, en número importante, siendo los meses en que más casos se detectaron diciembre (n=95) y noviembre (n=86) respectivamente, y agosto el mes en que menos (n=25) (figura 16). El porcentaje de resultados positivos osciló de manera importante en los diferentes meses del año, situándose entre 2% en enero (34/1.667) y 12,7% en octubre (79/621), una variación muy superior a la observada en la frecuencia media mensual de detecciones (anexo IV), y que está probablemente influenciada por la circulación habitualmente epidémica de VRS e influenza en enero.



**Figura 16.-** Diagrama de barras de la distribución mensual de la cohorte VPIH. Los porcentajes situados encima de las barras son porcentajes relativos, respecto al total de VPIH detectados.

### 6.1.2.3. Serotipos de VPIH: datos globales y distribución por edades

En relación a los serotipos de VPIH, el 13,7% de los casos (n=91) correspondieron al serotipo VPIH-1; 9% (n=60) al serotipo VPIH-2; 55,9% (n=373) al serotipo VPIH-3; y 20,5% (n=137) al serotipo VPIH-4.

En los seis episodios restantes (0,9%) se observó codetección de dos serotipos de VPIH diferentes: en dos casos, codetección de los serotipos 1 y 2 (44 y 95 meses, ambas mujeres); en uno, de los serotipos 1 y 4 (14 meses, varón); en uno, de los serotipos 2 y 3 (27 meses, varón); en uno, de los serotipos 2 y 4 (15 meses, mujer); y uno, de los serotipos 3 y 4 (18 meses, varón). Para el análisis de las diferencias entre serotipos se excluyeron a lo largo de este trabajo las codetecciones de VPIH.

El grupo de edad en el que se observó un mayor número de casos para cada uno de los serotipos fue en el de menores de seis meses, no obteniéndose diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes serotipos en este grupo de edad, que osciló entre el 37,2% del VPIH-4 y el 51,7% del VPIH-2 (estudio de la distribución relativa de cada virus por edad y serotipo). Para cada uno de los serotipos, los menores de un año de edad sumaron más de la mitad de las infecciones, oscilando entre el 67,3% para VPIH-3 (251/373) y el 53,3% en el caso del VPIH-4 (73/137) (Ji cuadrado de Pearson,  $p=0,02$ ). Además, en el caso del serotipo VPIH-3, la proporción de casos entre los pacientes de más de 24 meses de edad (12,4%) fue significativamente menor que en el resto de serotipos (25-25,5%) (tabla 10). La distribución de VPIH-4 fue más homogénea en los diferentes subgrupos de edad.

**Tabla 10.-** Distribución de los serotipos según la edad en la cohorte VPIH global.

VPIH global	VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3	VPIH-4	p*
<b>Grupos de edad (meses)</b>	<b>n (%)<sup>1</sup></b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
< 6 (n=282)	41 (45,1)	31 (51,7)	159 (42,6)	51 (37,2)	0,28
6-11 (n=132)	11 (12,1)	7 (11,7)	92 (24,7)	22 (16,1)	0,01
Subtotal ≤12 meses	52 (57,2)	38 (63,4)	251 (67,3)	73 (53,3)	0,02
12-23 (n=128)	16 (17,6)	7 (11,7)	76 (20,4)	29 (21,2)	0,39
24-59 (n=89)	15 (16,5)	12 (20,0)	39 (10,5)	23 (16,8)	0,07
≥ 60 (n=30)	8 (8,8)	3 (5,0)	7 (1,9)	12 (8,8)	<b>0,00</b>
Subtotal >24 meses	23 (25,3)	15 (25,0)	46 (12,4)	35 (25,6)	<b>0,00</b>
Total (n=661)	91 (100)	60 (100)	373 (100)	137 (100)	-

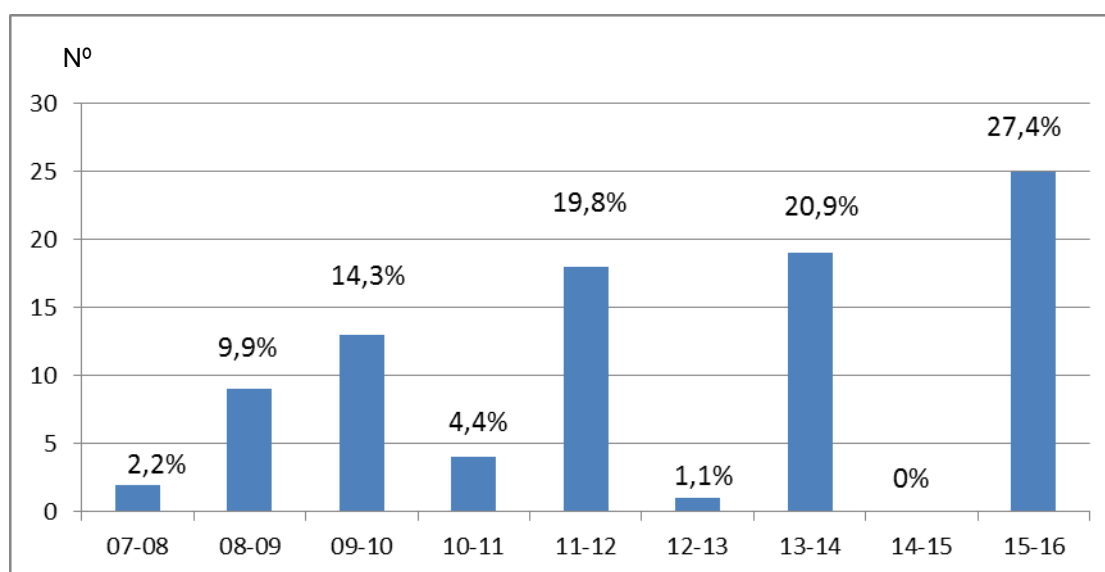
VPIH global	VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3	VPIH-4	p**
	<b>Mediana (rango)</b>	<b>Mediana (rango)</b>	<b>Mediana (rango)</b>	<b>Mediana (rango)</b>	
Edad (meses)	8 (0-137)	5 (0-75)	7 (0-119)	10 (0-177)	0,06

\* Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson. \*\*Análisis mediante prueba de Kruskal-Wallis. <sup>1</sup>: Porcentajes relativos, respecto al total de virus parainfluenza de cada serotipo, por grupo de edad.

#### 6.1.2.4. Serotipos de VPIH: distribución anual y estacional

##### Serotipo VPIH-1

De todas los casos con muestra positiva para VPIH, en 91 (13,7%) se objetivó el serotipo 1. Las temporadas en las que se observaron más casos de este serotipo fueron las 2009-10, 2011-12, 2013-14 y 2015-16, conformando un patrón cíclico bienal de circulación más intensa que sólo no se observó en el año 2007-08. No se detectó ningún caso de VPIH-1 en la temporada 2014-5, y solo un caso en la temporada 2012-13 (figura 17).

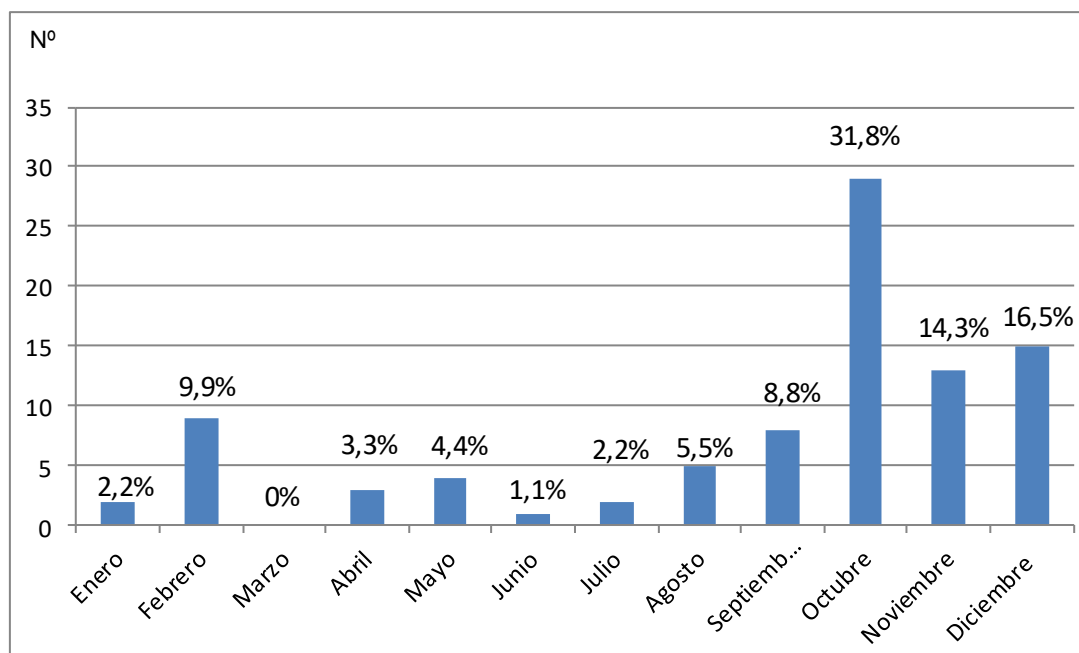


**Figura 17.-** Diagrama de barras de la distribución anual del VPIH-1 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-1 detectados).

Otoño fue la estación del año en la que más episodios de VPIH-1 se registraron (n=56) (61,5%), detectándose en primavera 8 casos (8,8%), en verano 10 (11%) y en invierno 17 (18,7%). Consecuentemente, el mes del año en el que más casos se detectaron fue octubre (n=29), seguido de diciembre (n=15) y noviembre (n=13). El cómputo de casos de los restantes meses del año estuvo por debajo de 10, no habiéndose registrado ningún caso en marzo (figura 18). En base al mes de detección de cada caso se constató que el patrón de circulación



cíclico observado en esta serie correspondió a circulación viral más intensa los otoños de los años impares.



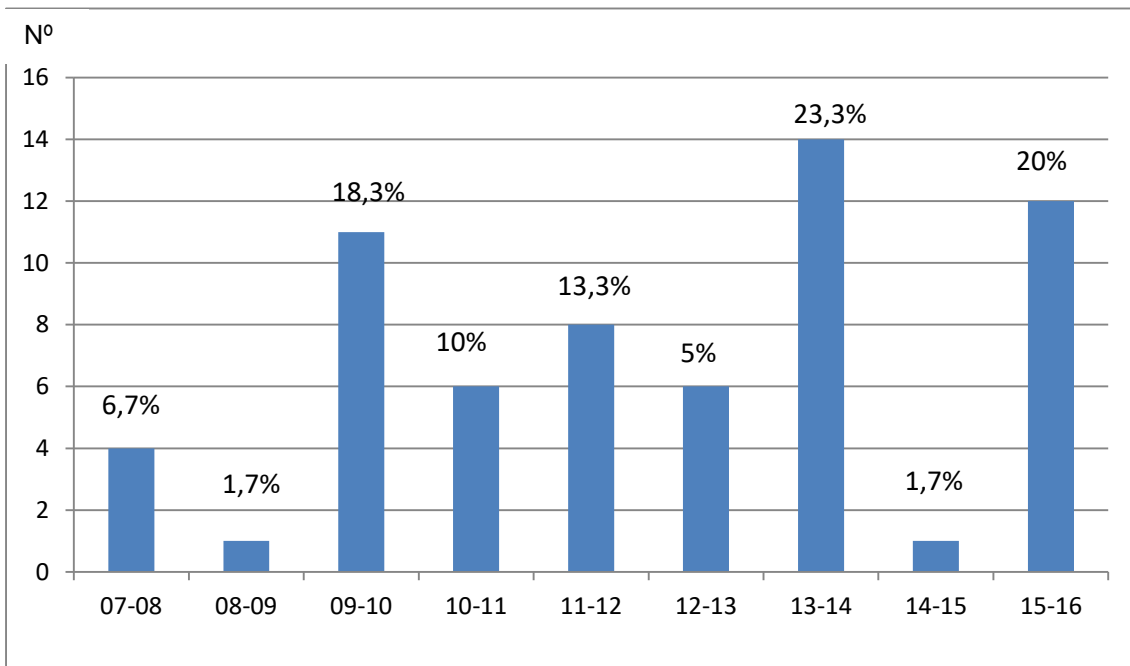
**Figura 18.-** Diagrama de barras de la distribución mensual del VPIH-1 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-1 detectados).

### Serotipo VPIH-2

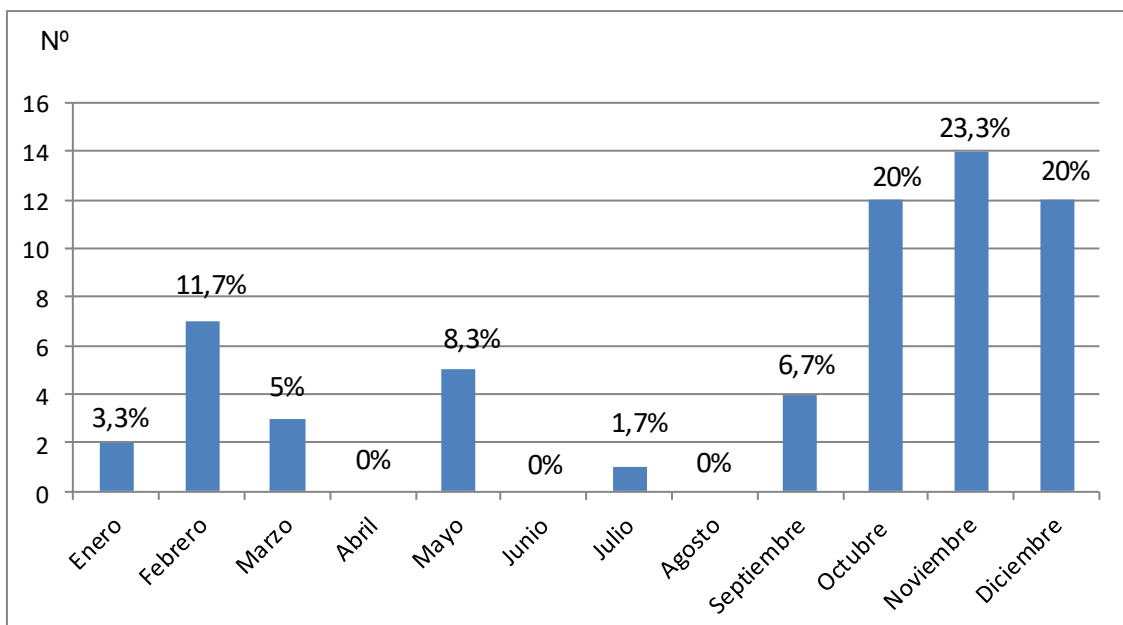
En 60 casos (9%) se detectó el serotipo 2 de VPIH. La temporada 2013-14 fue la temporada en la que más casos se detectaron (n=14) seguida de las temporadas 2009-10 y 2015-16. Al igual que ocurrió con el serotipo 1 de VPIH, se observó una tendencia a detectar circulación más intensa de este serotipo en un patrón bienal (figura 19).

Otoño fue la estación del año en la que más casos de VPIH-2 se observaron (n=34) (56,7%). En primavera se detectaron 5 casos (8,3%), en verano 4 (6,7%) y en invierno 17 (28,3%).

El mes en el que se identificaron más casos del serotipo VPIH-2 fue noviembre (n=14), seguido de octubre y diciembre (12 casos en cada uno). No se registró ningún caso en los meses de abril, junio y agosto (figura 20). En base al mes de detección de cada caso se observó que el patrón de circulación cíclico observado en esta serie para el VPIH-2 correspondió a circulación viral más intensa los otoños de los años impares.



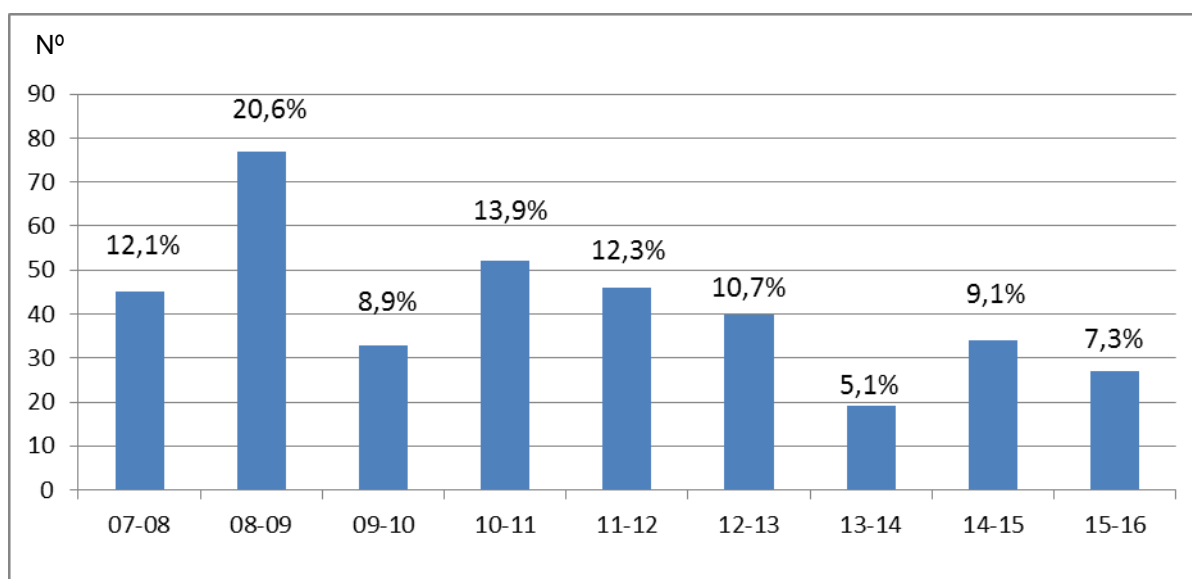
**Figura 19.-** Diagrama de barras de la distribución anual del VPIH-2 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-2 detectados).



**Figura 20.-** Diagrama de barras de la distribución mensual del VPIH-2 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-2 detectados).

### Serotipo VPIH-3

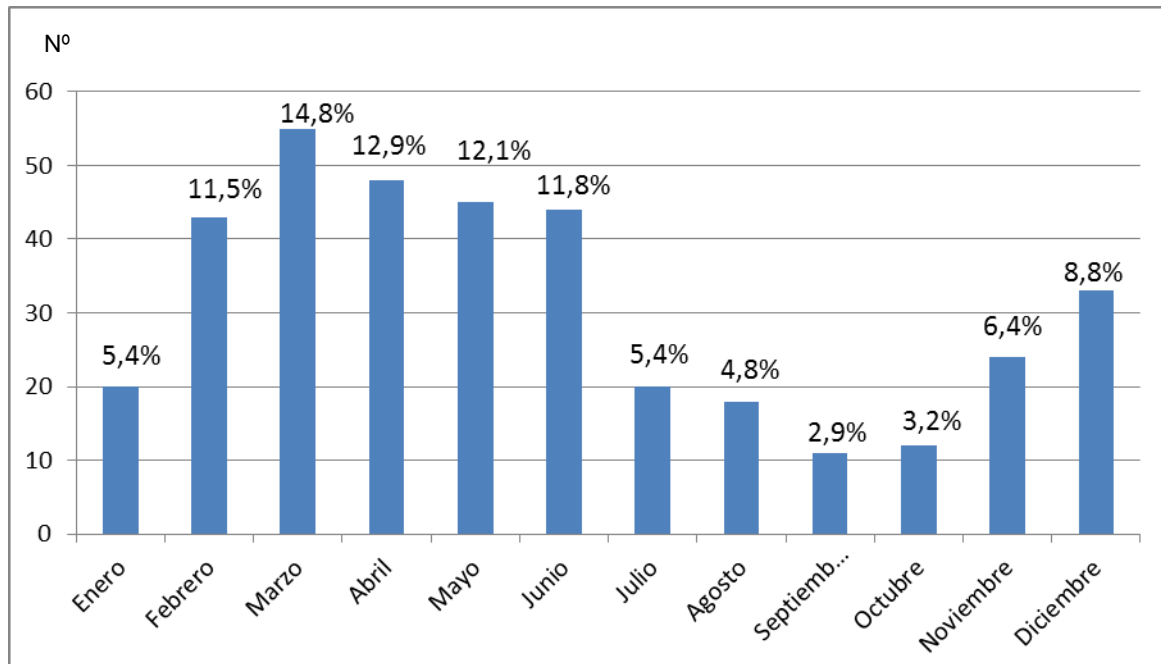
Del total de 667 casos detectados de VPIH, en 373 (55,9%) se identificó el serotipo VPIH-3. Las temporadas en las que más casos de VPIH-3 se detectaron fueron las temporadas 2008-09 (n=77) y 2010-11 (n=52). Aunque el número de casos detectados en unas u otras temporadas osciló de modo significativo, no se observó ningún patrón de circulación anual, siendo la circulación importante todos los años. En las tres últimas temporadas se detectó un número de casos algo menor, especialmente en la temporada 2013-14 (n=19) (figura 21).



**Figura 21.-** Diagrama de barras de la distribución anual del VPIH-3 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-3 detectados).

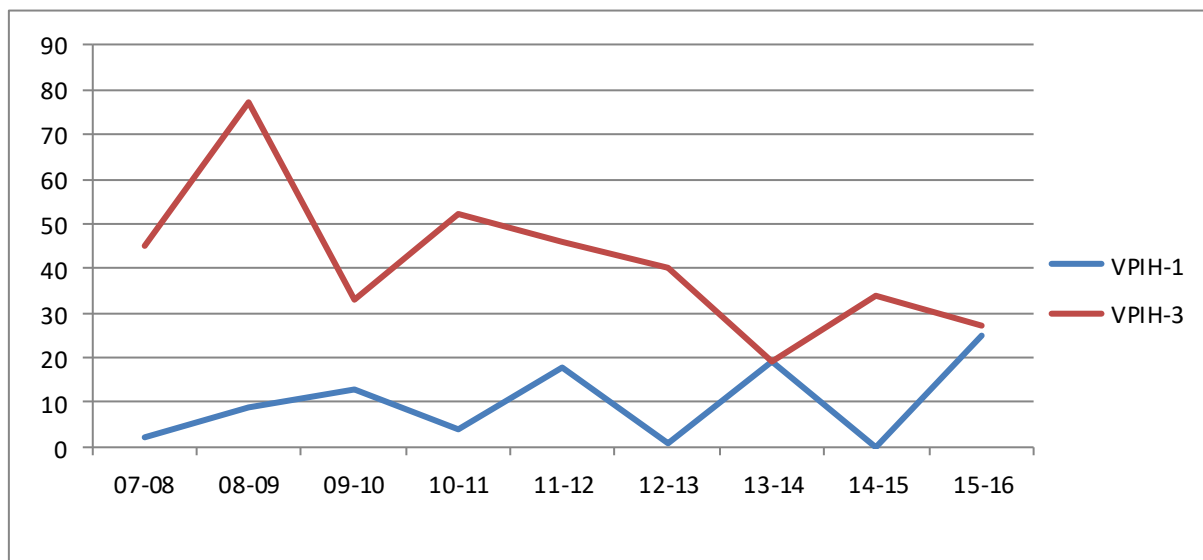
La primavera fue la estación del año en la que más casos de VPIH-3 se detectaron (n=143) (38,4%), seguida del verano con 65 casos (17,4%), el otoño con 62 (16,6%) y el invierno con 103 (27,6%) .

Los meses comprendidos entre febrero y junio fueron aquellos en los que más casos de VPIH-3 se identificaron. El mes con un mayor número de casos fue marzo (n=55), seguido de cerca por abril (n=48), mayo (n=45), junio (n=44) y febrero (n=43), pero se detectó circulación importante de este virus en todos los meses del año, siendo septiembre y octubre los meses en los que se produjeron un menor número de aislamientos (n=11 y n=12, respectivamente) (figura 22).



**Figura 22.-** Diagrama de barras de la distribución mensual del VPIH- 3 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-3 detectados).

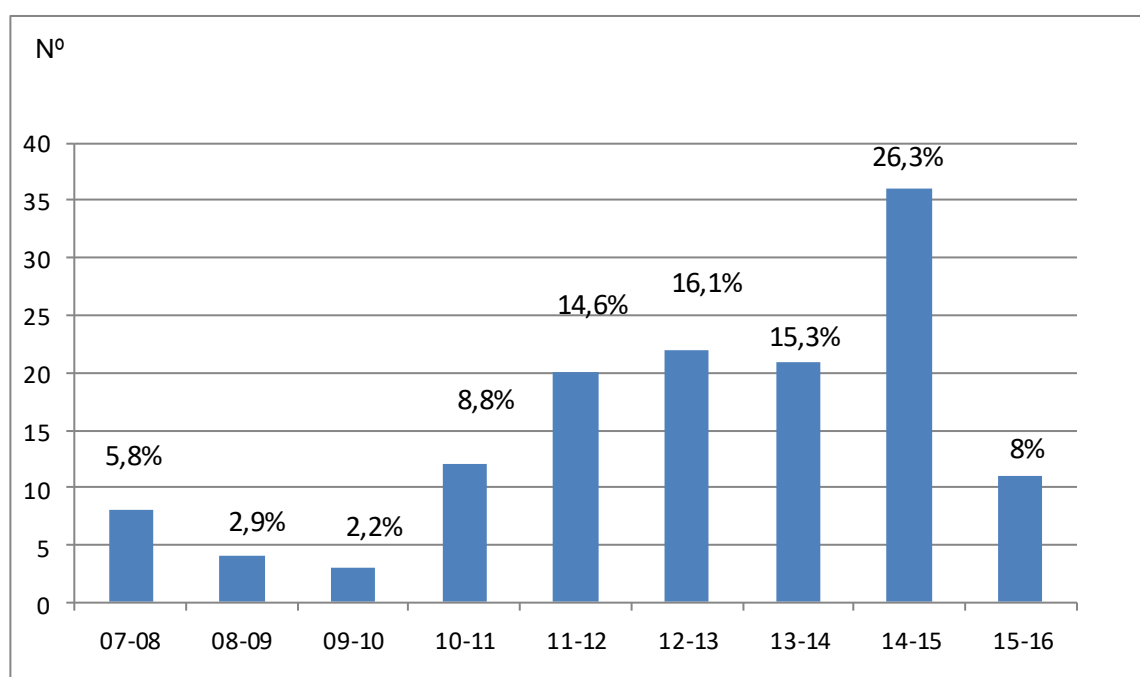
Los resultados sugirieron que los años en los que VPIH-1 circula con baja intensidad, parece haber un incremento de la actividad del VPIH-3 (figura 23).



**Figura 23.-** Distribución de los VPIH-1 y VPIH-3 durante el periodo de estudio.

### Serotipo VPIH-4

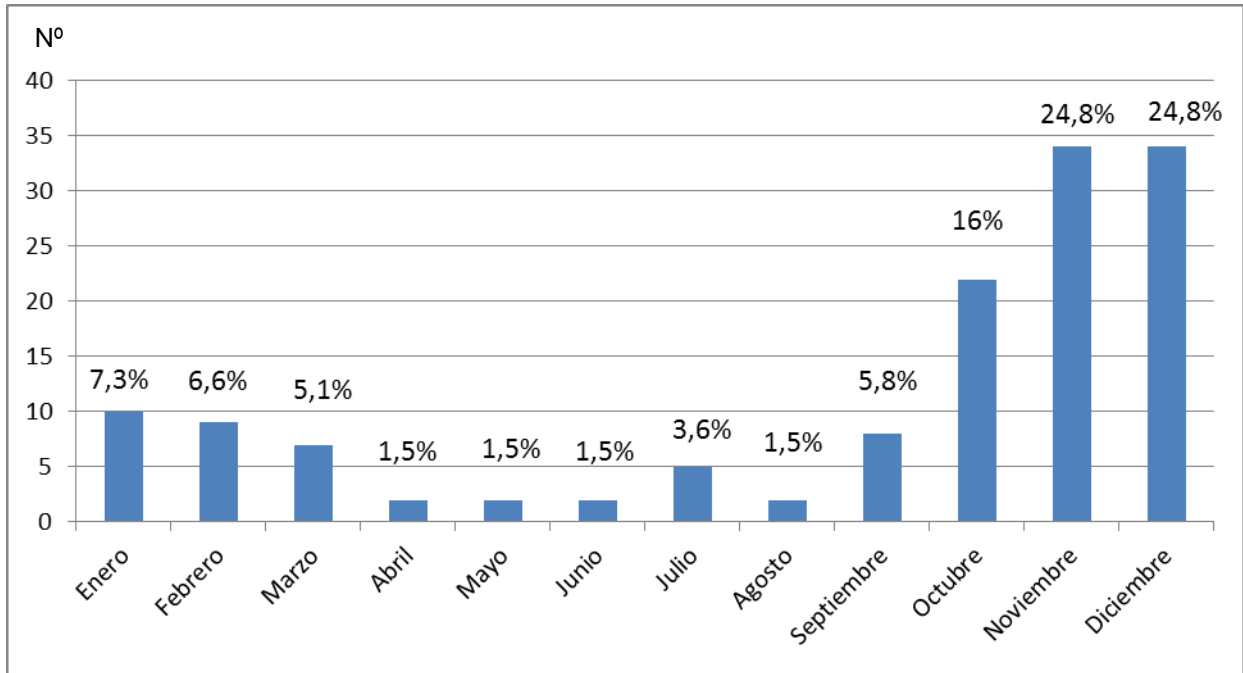
En los nueve años del estudio se identificaron 137 casos (20,5%) asociados al serotipo 4 de VPIH. En las primeras temporadas (2007-10) el número de casos observado fue menor, pero a partir de la temporada 2010-11, el número de casos detectado cada temporada fue importante, entre 11 (temporada 2015-16) y 36 (temporada 2014-15) (figura 24). La circulación viral interanual no presentó un patrón reconocible, si bien llama la atención el importante número de casos detectados durante la temporada 2014-15, en la que el número de aislamientos por VPIH-4 (n=36), fue incluso algo mayor que el de VPIH-3 (n=34) y restantes serotipos. A partir del año 2014 se pudo estudiar, en muestras con material biológico sobrante, el subgrupo de VPIH circulante. En 47 episodios se pudo estudiar el subtipo de virus serotipo 4 circulante observándose circulación simultánea de ambos subtipos (A y B), con un ligero predominio del subtipo 4A [29 del 4A (61,7%) y 18 del 4B (38,3%)] sin oscilaciones importantes en los poco más de dos años estudiados.



**Figura 24.-** Diagrama de barras de la distribución anual del VPIH-4 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-4 detectados).

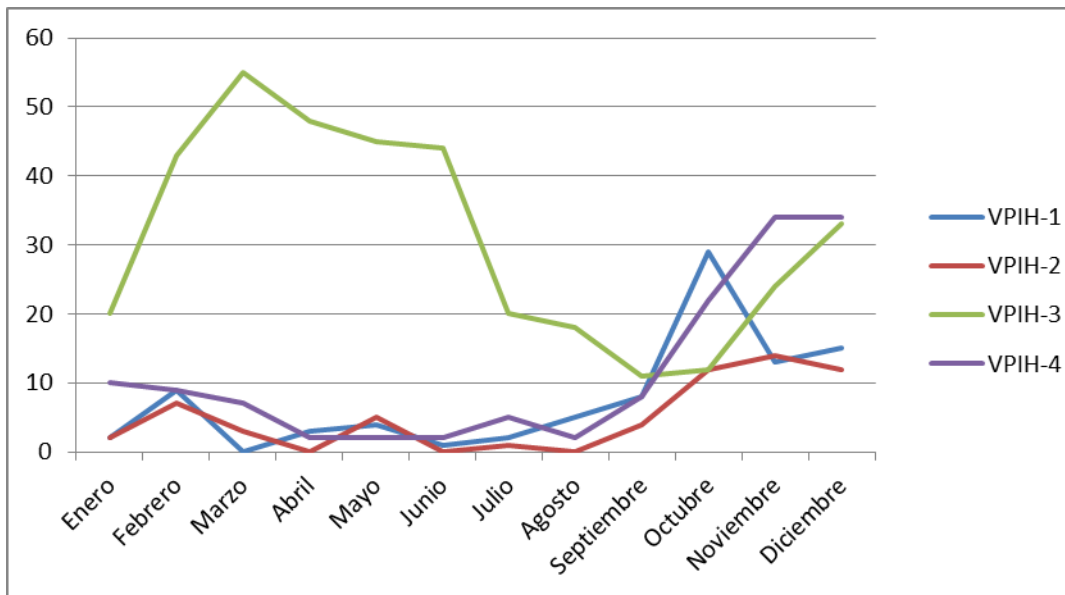
El otoño fue la estación del año en la que más casos de VPIH-4 se detectaron (n=87); (63,5%). En primavera fueron 6 casos (4,4%), en verano 9 (6,6%) y en invierno 35 (25,5%).

Los meses de noviembre y diciembre (34 casos cada uno) fueron los meses del año en que más casos de VPIH-4 se identificaron (figura 25).



**Figura 25.-** Diagrama de barras de la distribución por mensual del VPIH-4 de la cohorte VPIH global (sobre las barras porcentajes respecto al total de VPIH-4 detectados).

**Circulación anual (global) de los cuatro serotipos**



**Figura 26.-** Circulación mensual de los diferentes serotipos de la cohorte VPIH global durante el periodo de estudio.

Al comparar la circulación de los distintos serotipos de VPIH a lo largo del periodo de estudio se observó que el serotipo VPIH-3 fue claramente dominante en los ocho primeros meses del año, mientras que en los periodos de otoño (septiembre-diciembre) se produjo aparentemente

un aumento de frecuencia en todos los serotipos (figura 26), no mostrando grandes diferencias cuantitativas entre ellos en el global del periodo de estudio. Sin embargo, en los otoños de los años impares predominaron VPIH-1 y VPIH-2 debido al incremento de circulación bienal previamente referido (pags 114-116).

#### 6.1.2.5. Pacientes con más de un episodio de infección por VPIH

Las detecciones repetidas de VPIH (distintos episodios) fueron infrecuentes. En catorce pacientes de toda la cohorte se detectaron varios episodios de VPIH durante el periodo de estudio (2,1%), detectándose dos episodios en trece pacientes y tres en un paciente (0,1%). Las infecciones de repetición correspondieron a distintos serotipos excepto en tres de los episodios repetidos (21,4%) que fueron causados por el mismo (serotipo 1 en un caso y serotipo 4 en los otros dos) y estuvieron separadas por periodos de no enfermedad. Diez de los catorce casos (71,4%) presentaron comorbilidades. Las infecciones múltiples fueron más frecuentes en el segundo episodio (ocho en el segundo versus cuatro en el primero) (tabla 11). Aunque la cantidad de casos fue escasa, las reinfecciones se comportaron de manera similar o presentando clínica más leve que el primer episodio.

**Tabla 11.-** Características de las detecciones repetidas de VPIH durante el periodo de estudio.

Detecciones repetidas de VPIH (n=14)	Meses entre ambos episodios	Combinación de serotipos de VPIH		Codetecciones virales 1º episodio	Codetecciones virales 2º episodio	Comorbilidad asociada
Varón, 12 meses* de edad	9	3	4	No	Múltiple <sup>1</sup>	No
Varón, 21 meses	3	3	4	No	Rinovirus	Atresia esofágica.
Mujer, 8 meses	11	3	4	No	No	Síndrome de Leigh
Varón, 9 meses	9	1	3	VRS	Múltiple	Asma
Varón, 19 meses	2	2	3	VRS	Múltiple	No
Varón, 56 meses	22	1	4	No	Coronavirus	Tetraplejia espástica distónica
Varón, 3 meses	2	1	1	No	No	No

Varón, 26 meses	2	2	4	No	VRS	Asma		
Varón, 76 meses	16	2	3	No	No	Encefalopatía no filiada		
Varón, 49 meses	1	1	2	No	No	Asma, hemofilia A		
Varón, 32 meses	3	1	4	Múltiple	No	Asma		
Varón, 22 meses	18	4	4	Múltiple	No	Neumonías de repetición, bronquiectasias.		
Mujer, 8 meses	8	3	4	No	VRS	No		
Varón, 2 meses**	7	9	3	4	3	No	Rinovirus	Sd Moebius

Sd: síndrome. VRS: virus respiratorio sincitial. \*La edad en meses hace referencia a la que tenían los pacientes en el primer episodio. \*\*Caso con tres episodios de VPIH. 1: detección de  $\geq 3$  virus respiratorios.

#### 6.1.2.6. Detección de múltiples virus

VPIH se asoció a otros virus respiratorios en el 52,8% de los casos (n=352) de la cohorte. En la tabla 12 se refiere la distribución de los diferentes virus codetectados, objetivándose un alto porcentaje de detección de más de dos virus (26,4% de las codetecciones). El virus más frecuentemente detectado junto a VPIH, fue rinovirus.

**Tabla 12.-** Detecciones de otros virus junto a VPIH durante el periodo estudiado.

Virus respiratorios codetectados	Casos	Porcentaje
Rinovirus	152	43,2
VRS	39	11,1
Adenovirus	20	5,7
Influenza	13	3,7
Metapneumovirus	9	2,6
Coronavirus	9	2,6
Bocavirus	17	4,8
Codetección múltiple (> 2 virus)	93	26,4
Total	352	100

VRS: virus respiratorio sincitial. VPIH: virus parainfluenza humano.



Cuando se analizó por serotipos de VPIH la frecuencia de detecciones múltiples con otros virus respiratorios se observó que las detecciones múltiples fueron significativamente más frecuentes con el serotipo VPIH-4 (tabla 13).

**Tabla 13.-** Análisis de las detecciones múltiples y los serotipos VPIH de la cohorte VPIH global.

VPIH global (n=661)		VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3	VPIH-4	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p*
Detección múltiple	Sí	45 (49,5)	27 (45,0)	187 (50,1)	88 (64,2)	0,02
	No	46 (50,5)	33 (55,0)	186 (49,9)	49 (35,8)	

\* Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson.

En seis casos (0,9%) se detectó, además, *Bordetella pertussis* en la muestra nasofaríngea.

## 6.2. VPIH EN EL ÁMBITO HOSPITALARIO

### 6.2.1. Descripción general de la muestra

Se definieron como casos del ámbito hospitalario aquellos detectados en las Secciones de Urgencias, Hospitalización y UCIP del Servicio de Pediatría del HUD, ascendiendo a un total de 644 casos. Se excluyeron por no disponer de la totalidad de sus datos clínicos, los casos procedentes de Atención Primaria, de la Unidad de Hospital de Día del HUD y los procedentes de otros centros hospitalarios de Gipuzkoa que sumaron 23 (figura 27).

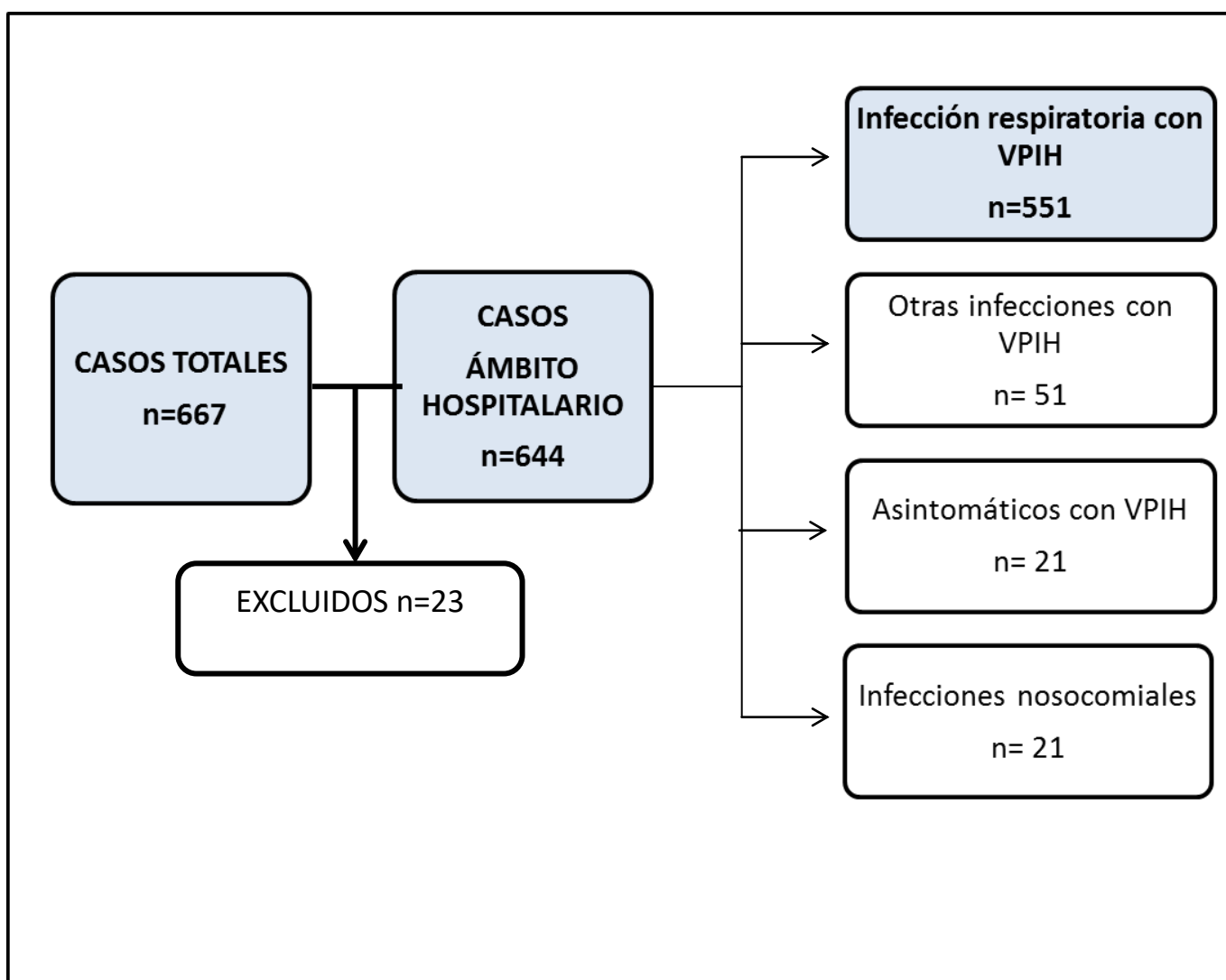
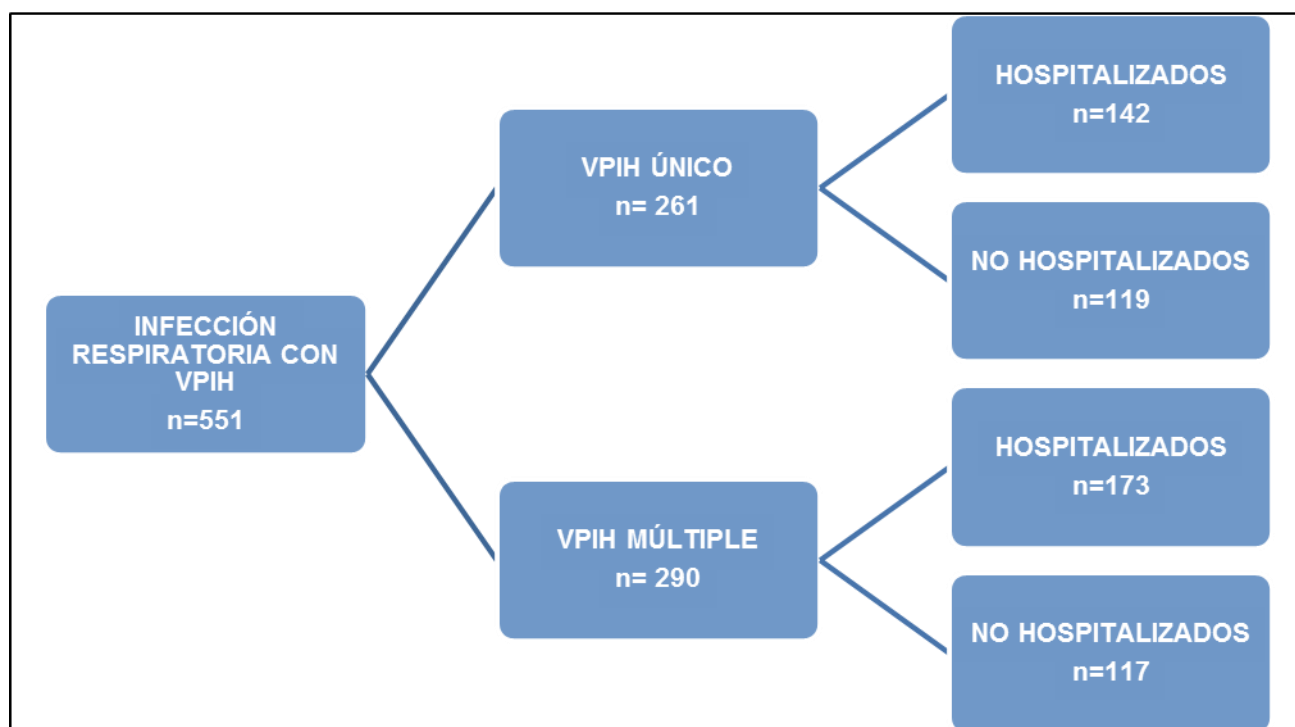


Figura 27.- Diagrama de flujo de la cohorte VPIH global.

Para el posterior análisis, los casos se dividieron en cuatro grupos en base al contexto clínico del episodio.

- a) **Infecciones respiratorias con VPIH.** Se incluyeron 551 casos (85,6%) con sintomatología respiratoria y detección de VPIH. Se analizaron tanto las detecciones únicas de VPIH (n=261) como las múltiples con otros virus respiratorios (n=290). Se compararon los casos que han requerido hospitalización con los casos no hospitalizados (figura 28).



**Figura 28.-** Diagrama de flujo de la cohorte VPIH-infección respiratoria.

Respecto a las infecciones múltiples (n=290) que como se ha dicho representaron el 52,6% de los casos, además de VPIH, se codetectaron otro u otros virus respiratorios. La distribución de los virus codetectados se expone en la siguiente tabla 14.

**Tabla 14.-** Relación de otros virus respiratorios en la cohorte VPIH-infección respiratoria.

Codetecciones de otros virus respiratorios	Casos	Porcentaje
Rinovirus	121	41,7
VRS	33	11,4
Adenovirus	15	5,2
Influenza	11	3,8
Metapneumovirus	7	2,4

Coronavirus	9	3,1
Bocavirus	12	4,1
Infección múltiple (> 2 virus respiratorios)	82	28,3
Total	290	100

VRS: virus respiratorio sincitial.

- b) **Infecciones bacterianas asociadas a VPIH.** En este grupo se incluyeron un total de 51 casos (7,9%) con detección de VPIH pero clínica principal atribuible a otro agente etiológico confirmado o sospechado, precisando ingreso hospitalario casi la totalidad de este grupo (n=50; 98%). En la tabla 15 se refieren los diferentes cultivos positivos que documentaron dichas infecciones.

**Tabla 15.-** Infecciones bacterianas asociadas a VPIH en la cohorte VPIH-infección respiratoria.

Otras infecciones	Casos	Porcentaje
Hemocultivo	5	9,8
Urocultivo	16	31,4
Coprocultivo	8	15,7
Otros*	22	43,1
Total	51	100

\*Otros: cultivo de LCR (n=5), de líquido pleural (n=6), cultivo de celulitis/absceso (n=9), infección osteoarticular (n=2).

- c) **Pacientes asintomáticos con detección de VPIH.** Se detectaron un total de 21 casos (3,3%) con detección de VPIH casual, sin presentar sintomatología infecciosa. La mayoría correspondieron a pacientes hospitalizados por otro motivo diferente a infección respiratoria pero que fueron muestreados como parte del protocolo de admisión que se sigue en el HUD en épocas de epidemias virales. Algunos casos podrían corresponder a infecciones recientes ya curadas y excreción viral residual.
- d) **Infecciones nosocomiales.** Se incluyeron un total de 21 casos (3,3%). La mediana de edad fue de 18 meses (rango: 1-119) y el 57,1% de los casos fueron varones. Las infecciones nosocomiales ocurrieron repartidas a lo largo del año de manera parecida, siendo detectados en primavera 7 casos (33,4%), en otoño 6 (28,6%) y 4 (19%) en verano e invierno, respectivamente.

El serotipo predominante entre las infecciones nosocomiales fue VPIH-3, siendo la proporción de infecciones nosocomiales similar para cada serotipo (análisis mediante prueba exacta de Fisher para comparaciones intragrupalas,  $p > 0,05$ ) (tabla 16).

**Tabla 16.-** Distribución de los serotipos en las infecciones nosocomiales de la cohorte VPIH-infección respiratoria.

Serotipo	Total de casos (n)	Casos nosocomiales y frecuencias por serotipo	Casos nosocomiales y frecuencias relativas
VPIH-1	88	2 (2,3)	2 (9,5)
VPIH-2	57	1 (1,8)	1 (4,8)
VPIH-3	359	14 (3,9)	14 (66,7)
VPIH-4	134	4 (3,0)	4 (19,0)
Total	638	21 (3,3)	21 (100)

No se pudo detallar la sintomatología ni el impacto clínico de estos casos ya que no se dispuso de suficientes datos en la mayoría de ellos.

### 6.3. INFECCIÓN RESPIRATORIA ASOCIADA A VPIH

#### 6.3.1. Epidemiología

##### Datos globales

La cohorte de infección respiratoria asociada a VPIH consta de 551 episodios. La distribución por edad, anualidad, estacionalidad y serotipos del grupo de infección respiratoria fue similar a la descrita previamente (apartado 6.1, epidemiología general, págs. 110-114) para la cohorte de VPIH global. Brevemente, la mediana de edad del grupo de infección respiratoria fue de siete meses (rango 0-177). El 57,2% ( $n=315$ ) de los casos fueron varones y el 42,8% ( $n=236$ ) mujeres.

El 55% de los casos ( $n=303$ ) correspondieron a VPIH-3; 20,7% ( $n=114$ ) a VPIH-4; 13,8% ( $n=76$ ) a VPIH-1; 9,4% ( $n=52$ ) a VPIH-2 (Anexo VII [A]). Seis pacientes (1,1%) presentaron infecciones con más de un serotipo del VPIH en la misma muestra nasofaríngea, habiendo sido excluidos de los diferentes análisis estadísticos cuando se analizan las posibles diferencias por

serotipo. El detalle relativo a la distribución anual y estacionalidad puede verse en el anexo VII (B, C, D).

### VARIABLES RELACIONADAS CON EL PACIENTE

- **Edad y sexo.** De manera similar a lo que ocurrió en la cohorte global (n=667), en la cohorte de infección respiratoria con VPIH único (n=261) el grupo de edad en el que se observó un mayor número de casos para cada uno de los serotipos fue el de lactantes menores de seis meses.

VPIH-3 fue el VPIH más frecuentemente detectado en este grupo de edad, si bien el porcentaje de aislamientos fue menor para este serotipo que para el resto, con diferencias en el límite de la significación estadística.

En las siguientes franjas etarias (6-23 meses) también se detectó más frecuentemente el serotipo VPIH-3. Sin embargo, en los pacientes mayores de 60 meses la proporción de casos de este serotipo fue significativamente menor y mayor la de VPIH-4. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el sexo (tabla 17).

**Tabla 17.-** Edad, sexo y serotipos en el grupo de infección respiratoria, excluyendo los casos con detecciones virales múltiples.

VPIH único (n=260)	VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3	VPIH-4	p
<b>Subgrupos de edad (meses)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
< 6 (n=148)	24 (66,7)	19 (67,9)	76 (49,7)	29 (67,4)	0,05*
6-11 (n=43)	3 (8,3)	1 (3,6)	34 (22,2)	5 (11,6)	<0,05 <sup>π</sup>
Subtotal ≤12 meses	27 (75,0)	20 (71,4)	110 (71,9)	34 (79,1)	0,8*
12-23 (n=27)	2 (5,6)	1 (3,6)	23 (15,0)	1 (2,3)	<0,05 <sup>φ</sup>
24-59 (n=29)	3 (8,3)	6 (21,4)	17 (11,1)	3 (7,0)	>0,05**
≥ 60 (n=13)	4 (11,1)	1 (3,6)	3 (2,0)	5 (11,6)	<0,05 <sup>Ω</sup>
Subtotal >24 meses	7 (19,4)	7 (25,0)	20 (13,1)	8 (18,6)	0,4*
Total (n=260)	36 (100)	28 (100)	153 (100)	43 (100)	-
<b>Edad (meses)</b>	<b>Mediana (rango)</b>	<b>Mediana (rango)</b>	<b>Mediana (rango)</b>	<b>Mediana (rango)</b>	
	3 (0-126)	2 (0-75)	6 (0-88)	2 (0-177)	0,32***

VPIH único (n=260)		VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3	VPIH-4	p
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
<b>Sexo</b>	Varón	23 (63,9)	16 (57,1)	89 (58,2)	20 (46,5)	0,44**
	Mujer	13 (36,1)	12 (42,9)	64 (41,8)	23 (53,5)	

R: rango. \*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson.  $\pi$ : prueba exacta de Fisher  $p=0,00$  para la comparación de los grupos VPIH-3 frente al resto.  $\phi$ : prueba exacta de Fisher  $p=0,00$  para la comparación de los grupos VPIH-3 frente al resto de serotipos.  $\Omega$ : prueba exacta de Fisher  $p=0,01$  para la comparación de los grupos VPIH-3 frente al resto de serotipos; y  $p=0,04$  para la comparación de los grupos VPIH-4 frente al resto de serotipos. \*\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher. \*\*\*Análisis mediante prueba de Kruskal-Wallis.

- **Lactancia materna, antecedentes gestacionales y patología previa.** El 25,9% (n=66) de los niños de la cohorte de infección respiratoria asociada a VPIH único fueron alimentados con lactancia materna durante 4 meses, siendo la mediana de duración de la cohorte en general de dos meses (rango: 1-24).

En cuanto a los antecedentes gestacionales, el 16,1% de los casos (n=42) fueron pacientes con historia de prematuridad, el 79,3% (n=207) nacidos a término y el 3,1% (n=8) postérmino. No se conoció el dato en el 1,5% de los casos (n=4).

El 28,6% (n=75) de los niños de la cohorte presentaron alguna patología previa, siendo las más frecuentes neumopatías (n=47) (62,7%). Entre éstas, el 24% (n=18) presentó asma, el 60% (n=45) alguna bronquiolitis previa, el 44% (n=33) episodios recurrentes de sibilancias, el 1,3% (n=1) displasia broncopulmonar y ningún paciente presentó laringitis recurrentes. El 13,3% (n=10) presentaron alguna cardiopatía y el 20% (n=15) patología neurológica.

No se observó ningún caso de inmunodeficiencia congénita. Por el contrario, tres pacientes (4%) presentaron inmunodeficiencias adquiridas; concretamente, pacientes oncológicos bajo tratamiento quimioterápico.

En el grupo de pacientes con infección respiratoria y detección de VPIH único, cuando se analizó la distribución de las variables referidas (lactancia materna, antecedentes gestacionales y patología previa) entre los cuatro serotipos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (tabla 18).

**Tabla 18.-** Relación entre las variables relacionadas con el paciente y los serotipos en la cohorte de VPIH-infección respiratoria, excluyendo las detecciones virales múltiples.

VPIH único (n=260)	VPIH-1 (n=36)	VPIH-2 (n=28)	VPIH-3 (n=153)	VPIH-4 (n=43)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p
Parto					
- Pretérmino	5 (13,9)	6 (21,4)	24 (16,1)	7 (16,3)	
- A término + Postérmino	31 (86,1)	22 (78,6)	125 (83,9)	36 (83,7)	0,87*
LM al menos 4 meses	8 (22,2)	4 (14,3)	43 (28,1)	10 (23,3)	0,44*
Neumopatía	6 (16,7)	5 (17,9)	31 (20,3)	4 (9,3)	0,42*
Cardiopatía	2 (5,6)	0	7 (4,6)	1 (2,3)	>0,05**
Enfermedades neuroológicas	1 (2,8)	2 (7,1)	10 (6,5)	2 (4,7)	>0,05**
Inmunodeficiencias	0	0	3 (2,0)	0	>0,05**

LM: Lactancia materna. \* Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson. \*\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher.

- **Variables relacionadas con el paciente y detecciones únicas versus múltiples.** Como se describe en la tabla 19, la mediana de edad fue menor en los pacientes con detecciones únicas de VPIH siendo las diferencias estadísticamente significativas. Esta diferencia fue debida a la mayor proporción observada de infecciones únicas en los pacientes menores de seis meses de edad (Ji cuadrado de Pearson,  $p=0,00$ ). En las franjas etarias siguientes (6-11 y 11-23 meses de edad) la proporción de casos con detección múltiple fue mayor ( $p=0,01$  y  $p=0,00$ , respectivamente), pero en los niños mayores la distribución fue similar ( $p>0,05$ ).

Entre los prematuros se observó una mayor proporción de infecciones con VPIH único. Por otra parte, la proporción de casos con VPIH múltiple (codetecciones virales), fue mayor entre los pacientes alimentados con lactancia materna durante cuatro meses y entre aquellos que presentaron como comorbilidad neumopatías.

Sin embargo, en un análisis multivariante mediante regresión logística binaria para las variables relacionadas con el paciente, ajustado por edad, únicamente se confirmó la significación estadística para la lactancia materna, la cual se mostró factor protector para la detección única. El análisis multivariante no confirmó las asociaciones encontradas con la neumopatía y los antecedentes gestacionales.



**Tabla 19.-** Relación entre las variables relacionadas con el paciente y los casos de VPIH único versus VPIH múltiple.

VPIH-infección respiratoria (n=551)		VPIH único (n=261)	VPIH múltiple (n=290)	Total	Análisis univariante	Análisis multivariante
		n (%)	n (%)	n (%)	p	p (OR IC 95%)
Edad (meses)						
- < 6		148 (56,7)	91 (31,4)	239 (43,4)		
- 6-11		43 (16,5)	73 (25,2)	116 (21)		
- 12-23		27 (10,3)	77 (26,6)	104 (18,9)		
- 24-59		29 (11,1)	41 (14,1)	70 (12,7)		
- ≥ 60		14 (5,4)	8 (2,8)	22 (4,0)	0,00*	0,00 (0,361-0,766)
Edad(meses) cuantitativa¥		3 (0-177)	9 (0-115)	7 (0-177)	0,00**	-
Sexo	Varón	148 (56,7)	167 (57,6)	315 (57,2)		
	Mujer	113 (43,3)	123 (42,4)	236 (42,8)	0,84*	-
Parto						
- Pretérmino		42 (16,3)	30 (10,4)	72 (13,2)		
- A término + Postérmino		215 (83,7)	258 (89,6)	473 (86,8)	0,04*	>0,05
LM al menos 4 meses		66 (25,9)	131 (45,8)	197 (36,4)	0,00*	0,00 (0,317-0,668)
Neumopatía		47 (18,0)	80 (27,6)	127 (23,0)	0,01*	>0,05
Cardiopatía		10 (3,8)	11 (3,8)	21 (3,8)	0,98*	-
Enfermedad neurológica		15 (5,7)	16 (5,5)	31 (5,6)	0,91*	-
Inmunodeficiencias		3 (1,1)	3 (1,0)	6 (1,1)	1***	-

LM: Lactancia materna. \*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson. \*\*Análisis mediante la prueba estadística U de Mann Whitney. \*\*\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher. ¥ : mediana (rango) en meses.

### Variables no relacionadas con el paciente (ambientales)

Las variables no relacionadas con el paciente o ambientales y su relación con la infección única o múltiple de VPIH se exponen en la tabla 20.

Entre los niños que asistían a la guardería/escuela, que presentaban vacunación adecuada a su edad y vacunación antineumocócica, la proporción de casos con detección viral múltiple fue mayor. Sin embargo, en el análisis multivariante incluyendo la edad, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de estas variables.

**Tabla 20.-** Relación entre las variables ambientales paciente y los casos VPIH único versus detecciones virales múltiples.

VPIH-infección respiratoria (n=551)		VPIH único (n=261)	VPIH múltiple (n=290)	Total	Análisis univariante	Análisis multivariante
		n (%)	n (%)	n (%)	p*	p
Tabaquismo pasivo	Sí	75 (34,1)	81 (33,6)	156 (33,8)	0,91	-
	No	145 (65,9)	160 (66,4)	305 (66,2)		
	Perdidos	41 (-)	49 (-)	90 (-)		
Hermanos <sup>1</sup>		166 (63,6)	168 (57,9)	334 (60,6)	0,17	-
Guardería/Escolar		68 (26,1)	126 (43,4)	194 (35,2)	0,00	>0,05
Vacunación completa		210 (80,5)	258 (89,0)	468 (84,9)	0,01	>0,05
VANC completa		69 (26,4)	117 (40,3)	186 (33,8)	0,00	>0,05

VANC: vacuna antineumocócica conjugada. \* Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson.

<sup>1</sup>: La mediana de hermanos fue de uno (rango 0-3).

Cuando se analizó la relación entre las variables no relacionadas con el paciente y su distribución entre los diferentes serotipos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (tabla 21).

**Tabla 21.-** Relación entre variables ambientales y los serotipos en la cohorte de VPIH-infección respiratoria, excluyendo las codetecciones de otros virus respiratorios.

VPIH único (n=260)	VPIH-1 (n=36)	VPIH-2 (n=28)	VPIH-3 (n=153)	VPIH-4 (n=43)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p*
Tabaco	15 (45,5)	7 (29,2)	44 (35,5)	8 (21,1)	0,16
Hermanos	19 (52,8)	19 (67,9)	95 (62,1)	32 (74,4)	0,23

Guardería/Escuela	8 (22,2)	8 (28,6)	42 (27,5)	9 (20,9)	0,78
Vacunación completa	31 (86,1)	23 (82,1)	125 (81,7)	30 (69,8)	0,26
VANC completa	8 (22,2)	8 (28,6)	47 (30,7)	5 (11,6)	0,08

VANC: vacuna antineumocócica conjugada. \* Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson.

### 6.3.2. Sintomatología clínica

**Síntomas clínicos globales.** En la tabla 22 se exponen las principales manifestaciones clínicas que presentaron los niños con muestras nasofaríngeas positivas para VPIH único, con detecciones virales múltiples y la totalidad. Los pacientes con detecciones virales múltiples presentaron más fiebre, dificultad respiratoria y broncoespasmo, con diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario, entre los casos con episodios de apnea, la proporción de casos con VPIH únicos fue mayor, siendo la diferencia estadísticamente significativa. No se observaron diferencias significativas en otras manifestaciones clínicas como cuadro catarral, tos, estridor, vómitos o convulsiones.

Sin embargo, al realizar el análisis multivariante, incluyendo la edad, no se observaron diferencias significativas para ninguna de las variables previamente mencionadas.

**Tabla 22.-** Distribución de las variables clínicas de la cohorte VPIH-infección respiratoria y las diferencias entre VPIH único y detección en la misma muestra de otros virus (codetección viral).

VPIH-infección respiratoria (n=551)	VPIH único (n=261)	VPIH múltiple (n=290)	Total	Análisis univariante	Análisis multivariante
	n (%)	n (%)	n (%)	p*	p (OR IC 95%)
Fiebre	141 (54,0)	186 (64,1)	327 (59,3)	0,02	>0,05
Cuadro catarral	231 (88,5)	263 (90,7)	494 (86,7)	0,4	-
Tos	185 (70,9)	220 (75,9)	405 (73,5)	0,19	-
Estridor	10 (3,8)	19 (6,6)	29 (5,3)	0,15	-
Dificultad respiratoria	105 (40,2)	142 (49,0)	247 (44,8)	0,04	>0,05
Broncoespasmo	85 (32,6)	122 (42,1)	207 (37,6)	0,02	>0,05
Episodios de apnea	24 (9,2)	12 (4,1)	36 (6,5)	0,02	>0,05

Vómitos	64 (24,5)	89 (30,7)	153 (27,8)	0,11	-
Convulsión	6 (2,3)	8 (2,8)	14 (2,5)	0,73	-

\*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson.

**Síntomas clínicos y serotipos.** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las variables clínicas analizadas entre los diferentes serotipos (tabla 23).

**Tabla 23.-** Distribución de las variables clínicas por serotipos en el grupo VPIH único.

VPIH único (n=260)	VPIH-1 (n=36)	VPIH-2 (n=28)	VPIH-3 (n=153)	VPIH-4 (n=43)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	P
Fiebre	18 (50,0)	19 (67,9)	85 (55,6)	19 (44,2)	0,24*
Cuadro catarral	32 (88,9)	23 (82,1)	138 (90,2)	37 (86,0)	0,62*
Tos	26 (72,2)	15 (53,6)	107 (69,9)	36 (83,7)	0,06*
Estridor	1 (2,8)	1 (3,6)	6 (3,9)	2 (4,7)	>0,05**
Dificultad respiratoria	16 (44,4)	9 (32,1)	62 (40,5)	17 (39,5)	0,79*
Broncoespasmo	12 (33,3)	7 (25,0)	49 (32,0)	16 (37,2)	0,76*
Episodios de apnea	1 (2,8)	4 (14,3)	16 (10,5)	3 (7,0)	>0,05**
Vómitos	6 (16,7)	5 (17,9)	45 (29,4)	8 (18,6)	0,2*
Convulsión	0	0	5 (3,3)	1 (2,3)	>0,05**

\*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson. \*\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher.

**Síntomas clínicos y grupos de edad.** En la tabla 24 se expone la sintomatología clínica en función de la edad.

La fiebre fue menos frecuente en los pacientes menores de seis meses y la mayor proporción de pacientes con fiebre se observó entre los de 12 y 23 meses de edad. El broncoespasmo fue también menos frecuente en los niños menores de seis meses de edad que en los de mayor edad. Por el contrario, los episodios de apnea fueron más frecuentes en los menores de seis meses, con diferencia estadísticamente significativa. Para el resto de variables consideradas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 24.-** Relación entre las variables clínicas y los grupos de edad en el grupo VPIH único.

Grupos de edad en meses (n=261)	< 6 (n=148)	6-11 (n=43)	12-23 (n=27)	24-59 (n=29)	≥ 60 (n=14)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p
Fiebre	60 (40,5)	27 (62,8)	24 (88,9)	23 (79,3)	7 (50,0)	0,00*
Cuadro catarral	131 (88,5)	40 (93,0)	23 (85,2)	23 (79,3)	14 (100,0)	>0,05**
Tos	108 (73,0)	31 (72,1)	15 (55,6)	19 (65,5)	12 (85,7)	0,28*
Estridor	6 (4,1)	2 (4,7)	2 (7,4)	0	0	>0,05**
Dificultad respiratoria	53 (35,8)	20 (46,5)	12 (44,4)	12 (41,4)	8 (57,1)	0,43*
Broncoespasmo	34 (23,0)	21 (48,8)	8 (29,6)	13 (44,8)	9 (64,3)	0,01*
Episodios de apnea	20 (13,5)	3 (7,0)	1 (3,7)	0	0	<0,05 <sup>π</sup>
Vómitos	34 (23,0)	15 (34,9)	6 (22,2)	9 (31,0)	0	0,09*
Convulsión	1 (0,7)	1 (2,3)	2 (7,4)	0	2 (14,3)	-

\*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson. \*\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher. π: prueba exacta de Fisher p=0,01 para la comparación de grupos <6 meses frente al resto de franjas etarias.

**Síntomas clínicos en los casos hospitalizados.** Los pacientes de la cohorte infección por VPIH único hospitalizados presentaron con mayor frecuencia dificultad respiratoria, broncoespasmo, estridor y episodios de apnea que los pacientes no hospitalizados, con diferencias estadísticamente significativas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el resto de variables clínicas analizadas (tabla 25).

**Tabla 25.-** Distribución de las variables clínicas en el grupo VPIH único entre los hospitalizados y no hospitalizados.

VPIH único (n=261)	No hospitalizados (n=119)	Hospitalizados (n=142)	
	n (%)	n (%)	p
Fiebre	65 (54,6)	76 (53,5)	0,86*
Cuadro catarral	102 (85,7)	129 (90,8)	0,2*
Tos	80 (67,2)	105 (73,9)	0,23*
Estridor	1 (0,8)	9 (6,3)	0,02**

Dificultad respiratoria	34 (28,6)	71 (50,0)	0,00*
Broncoespasmo	26 (21,8)	59 (41,5)	0,00*
Episodios de apnea	5 (4,2)	19 (13,4)	0,01*
Vómitos	31 (26,1)	33 (23,2)	0,56*
Convulsión	1 (0,8)	5 (3,5)	0,22**

\*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson. \*\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher.

### 6.3.3. Laboratorio

**Datos analíticos globales.** La leucocitosis, neutrofilia y una PCR elevada fueron más frecuentes en los pacientes con detecciones virales múltiples, si bien la última variable se encontró en el límite de la significación estadística. Los pacientes con detecciones múltiples virales presentaron una mediana de PCR, leucocitos y neutrófilos en sangre periférica, mayor a los casos de infección con VPIH único (tabla 26).

**Tabla 26.-** Datos analíticos de la cohorte infección respiratoria y diferencias entre el grupo VPIH único y VPIH múltiple.

VPIH-infección respiratoria (n=551)		VPIH único (n=261)	VPIH múltiple (n=290)	Total estudiados	
		n (%)	n (%)	n (%)	p*
PCR elevada	Sí	28 (16,1)	49 (24,1)	77 (14,0)	0,05
	No	146 (83,9)	154 (75,9)	300 (54,5)	
Leucocitos elevados	Sí	55 (31,8)	99 (48,5)	154 (27,9)	0,01
	No	118 (68,2)	105 (51,5)	223 (40,5)	
Neutrófilos elevados	Sí	24 (13,9)	57 (27,9)	81 (14,7)	0,01
	No	149 (86,1)	147 (72,1)	296 (53,7)	
VPIH-infección respiratoria (n=551)		VPIH único (n=261)	VPIH múltiple (n=290)	Total	
		Mediana (rango)	Mediana (rango)	Mediana (rango)	p**
PCR		7 (0,1-278)	18,85 (0,3-350)	10,95 (0,1-350)	0,00

Leucocitos	11.780 (820-35.140)	13.470 (3.110-35.360)	12.800 (820-35.360)	0,00
Neutrófilos	3.859 (100-23.620)	6.430 (400-63.820)	5.390 (100-63.820)	0,00

\* Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson. \*\* Análisis mediante prueba de U de Mann-Whitney.

**Datos analíticos por serotipo.** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar la distribución de los datos analíticos en los diferentes serotipos de VPIH.

**Tabla 27.-** Datos analíticos por serotipos en el grupo VPIH único.

VPIH único (n=260)		VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3	VPIH-4	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	P
PCR elevada	Sí	2 (9,5)	3 (12,5)	17 (16,8)	6 (22,2)	>0,05**
	No	19 (90,5)	21 (87,5)	84 (83,2)	21 (77,8)	
Leucocitos elevados	Sí	7 (33,3)	7 (30,4)	31 (30,7)	10 (37,0)	0,93*
	No	14 (66,7)	16 (69,6)	70 (69,3)	17 (63,0)	
Neutrófilos elevados	Sí	4 (19,0)	2 (8,7)	14 (13,9)	4 (14,8)	>0,05**
	No	17 (81,0)	21 (91,3)	87 (86,1)	23 (85,2)	
VPIH único (n=260)		VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3	VPIH-4	
		Mediana (rango)	Mediana (rango)	Mediana (rango)	Mediana (rango)	p***
PCR		6 (-)	4 (-)	7 (-)	13,31 (-)	0,41
Leucocitos		10.820 (-)	10.990 (-)	11.780 (-)	12.600 (-)	0,87
Neutrófilos		3.750 (-)	3.460 (-)	3.902 (-)	3.180 (-)	0,75

\* Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson. \*\* Análisis mediante prueba exacta de Fisher. \*\*\* Análisis mediante prueba de Kruskal-Wallis.

**Datos analíticos por grupos de edades.** El porcentaje de niños con PCR o neutrófilos elevados fue menor en los menores de 6 meses de edad. Los valores máximos para estos parámetros se alcanzaron en la franja de 12-23 (PCR) y 24-59 (neutrofilia) meses de edad. Del

mismo modo, las medianas de la PCR y del número de neutrófilos fueron más bajas en los menores de seis meses (tabla 28).

**Tabla 28.-** Datos analíticos por grupos de edad en el grupo de VPIH único.

Grupos de edad en meses (n=261)		< 6	6-11	12-23	24-59	≥ 60	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p
PCR elevada	Sí	8 (8,2)	5 (23,8)	8 (42,1)	5 (21,7)	2 (15,4)	0,04*
	No	90 (91,8)	16 (76,2)	11 (57,9)	18 (78,3)	11 (84,6)	
Leucocitos elevados	Sí	26 (26,8)	11 (52,4)	6 (31,6)	8 (34,8)	4 (30,8)	0,26*
	No	71 (73,2)	10 (47,6)	13 (68,4)	15 (65,2)	9 (69,2)	
Neutrófilos elevados	Sí	6 (6,2)	3 (14,3)	4 (21,1)	8 (34,8)	3 (23,1)	<0,05**
	No	91 (93,8)	18 (85,7)	15 (78,9)	15 (65,2)	10 (76,9)	
Grupos de edad en meses (n=261)		< 6	6-11	12-23	23-59	≥ 60	
		Mediana (rango)	Mediana (rango)	Mediana (rango)	Mediana (rango)	Mediana (rango)	p***
PCR		4,05 (-)	12,3 (-)	30 (-)	17 (-)	19,8 (-)	0,00
Leucocitos		11.920 (-)	15.610 (-)	13.460 (-)	10.720 (-)	9.280 (-)	0,29
Neutrófilos		2.800 (-)	5.550 (-)	5.946 (-)	5.550 (-)	8.064 (-)	0,00

R: rango. \* Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson. \*\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher, p=0,00 para la comparación de los grupos <6 meses frente al resto y para la comparación de los grupos 24-59 meses frente al resto, p=0,00. \*\*\* Análisis mediante prueba de Kruskal-Wallis.

**Datos analíticos en hospitalizados.** Los niños hospitalizados presentaron una mayor proporción de casos de PCR elevada respecto a los no hospitalizados. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las medianas de los datos analíticos estudiados (PCR, leucocitos, neutrófilos) entre los niños hospitalizados y los no hospitalizados.



**Tabla 29.-** Datos analíticos en el grupo VPIH único entre los hospitalizados y no hospitalizados.

VPIH único (n=261)		No hospitalizados	Hospitalizados	
		n (%)	n (%)	p
PCR elevada	Sí	1 (2,9)	27 (19,4)	0,02*
	No	34 (97,1)	112 (80,6)	
Leucocitos elevados	Sí	9 (26,5)	46 (33,1)	0,46*
	No	25 (73,5)	93 (66,9)	
Neutrófilos elevados	Sí	2 (5,9)	22 (15,8)	>0,05**
	No	32 (94,1)	117 (84,2)	
VPIH único (n=261)		No hospitalizados	Hospitalizados	
		Mediana (rango)	Mediana (rango)	p***
PCR		6,6 (0,2-81)	8 (0,1-278)	0,24
Leucocitos		11.895 (5.420-18.670)	11.780 (820-35.140)	0,67
Neutrófilos		3.115 (440-13.920)	3.902 (100-23.620)	0,15

\* Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson. \*\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher. \*\*\*Análisis mediante prueba de U de Mann-Whitney.

#### 6.3.4. Radiología

**Datos radiológicos globales.** En la tabla 30 se describen los datos relacionados con el estudio radiológico. Esta exploración complementaria se realizó en el 68,8% de la cohorte infección respiratoria con VPIH. Los pacientes con detecciones virales múltiples presentaron una proporción mayor de radiografías alteradas respecto a aquellos con infección por VPIH único, con diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo las diferencias no se encontraron cuando se analizaron los diferentes tipos de alteraciones, posiblemente por la fragmentación de la muestra.

**Tabla 30.-** Datos radiológicos de la cohorte infección respiratoria y diferencias entre el grupo VPIH único y VPIH múltiple.

VPIH-infección respiratoria (n=551)	VPIH único (n=261)	VPIH múltiple (n=290)	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Rx tórax realizada	171 (65,5)	208 (71,7)	379 (68,8)
<b>Rx tórax alterada</b>			
Ocupación alveolar	35 (20,5)	58 (27,9)	93 (24,5)
Refuerzo de la trama	35 (20,5)	57 (27,4)	92 (24,3)
Atrapamiento aéreo	4 (2,3)	6 (2,9)	10 (2,6)
Refuerzo + atrapamiento	0	2 (1,0)	2 (0,5)
Otros	2 (1,2)	2 (1,0)	4 (1,1)
Subtotal*	76 (44,4)	125 (60,1)	201 (53,0)

Rx: radiografía \*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson ( $p=0,00$ ).

**Datos radiológicos y serotipos.** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el estudio radiológico y los diferentes serotipos (tabla 31) en el grupo de VPIH único.

**Tabla 31.-** Datos radiológicos por serotipo en el grupo de VPIH único.

VPIH único (n=260)	VPIH-1 (n=36)	VPIH-2 (n=28)	VPIH-3 (n=153)	VPIH-4 (n=43)	
<b>Radiografía alterada</b>	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	<b>p*</b>
Sí	10 (47,6)	7 (38,9)	47 (45,6)	11 (39,3)	0,88
No	11 (52,4)	11 (61,1)	56 (54,4)	17 (60,7)	

\* Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson.

**Datos radiológicos por grupos de edades.** Los pacientes menores de seis meses presentaron con menor frecuencia radiografía alterada respecto al resto de subgrupos de edades, y los mayores de 24 meses con mayor frecuencia.

**Tabla 32.-** Datos radiológicos por edades en el grupo VPIH único.

Grupos de edad en meses (n=261)	< 6 (n=148)	6-11 (n=43)	12-23 (n=27)	24-59 (n=29)	≥ 60 (n=14)	
<b>Radiografía alterada</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>p*</b>
Sí	19 (22,6)	14 (45,2)	14 (66,7)	18 (81,8)	11 (84,6)	0,00
No	65 (77,4)	17 (54,8)	7 (33,3)	4 (18,2)	2 (15,4)	

\* Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson.

**Datos radiológicos en hospitalizados.** La proporción de casos hospitalizados con radiografía alterada fue mayor que la de los niños no hospitalizados, siendo las diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 33.-** Datos radiológicos en el grupo VPIH único entre los hospitalizados y no hospitalizados.

VPIH único (n=261)	No hospitalizados	Hospitalizados	
<b>Radiografía alterada</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>p*</b>
Sí	14 (28,0)	62 (51,2)	0,01
No	36 (72,0)	59 (48,8)	

\* Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson.

### 6.3.5. Diagnósticos

#### Diagnósticos al alta en global

Los diagnósticos de alta que recibieron los pacientes se agruparon en distintas patologías, como se muestra en la tabla 34, donde constan las frecuencias de cada una en general y en función de la detección de VPIH único o en forma de codetección con otros virus.

Los diagnósticos al alta más frecuentes fueron por este orden la infección de vías respiratorias superiores (n=111), la bronquiolitis (n=111), la bronquitis/neumonía (n=102) y el asma (n=89).

La infección de vía respiratoria superior, el síndrome febril y los episodios de apnea se observaron con mayor frecuencia en el caso de los VPIH únicos, mientras que la laringitis y el asma fueron más frecuentes en los pacientes con codetecciones virales. Sin embargo, al

realizar el análisis multivariante, incluyendo la edad, únicamente se confirmó la significación estadística para el síndrome febril, los episodios de apnea y las infecciones de vías respiratorias superiores.

**Tabla 34.-** Relación entre el diagnóstico de alta y el grupo de VPIH único y VPIH múltiple.

VPIH-infección respiratoria (n=551)	VPIH único (n=261)	VPIH múltiple (n=290)	Total	Análisis univariante	Análisis multivariante
Diagnósticos	n (%)	n (%)	n (%)	p	p (OR IC 95%)
IVRS	67 (25,7)	44 (15,2)	111 (20,1)	0,00*	0,00 (0,323-787)
Bronquitis/neumonía	42 (16,1)	60 (20,7)	102 (18,5)	0,17*	-
Bronquiolitis	55 (21,1)	56 (19,3)	111 (20,1)	0,61*	-
Laringitis	3 (1,1)	15 (5,2)	18 (3,3)	0,01**	>0,05
Asma	32 (12,3)	57 (19,7)	89 (16,2)	0,02*	>0,05
Síndrome febril	34 (13,0)	22 (7,6)	56 (10,2)	0,03*	0,01 (0,260-0,831)
Episodio de apnea	13 (5,0)	4 (1,4)	17 (3,1)	0,02**	0,02 (0,080-0,794)
Patología gastrointestinal	2 (0,8)	7 (2,4)	9 (1,6)	0,18**	-
Patología neurológica	5 (1,9)	11 (3,8)	16 (2,9)	0,19*	-
Otros	8 (3,1)	14 (4,8)	22 (4,0)	0,29*	-

IVRS: infección de vía respiratoria superior. \*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson. \*\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher.

**Diagnósticos al alta por serotipos.** En los episodios con diagnóstico de bronquitis/neumonía se detectó con menor frecuencia el serotipo VPIH-1 respecto al resto de serotipos. Por otra parte, los episodios de apnea fueron observados más frecuentemente entre niños con serotipo VPIH-2 que con el resto. Para los demás diagnósticos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (tabla 35).

**Tabla 35.-** Distribución de los diagnósticos al alta por serotipo en el grupo de VPIH único.

VPIH único (n=260)	VPIH-1 (n=36)	VPIH-2 (n=28)	VPIH-3 (n=153)	VPIH-4 (n=43)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p
IVRS	12 (33,3)	6 (21,4)	40 (26,1)	9 (20,9)	0,6*
Bronquitis/neumonía	1 (2,8)	4 (14,3)	27 (17,6)	10 (23,3)	<0,05 <sup>π</sup>
Bronquiolitis	9 (25,0)	4 (14,3)	30 (19,6)	12 (27,9)	0,47*
Laringitis	0	1 (3,6)	2 (1,3)	0	>0,05**
Asma	6 (16,7)	1 (3,6)	20 (13,1)	4 (9,3)	>0,05**
Síndrome febril	6 (16,7)	7 (25,0)	15 (9,8)	6 (14,0)	0,15*
Episodios de apnea	0	4 (14,3)	8 (5,2)	1 (2,3)	<0,05 <sup>Ω</sup>
Patología gastrointestinal	0	0	2 (1,3)	0	-
Patología neurológica	0	0	5 (3,3)	0	-
Otros	2 (5,6)	1 (3,6)	4 (2,6)	1 (2,3)	-

IVRS: infección de vía respiratoria superior. \*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson. \*\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher. π:prueba exacta de Fisher, p=0,01 para la comparación de los grupos VPIH-1 frente al resto de serotipos. Ω:prueba exacta de Fisher, p=0,04 para la comparación de los grupos VPIH-2 frente al resto de serotipos.

**Diagnósticos al alta por edades.** Los pacientes diagnosticados de episodios de apnea, infección de vía respiratoria superior, bronquiolitis y síndrome febril, presentaron una mediana de edad menor respecto a los niños diagnosticados de bronquitis/neumonía, asma o laringitis, con diferencias estadísticamente significativas (tabla 36).

**Tabla 36.-** Diagnósticos al alta y edad media en el grupo de VPIH único.

VPIH único (n=261)	Mediana de edad	Rango	p*
Episodios de apnea	1	0-18	0,00
Infección vía respiratoria superior	2	0-177	
Bronquiolitis	2	0-11	
Síndrome febril	2	0-52	

Patología gastrointestinal	8	4-12
Otros	9	0-96
Bronquitis/neumonía	12	0-79
Laringitis	16	10-23
Asma	17	2-126
Patología neurológica	26	8-88

\*Análisis mediante prueba de Kruskal Wallis.

Los diagnósticos de infección de vía respiratoria superior, episodios de apnea y bronquiolitis se efectuaron con mayor frecuencia en los menores de seis meses. El diagnóstico de asma fue significativamente mayor en los mayores de 60 meses y significativamente menor en los menores de seis meses. La laringitis presentó mayor frecuencia entre los pacientes con edad entre 12 y 23 meses. El diagnóstico de bronquitis/neumonía fue significativamente más frecuente en los pacientes mayores de 24 meses (tabla 37).

Los casos observados con diagnóstico al alta de patología neurológica y patología gastrointestinal fueron escasos por lo que no pudieron realizarse comparaciones válidas. Para el resto de diagnósticos al alta no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en función de la edad.

**Tabla 37.-** Distribución de los diagnósticos de alta por grupos de edad en el grupo de VPIH único.

Grupos de edad en meses (n=261)	< 6 (n=148)	6-11 (n=43)	12-23 (n=27)	24-59 (n=29)	≥ 60 (n=14)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p
IVRS	49 (33,1)	7 (16,3)	6 (22,2)	4 (13,8)	1 (7,1)	0,02*
Bronquitis/neumonía	16 (10,8)	5 (11,6)	7 (25,9)	10 (34,5)	4 (28,6)	0,01*
Bronquiolitis	42 (28,4)	13 (30,2)	0	0	0	<0,05 <sup>π</sup>
Laringitis	0	1 (2,3)	2 (7,4)	0	0	<0,05 <sup>Ω</sup>
Asma	4 (2,7)	8 (18,6)	7 (25,9)	6 (20,7)	7 (50,0)	0,00*
Síndrome febril	21 (14,2)	5 (11,6)	2 (7,4)	6 (20,7)	0	>0,05**
Episodios de apnea	12 (8,1)	0	1 (3,7)	0	0	<0,05 <sup>φ</sup>

Patología gastrointestinal	1 (0,7)	0	1 (3,7)	0	0	-
Patología neurológica	0	1 (2,4)	1 (3,3)	2 (9,5)	1 (5,9)	-
Otros	3 (2,0)	3 (7)	0	1 (3,4)	1 (7,1)	-

IVRS: Infección de vía respiratoria superior. \*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson.  $\pi$ :prueba exacta de Fisher,  $p=0,00$  para la comparación de los grupos <6 meses frente al resto de edades.  $\Omega$ :prueba exacta de Fisher,  $p=0,04$  para la comparación de los grupos <12-23 meses frente al resto de las edades.  $\phi$ :prueba exacta de Fisher,  $p=0,01$  para la comparación de los grupos <6 meses frente al resto de edades. \*\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher ( $p>0,05$ ).

**Diagnósticos en hospitalizados versus no hospitalizados.** La mayoría de los casos diagnosticados de infección de vías respiratorias superiores no fueron hospitalizados. Una mayor proporción de episodios con diagnóstico de bronquitis/neumonía, apnea y asma fueron hospitalizados. Para el resto de diagnósticos al alta no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hospitalizados y no hospitalizados.

**Tabla 38.-** Distribución de los diagnósticos de alta entre hospitalizados y no hospitalizados.

VPIH único (n=261)	No hospitalizados (n=119)	Hospitalizados (n=142)	
	n (%)	n (%)	P
IVRS	62 (52,1)	5 (3,5)	0,00*
Bronquitis/neumonía	2 (1,7)	40 (28,2)	0,00**
Bronquiolitis	24 (20,2)	31 (21,8)	0,74*
Laringitis	0	3 (2,1)	0,25**
Asma	9 (7,6)	23 (16,2)	0,03*
Síndrome febril	19 (16,0)	15 (10,6)	0,2*
Episodios de apnea	2 (1,7)	11 (7,7)	0,04**
Patología gastrointestinal	0	2 (1,4)	0,5**
Patología neurológica	1 (0,8)	4 (2,8)	0,4**
Otros	0	8 (5,6)	0,01**

IVRS: Infección de vía respiratoria superior. \*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson. \*\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher.

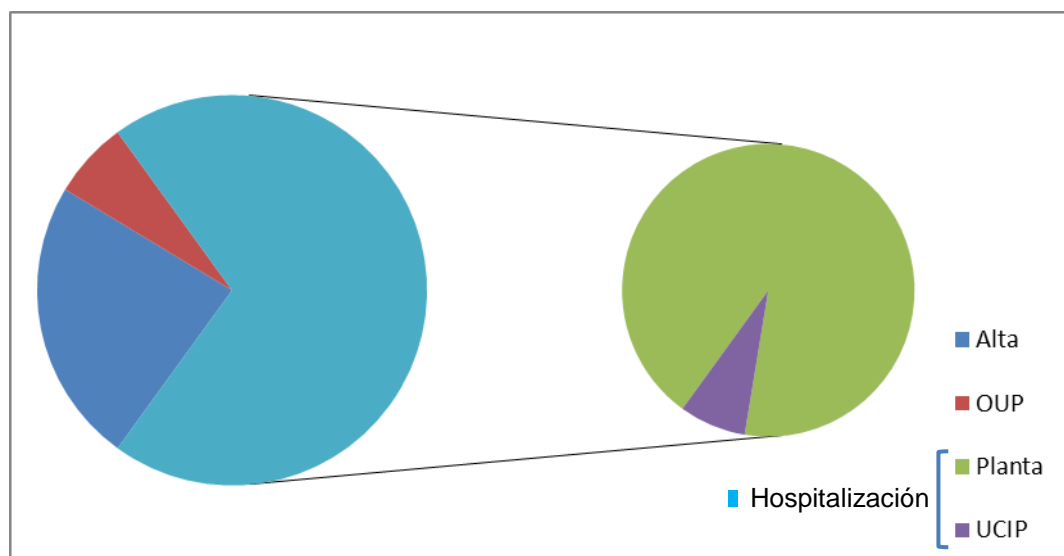
### 6.3.6. Impacto sanitario

#### 6.3.6.1. Hospitalización

Del total de 551 episodios atendidos en el HUD, mayoritariamente en el área de Urgencias de Pediatría (figura 29):

- 315 (57,2%) ingresaron en planta de hospitalización,
- 50 (9,1%) en observación de urgencias de pediatría (OUP) durante unas horas pudiendo ser dados de alta posteriormente,
- 186 (33,8%) fueron dados de alta, tras la consulta en Urgencias de Pediatría

De los 315 pacientes que ingresaron en planta de hospitalización, 41 (7,4%) ingresaron en la UCIP.



**Figura 29.-** Gráfico de distribución global de la cohorte VPIH-infección respiratoria por destinos asistenciales.

**Distribución de los destinos asistenciales en relación con el tipo de infección (VPIH único o codetección de otros virus), con los serotipos y con la edad.** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se analizó la distribución de los diferentes destinos asistenciales entre las detecciones VPIH únicas y aquellas con codetección de otros virus respiratorios (tabla 39). Del mismo modo, cuando se seleccionaron las infecciones en las que únicamente se detectó VPIH tampoco se encontraron diferencias entre los diferentes destinos asistenciales y los serotipos de VPIH. Por el contrario, en el análisis efectuado por grupos de edad se observó que los niños mayores del año de edad y especialmente los mayores de cinco años en los que se detectaron VPIH, fueron hospitalizados con mayor



frecuencia que los menores de un año de edad, siendo las diferencias estadísticamente significativas. Los pacientes mayores de 60 meses presentaron mayor frecuencia de ingreso en UCIP con diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 39.-** Distribución de los diferentes destinos asistenciales de la cohorte de infección respiratoria en función de tres criterios: infecciones con detección VPIH único o con codetección de otros virus, serotipo y grupos de edad.

VPIH-infección respiratoria	Alta directa n (%)	Observación n (%)	Hospitalización n (%)	UCIP n (%)
<b>Tipo de infección (n=551)</b>				
VPIH único (n=261)	96 (36,8)	23 (8,8)	142 (54,4)	15 (5,7)
VPIH múltiple (n=290)	90 (31,0)	27 (9,3)	173 (59,7)	26 (9,0)
<b>p</b>	0,15*	0,88*	0,21*	0,15*
<b>Serotipo (n=260)¥</b>				
VPIH-1 (n=36)	15 (41,7)	3 (8,3)	18 (50,0)	2 (5,6)
VPIH-2 (n=28)	7 (25,0)	3 (10,7)	18 (64,3)	2 (7,1)
VPIH-3 (n=153)	58 (37,9)	12 (7,8)	83 (54,2)	9 (5,9)
VPIH-4 (n=43)	16 (37,2)	5 (11,6)	22 (51,2)	2 (4,7)
<b>p</b>	0,55*	0,86*	0,67*	>0,05**
<b>Grupos de edad (meses) (n=261)</b>				
<6 (n=148)	58 (39,2)	15 (9,9)	75 (50,7)	7 (4,7)
6-11 (n=43)	21 (48,8)	4 (9,8)	18 (41,9)	0 (0,0)
12-23 (n=27)	8 (29,6)	3 (10,0)	16 (59,3)	2 (7,4)
24-59 (n=29)	8 (27,6)	1 (4,8)	20 (69,0)	3 (10,3)
> 60 (n=14)	1 (7,1)	0 (0,0)	13 (92,9)	3 (21,4)
<b>p</b>	0,04*	>0,05**	0,00*	<0,05 <sup>π</sup>

UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos. \*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson. \*\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher. π: prueba exacta de Fisher, p=0,04 para la comparación de los grupos >60 meses frente al resto de edades. ¥: Un caso no contabilizado por corresponder a una infección simultánea con dos o más serotipos.

### Carga asistencial en urgencias de pediatría

Como se observa en la tabla 40 por cada 10.000 pacientes atendidos en Urgencias de Pediatría se detectó VPIH aproximadamente en 20 pacientes cada año, con un rango que osciló entre 6 y 22 pacientes al año.

**Tabla 40.-** Incidencia anual estimada de detección de VPIH en pacientes atendidos en Urgencias de Pediatría.

Año	Casos totales de VPIH	Nº urgencias/año	Casos detectados de VPIH/10.000 urgencias
2007*	10	16.355	6,1
2008	70	32.012	21,9
2009	70	33.360	21,0
2010	49	31.955	15,3
2011	68	33.517	20,3
2012	72	33.233	21,6
2013	68	32.142	21,2
2014	45	32.701	13,8
2015	74	32.879	22,5
2016**	25	17.148	14,6
Total	551	528.806	0,1

\*Periodo analizado del 1 de julio de 2007 al 31 de diciembre de 2007. \*\*Periodo analizado del 1 de enero de 2016 al 30 de junio del 2016.

### Incidencia de hospitalización (VPIH único y múltiple) en relación a la edad

Los datos relativos a incidencia media anual de hospitalización (infecciones únicas de VPIH e infecciones con detección viral múltiple) se exponen en la tabla 41. Se observó un descenso progresivo en la hospitalización en relación a la edad desde 34,2 casos/10.000 habitantes en los menores de seis meses de edad a 0,3casos/10.000 habitantes en los de 5-14 años de edad (VPIH únicos). La tendencia fue similar cuando se calculó la incidencia media anual de hospitalización para el VPIH-3 y el resto de serotipos individualizadamente (tabla 42).

**Tabla 41.-** Incidencia media anual (casos/10.000 habitantes) estimada de ingresos hospitalarios en relación a la edad entre julio 2007 y junio 2016.

Edad (meses)	Nº de casos VPIH único	Nº de casos VPIH + codetección viral	Población de referencia (Nº de habitantes)*	Incidencia media anual/10.000h** (VPIH único) (IC95%)	Incidencia media anual/10.000h** (VPIH codetección viral) (IC95%)
<6	75	122	2.435	34,2 (27,3-42,9)	55,7 (46,7-66,4)
6-11	18	60	2.435	8,2 (5,2-13,0)	27,4 (21,3-35,2)
12-23	16	64	4.884	3,6 (2,2-5,9)	14,6 (11,4-18,6)
24-59	20	49	14.927	1,5 (0,9-2,1)	3,6 (2,6-4,5)
>60	13	20	45.828	0,3 (0,2-0,5)	0,5 (0,3-0,8)
Total	142	315	70.509	2,2 (1,9-2,6)	5,0 (4,6-5,6)

\*Población de referencia obtenida del Censo de 2011 del Territorio Histórico de Gipuzkoa para las comarcas atendidas por el HUD: Donostialdea, Tolosaldea, Bidasoa, Urola Costa (excepto Azpeitia, Azkoitia, Errezil y Beizama). Datos obtenidos del EUSTAT.

\*\*Incidencia media en 9 años comprendidos entre julio de 2007 y junio de 2016.

**Tabla 42.-** Incidencia media anual/10.000habitantes de ingresos hospitalarios en relación a la edad por serotipos entre julio 2007 y junio 2016 (teniendo en cuenta todas las detecciones de VPIH).

Edad	VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3	VPIH-4
<6 meses	7,8	7,8	29,2	11
6-11 meses	2,7	0,9	19,6	4,1
12-23 meses	2,3	0,7	7,3	3,9
24-59 meses	0,5	0,5	1,7	0,8
>60 meses	0,12	0,05	0,07	0,2
Total	0,71	0,5	2,6	1,1

### 6.3.6.2. Estancia media

**Estancia media global, por serotipos y grupos de edad.** Los niños hospitalizados estuvieron ingresados una mediana de ocho días (rango 4-90), siendo este valor de 2 días (rango 1-11) para la hospitalización en UCIP. Cuando se analizó la distribución de estos valores entre los pacientes con detección de VPIH único o codetección con otros virus respiratorios no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes serotipos. Sin embargo, cuando se efectuó

el análisis por grupos de edad se observó que los mayores de 60 meses de edad presentaban una estancia media en UCIP mayor al resto de grupos de edad, en el límite de la significación estadística. No hubo diferencias para la estancia media hospitalaria (tabla 43).

**Tabla 43.**- Distribución de los diferentes destinos asistenciales de la cohorte de infección respiratoria en función de tres criterios: infecciones con detección VPIH único o con codetección de otros virus, serotipo y grupos de edad.

<b>VPIH-infección respiratoria (n=551)</b>	<b>Estancia media hospitalaria (días) mediana (rango)</b>	<b>Estancia media en UCIP (días) mediana (rango)</b>
<b>Tipo de infección (n=551)</b>		
VPIH único (n=261)	6 (1-90)	3 (1-11)
VPIH múltiple (n=290)	6 (2-21)	2 (1-6)
<b>p*</b>	0,72	0,33
<b>Serotipo (n=260)¥</b>		
VPIH-1 (n=36)	6 (1-30)	2 (2-2)
VPIH-2 (n=28)	6 (3-10)	6 (2-10)
VPIH-3 (n=153)	6 (2-80)	3 (1-9)
VPIH-4 (n=43)	5 (3-90)	8 (4-11)
<b>p**</b>	0,85	0,36
<b>Grupos de edad (meses) (n=261)</b>		
<6 (n=148)	5 (2-80)	2 (1-5)
6-11 (n=43)	6 (3-28)	0
12-23 (n=27)	6 (3-28)	3 (2-4)
24-59 (n=29)	6 (3-30)	2 (2-8)
> 60 (n=14)	7 (1-90)	10 (9-11)
<b>p**</b>	0,34	0,05

UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos. \* Análisis mediante prueba de U de Mann-Whitney. \*\*Análisis mediante prueba de Kruskal Wallis. ¥: Un caso no contabilizado por corresponder a una infección simultánea con dos o más serotipos

### 6.3.6.3. Antibioticoterapia

**Datos globales sobre antibióticos empleados.** El 42,5% de los casos (n=111) recibieron tratamiento antibiótico. En la siguiente tabla (tabla 44) se muestra la relación de antibióticos recibidos.

**Tabla 44.-** Distribución de los antibióticos en la cohorte VPIH único-infección respiratoria.

Tratamiento	Casos	Porcentaje
Azitromicina	34	30,6
Cefotaxima	24	21,6
Ampicilina + cefotaxima	13	11,7
Azitromicina + cefotaxima	8	7,2
Amoxicilina	8	7,2
Amoxicilina-ac clavulánico	5	4,6
Antibiótico de amplio espectro	2	1,8
Otros	17	15,3
Total	111	100

No hubo diferencias en cuanto al empleo de antibióticos entre los casos con detección de VPIH único y aquellos con detecciones virales múltiples (tabla 45). Sin embargo la mediana de días de uso de antibioticoterapia fue ligeramente mayor entre los casos con codetecciones virales múltiples (mediana 1, rango 0-18) que entre aquellos con infecciones aisladas por VPIH (mediana 0, rango 0-21), siendo las diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p=0,02$ ).

**Tabla 45.-** Empleo de antibioticoterapia en la cohorte VPIH-infección respiratoria y diferencias entre el grupo VPIH único y múltiples.

VPIH-infección respiratoria (n=551)	VPIH único (n=261)	VPIH múltiple (n=290)	Total	
Antibióticos	n (%)	n (%)	n (%)	p*
Sí	111 (42,5)	145 (50,0)	256 (46,5)	0,08
No	150 (57,5)	145 (50,0)	295 (53,5)	

\*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson.

**Antibioticoterapia y serotipos de VPIH.** Cuando se analizó la relación entre el empleo de antibioticoterapia y los diferentes serotipos, no se encontraron diferencias significativas cualitativas (empleo de antibióticos) (tabla 46) ni cuantitativas (mediana de cero días para todos los serotipos, con rangos entre 0 y 21) (prueba de Kruskal Wallis,  $p=0,61$ ).

**Tabla 46.-** Antibioticoterapia por serotipos en el grupo de VPIH único.

VPIH único (n=260)	VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3	VPIH-4	
Antibióticos	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p*
Sí	12 (33,3)	13 (46,4)	65 (42,5)	20 (46,5)	0,64
No	24 (66,7)	15 (53,6)	88 (57,5)	23 (53,5)	

\*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson.

**Antibioticoterapia por grupos de edad.** La proporción de menores de seis meses que recibieron antibióticos fue menor y la de pacientes mayores de 24 meses mayor, con diferencias estadísticamente significativas. Se observó una relación inversa entre la mediana de días de administración de antibióticos y la edad, de manera que este valor fue de cero días (rango 0-14) para los niños menores de un año de edad, de cinco días (rango 0-14) para los de la franja etaria de 12-23 meses y de ocho (rango 0-21) y diez días (rango 0-15) para los de 24-59 meses y > 60 meses de edad, respectivamente (prueba de Kruskal Wallis,  $p=0,00$ ).

**Tabla 47.-** Antibioticoterapia por grupos de edad en el grupo de VPIH único.

Grupos de edad en meses (n=261)	< 6	6-11	12-23	24-59	≥ 60	
Antibioticoterapia	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p*
Sí	50 (33,8)	17 (39,5)	15 (55,6)	20 (69,0)	9 (64,3)	0,01
No	98 (66,2)	26 (60,5)	12 (44,4)	9 (31,0)	5 (35,7)	

\*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson.

**Antibioticoterapia y diagnósticos al alta.** Los pacientes con diagnóstico de bronquitis/neumonía y asma recibieron con mayor frecuencia antibióticos y los diagnosticados de infección de vía respiratoria superior y bronquiolitis con menor frecuencia. Los diagnosticados de bronquitis/neumonía tuvieron una mediana de días de tratamiento con antibióticos superior al resto, con diferencias estadísticamente significativas (prueba de Kruskal Wallis,  $p=0,00$ )

**Tabla 48.-** Indicación de antibióticos y duración en los diferentes síndromes clínicos del grupo de infección por VPIH único ( $n=261$ ).

Diagnóstico	n	Uso de antibióticos n (%)	P	Duración de tratamiento antibiótico <sup>¥</sup>
IVRS	67	13 (19,4)	0,00*	0 (rango 0-10)
Bronquitis/neumonía	42	40 (95,2)	0,00**	10 (rango 0-21)
Bronquiolitis	55	10 (18,2)	0,00*	0 (rango 0-11)
Laringitis	3	3 (100)	0,08**	-
Asma	32	21 (65,6)	0,00*	5 (rango 0-15)
Síndrome febril	34	16 (47,1)	0,6*	0 (rango 0-10)
Episodios de apnea	13	3 (23,1)	0,16**	-
Patología gastrointestinal	2	0 (0)	0,51**	-
Patología neurológica	5	1 (20)	0,4**	-
Otros	8	4 (50)	0,73**	0 (rango 0-10)

IVRS: infección de vía respiratoria superior. ¥: mediana y rango en días. \*Análisis mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson. \*\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher.

#### 6.3.6.4. Fiebre

**Distribución de la fiebre en función del tipo de infección (VPIH único o múltiple), serotipos y subgrupos de edad.** A pesar de que la distribución de los días de fiebre presentó diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (VPIH único y múltiple), la mediana fue de un día de fiebre en ambos grupos, por lo que clínicamente las diferencias no son relevantes. Al analizar los días de fiebre por diferentes serotipos no se encontraron diferencias. Y por último en cuanto a los grupos de edad, los pacientes entre 12 y 23 meses presentaron una mediana de días de fiebre mayor respecto al resto de edades, siendo los

pacientes menores de seis meses los que presentaron la menor mediana de días de fiebre (tabla 49).

**Tabla 49.-** Días de fiebre en la cohorte de infección respiratoria en función de tres criterios: infecciones con detección VPIH único o múltiple, serotipo y grupos de edad.

VPIH-infección respiratoria (n=551)	Días de fiebre. Mediana (rango)
<b>Tipo de infección (n=551)</b>	
VPIH único (n=261)	1 (0-10)
VPIH múltiple (n=290)	1 (0-16)
<b>p*</b>	0,00
<b>Serotipo (n=260)‡</b>	
VPIH-1 (n=36)	1 (0-5)
VPIH-2 (n=28)	1 (0-10)
VPIH-3 (n=153)	0 (0-8)
VPIH-4 (n=43)	1 (0-6)
<b>p**</b>	0,25
<b>Grupos de edad (meses) (n=261)</b>	
<6 (n=148)	0 (0-5)
6-11 (n=43)	1 (0-5)
12-23 (n=27)	2 (0-8)
24-59 (n=29)	1 (0-10)
> 60 (n=14)	1 (0-5)
<b>p**</b>	0,00

\*Prueba estadística U de Mann-Whitney \*\*Análisis mediante prueba de Kruskal Wallis. ‡: Un caso no contabilizado por corresponder a una infección simultánea con dos o más serotipos

### 6.3.6.5. Oxigenoterapia

**Distribución de los días de oxigenoterapia en función del tipo de infección (VPIH único o múltiple), serotipos y grupos de edades.** El 25,3% de los casos (n=66) de la cohorte de



infección respiratoria por VPIH recibió oxigenoterapia; 2,7% (n=7) ventilación mecánica no invasiva; y ningún paciente precisó ventilación mecánica invasiva.

Los casos con detección viral múltiple presentaron una mediana de oxigenoterapia mayor que los casos con detección única de VPIH, con diferencias estadísticamente significativas. Al analizar dicha diferencia por serotipos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo en función de los subgrupos de edad, los mayores de 60 meses precisaron más días de oxigenoterapia, con diferencias estadísticamente significativas (tabla 50).

**Tabla 50.-** Días de oxigenoterapia en la cohorte de infección respiratoria en función de tres criterios: infecciones con detección VPIH único o múltiple, serotipo y grupos de edad.

VPIH-infección respiratoria (n=551)	Días de oxigenoterapia. Mediana (rango)
<b>Tipo de infección (n=551)</b>	
VPIH único (n=261)	0 (0-15)
VPIH múltiple (n=290)	2 (0-8)
<b>p*</b>	0,01
<b>Serotipo (n=260)¥</b>	
VPIH-1 (n=36)	1 (0-14)
VPIH-2 (n=28)	0 (0-10)
VPIH-3 (n=153)	0 (0-15)
VPIH-4 (n=43)	1 (0-7)
<b>p**</b>	0,91
<b>Grupos de edad (meses) (n=261)</b>	
<6 (n=148)	0 (0-15)
6-11 (n=43)	1 (0-3)
12-23 (n=27)	2 (0-6)
24-59 (n=29)	1 (0-14)
> 60 (n=14)	4 (0-12)
<b>p**</b>	0,00

\*Prueba estadística U de Mann-Whitney \*\*Análisis mediante prueba de Kruskal Wallis. ¥: Un caso no contabilizado por corresponder a una infección simultánea con dos o más serotipos

### 6.3.7. Expresión clínica de la infección por VPIH

En este apartado se analizan exclusivamente los VPIH únicos (n=261). No se han analizado los comportamientos únicos y mixtos porque, con independencia del resultado, cualquier resultado no podría ser atribuible al VPIH, además de no ser el objetivo de esta Tesis Doctoral.

#### 6.3.7.1. Infección de vías respiratorias superiores

La infección de vías respiratorias superiores (IVRS) fue el diagnóstico más frecuente de los casos de infección por VPIH, representando el 25,7% (n=67) de los episodios. La mediana de edad de este grupo fue de dos meses (rango 0-177).

Los serotipos identificados con diagnóstico al alta de IVRS fueron por orden de frecuencia: VPIH-3 (59,7%), VPIH-1 (17,9%), VPIH-4 (13,4%) y VPIH-2 (9%) (tabla 51).

La detección de la mayor parte de los casos de IVRS ocurrió en menores de seis meses para todos los serotipos, siendo VPIH-3 el serotipo en el que este grupo de edad, aun siendo el principal, tuvo menor peso relativo (67,5%). La comparación de la proporción de niños menores de 6 meses en el serotipo VPIH-3 frente al resto de serotipos agrupados no mostró diferencias estadísticamente significativas (Ji cuadrado de Pearson,  $p=0,2$ ), ni tampoco las comparaciones entre serotipos en los restantes grupos de edad, si bien debido al escaso número de casos en alguna de las franjas etarias, este análisis es poco valorable.

**Tabla 51.-** Distribución de los serotipos de VPIH en función de la edad, en niños con diagnóstico de infección de vía respiratoria superior.

IVRS	VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3	VPIH-4	
Edad (en meses)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p*
< 6 (n=49)	10 (83,3)	5 (83,3)	27 (67,5)	7 (77,8)	>0,05
6-11 (n=7)	1 (8,3)	0	5 (12,5)	1 (11,1)	
12-23 (n=6)	0	0	6 (15,0)	0	
24-59 (n=4)	1 (8,3)	1 (16,7)	2 (5,0)	0	
≥ 60 (n=1)	0	0	0	1 (11,1)	
Total (n=67)	12 (100)	6 (100)	40 (100)	9 (100)	

IVRS: infección de vía respiratoria superior. \* Comparaciones intragrupalas realizadas mediante prueba de Ji cuadrado de Pearson o prueba exacta de Fisher.

El 82,1% de los casos (n=55) con diagnóstico de IVRS fueron dados de alta desde Urgencias de Pediatría y el 7,5% (n=5) fueron hospitalizados influyendo en ello la corta edad del paciente, para observación y monitorización además de las medidas de soporte y en dos casos por sospecha de tosferina al ingreso. Ninguno requirió ingreso en la UCIP.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la mediana de edad entre pacientes hospitalizados y no hospitalizados (prueba U de Mann Whitney;  $p= 0,37$ ) (mediana 2; rango 0-11 *versus* mediana 2 rango 0-177).

Tampoco se encontraron diferencias en la distribución de la variable hospitalización en los diferentes serotipos, siendo este valor de 8,3% (1/12), 16,7% (1/6), 7,5% (3/40) y 0% (0/9) para los serotipos VPIH-1 a VPIH-4, respectivamente (prueba exacta de Fisher,  $p>0,05$ ).

En la tabla 52 se han referido los principales datos evolutivos de los pacientes hospitalizados por infección de vía respiratoria superior, que como puede observarse presentaron una buena evolución. Solo un paciente (1,5%) recibió oxigenoterapia y trece (19,4%) tratamiento antibiótico.

**Tabla 52.-** Datos evolutivos de los pacientes hospitalizados por infección de vía respiratoria superior.

IVRS	Mediana (días)	Rango
Estancia media hospitalaria (n=5)	5	4-10
Estancia media en UCIP	-	-
Días totales de fiebre	0	0-1
Días de oxigenoterapia (n=5)	0	0-2
Días de antibioterapia	0	0-10

IVRS: infección de vía respiratoria superior. UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos.

### 6.3.7.2. Bronquiolitis

La bronquiolitis fue el segundo diagnóstico más frecuente, correspondiendo al 21,1% (n=55) de los episodios de infección por VPIH. La mediana de edad de este grupo fue de dos meses (rango 0-11).

Los serotipos más frecuentemente identificados por orden de frecuencia fueron: VPIH-3 (54,5%), VPIH-4 (21,8%), VPIH-1 (16,4%) y VPIH-2 (7,3%) (tabla 53).

La mayor parte de los casos (78,2%) fueron menores de 6 meses y todos menores de 12 meses. Entre los pacientes menores de 6 meses el serotipo VPIH-3 fue el más frecuentemente asociado a bronquiolitis. Los serotipos VPIH-1 y VPIH-2 se encontraron únicamente en menores de 6 meses (tabla 53).

**Tabla 53.-** Distribución de los serotipos de VPIH en función de los grupos de edad con diagnóstico de bronquiolitis.

Bronquiolitis	VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3	VPIH-4	
Edad (en meses)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p
< 6 (n=42)	9 (100,0)	4 (100,0)	19 (63,3)	10 (83,3)	0,02*
6-11 (n=13)	0	0	11 (36,7)	2 (16,7)	>0,05**
12-23 (n=0)	0	0	0	0	
24-59 (n=0)	0	0	0	0	
≥ 60 (n=0)	0	0	0	0	
Total (n=55)	9 (100)	4 (100)	30 (100)	12 (100)	

\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher para la comparación de VPIH-3 frente al resto de serotipos. \*\* Análisis mediante prueba exacta de Fisher.

El 56,4% (n= 31) de los casos ingresaron en planta de hospitalización. De los pacientes dados de alta desde Urgencias de Pediatría (n=24), seis (10,9%) requirieron ingreso en OUP durante unas horas antes de ser dados de alta a domicilio. Dos pacientes (3,6%), ambos de un mes de edad, precisaron asistencia en UCIP para soporte respiratorio.

Los pacientes hospitalizados presentaron una mediana de edad (en meses) menor que los no hospitalizados, con diferencia estadísticamente significativa (prueba U de Mann Whitney, p= 0,01) (mediana 1; rango 0-11 *versus* mediana 4 rango 1-10).

No se encontraron diferencias en la proporción de niños hospitalizados en relación a los serotipos infectantes, siendo este valor de 66,7% (6/9), 75,0% (3/4), 53,3% (16/30) y 50,0% (6/12) para los serotipos VPIH-1 a VPIH-4, respectivamente (prueba exacta de Fisher, p>0,05).

En la tabla 54 se señalan las variables pronóstico o de evolución de los pacientes ingresados por bronquiolitis. Entre los pacientes con esta entidad el 18,2% (n=10) recibieron antibioticoterapia y el 32,7% (n=18) precisaron oxigenoterapia.

**Tabla 54.-** Variables de evolución relacionadas con el diagnóstico de bronquiolitis.

Bronquiolitis	Mediana (días)	Rango
Estancia media hospitalaria (n=31)	5	3-10
Estancia media en UCIP (n=2)	3	2-4
Fiebre	0	0-5
Oxigenoterapia (n=31)	1	0-7
Antibióticos	0	0-11

UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos.

### 6.3.7.3. Bronquitis/Neumonía

Fue el tercer diagnóstico más frecuente, 16,1% (n=42), concretamente en 18 casos neumonía y en 24 bronquitis. La mediana de edad de este grupo fue de 11,5 meses (rango 0-79). Los serotipos aislados fueron por orden de frecuencia: VPIH-3 (64,3%), VPIH-4 (23,8%), VPIH-2 (9,5%) y VPIH-1 (2,4%) (tabla 55).

Una proporción importante de los casos de bronquitis/neumonía se encontró entre los niños de mayor edad, siendo el 61,9% mayores de 6 meses y el 50% mayores de 12 meses de edad. No se observaron en este grupo menores de un año de edad infectados con los serotipos VPIH-1 y VPIH-2, si bien en el caso del serotipo VPIH-3 el porcentaje de casos detectados en menores de un año representó el 55,5% de los episodios de bronquitis/neumonía (prueba exacta de Fisher,  $p > 0,05$ ) siendo este porcentaje 60% en el caso del serotipo VPIH-4 (prueba exacta de Fisher,  $p > 0,05$ ).

**Tabla 55.-** Distribución de los serotipos de VPIH en relación a los grupos de edad con diagnóstico de bronquitis/neumonía.

Bronquitis/Neumonía	VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3	VPIH-4	
Edad (en meses)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p
<6 (n=16)	0	0	10 (37,0)	6 (60,0)	>0,05*
7-12 (n=5)	0	0	5 (18,5)	0	
13-24 (n=7)	1 (100,0)	0	5 (18,5)	1 (10,0)	
25-60 (n=10)	0	3 (75,0)*	5 (18,5)	2 (20,0)	

>60 (n=4)	0	1 (25,0)	2 (7,5)	1 (10,0)	
Total (n=42)	1 (100)	4 (100)	27 (100)	10 (100)	

\*Análisis mediante prueba exacta de Fisher.

La práctica totalidad (n=40) (95,2%) de los pacientes con diagnóstico de bronquitis ó neumonía ingresaron en planta de hospitalización. Cuatro casos (9,8%) precisaron asistencia en la UCIP, para soporte respiratorio, presentando tres pacientes comorbilidad neurológica.

Los dos pacientes no hospitalizados con este diagnóstico presentaron detección para el serotipo VPIH-3.

En la tabla 56 se señalan las variables evolutivas de los pacientes con bronquitis/neumonía. El 95,2% (n=40) de los pacientes con esta entidad recibieron antibióticos y el 47,6% (n=20) oxigenoterapia (en cánulas nasales, oxigenoterapia de alto flujo o mediante ventilación mecánica no invasiva).

**Tabla 56.-** Variables de evolución en los pacientes con diagnóstico de bronquitis/neumonía.

Bronquitis/Neumonía	Mediana (días)	Rango
Estancia media hospitalaria (n=40)	5	2-90
Estancia media en UCIP (n=4)	9	2-11
Fiebre	1	0-10
Oxigenoterapia (n=40)	0	0-12
Antibioterapia	10	0-21

UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos.

#### 6.3.7.4. Síndrome febril

El cuarto diagnóstico más frecuente fue el síndrome febril (13%) (n=34). La mediana de edad de este grupo fue de dos meses (rango 0-52).

Los serotipos detectados por orden de frecuencia fueron: VPIH-3 (44,1%), VPIH-2 (20,6%) y VPIH-1 (17,6%) y VPIH-4 (17,6%) (tabla 57).

La distribución por grupos de edad fue bastante similar para los diferentes serotipos, correspondiendo más del 50% de los casos de cada serotipo a menores de 6 meses de edad, excepto para el serotipo VPIH-3 (46,7%), que se situó ligeramente por debajo de dicho valor.

**Tabla 57.-** Distribución de los serotipos de VPIH en relación a los grupos de edad con diagnóstico de síndrome febril.

Síndrome febril	VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3	VPIH-4	
Edad (en meses)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p*
< 6 (n=21)	4 (66,7)	6 (85,7)	7 (46,7)	4 (66,7)	--
6-11 (n=5)	1 (16,7)	0	3 (20,0)	1 (16,7)	
12-23 (n=2)	0	0	2 (13,3)	0	
24-59 (n=6)	1 (16,7)	1 (14,3)	3 (20,0)	1 (16,7)	
≥ 60 (n=0)	0	0	0	0	
Total (n=34)	6 (100)	7 (100)	15 (100)	6 (100)	

\*Los datos estadísticos no son valorables debido al bajo número de pacientes.

El 44,1% (n=15) de estos niños ingresaron en planta de hospitalización. Todos excepto dos pacientes tenían un mes de vida.

Un paciente (2,9%), de un mes de edad, requirió ingreso en la UCIP durante 36 horas por presentar afectación del estado general. Entre los pacientes dados de alta desde Urgencias de Pediatría cuatro (21,0%) ingresaron en OUP durante unas horas.

Los hospitalizados presentaron una mediana de edad menor a los no hospitalizados siendo la diferencia estadísticamente significativa (prueba U de Mann Whitney,  $p=0,01$ ) (mediana 1, rango 0-52 *versus* mediana 7, rango 0-48).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se analizó la proporción de hospitalizados en los diferentes serotipos VPIH-1 a VPIH-4 (3/6 VPIH-1, 4/7 VPIH-2, 6/15 VPIH-3, 2/6 VPIH-4) (prueba exacta de Fisher,  $p>0,05$ ).

En la tabla 58 se muestran las variables asociadas a las hospitalizaciones en este grupo diagnóstico. El 47,1% (n=16) recibieron tratamiento con antibióticos, únicamente el paciente ingresado en UCIP recibió oxigenoterapia durante 24 horas.

**Tabla 58.-** Variables de evolución en los casos diagnosticados de síndrome febril.

Síndrome febril	Mediana (días)	Rango
Estancia media hospitalaria (n=15)	6,1 <sup>¥</sup>	5,1 <sup>α</sup>
Estancia media en UCIP (n=1)	-	-
Fiebre	2	1-5
Oxigenoterapia (n=15)	0	0-2
Antibióticos	10	0-10

UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos. ¥ y α: Media y desviación estándar, respectivamente (distribución normal).

### 6.3.7.5. Asma

Esta entidad englobó el 12,3% (n=32) de los casos. La mediana de edad fue de 16,5 meses (rango 2-126). Los serotipos detectados en los casos con diagnóstico de asma, por orden de frecuencia, fueron: VPIH-3 (62,5%), VPIH-1 (18,8%), VPIH-4 (12,5%), VPIH-2 (3,1%), siendo en un caso (3,1%) codetectados los serotipos 1 y 2 (tabla 59).

Debido al pequeño tamaño de los subgrupos correspondientes a los diferentes serotipos, y a la dispersión de los casos entre edades, no se pudo estudiar con fiabilidad en este contexto, una relación entre serotipos y grupos de edad, excepto en el caso del VPIH-3, que mostró una distribución homogénea en todos los grupos de edad a excepción de los mayores de 60 meses, en los que no se detectó ninguno. Entre los pacientes mayores de 60 meses hubo el mismo número de casos para el serotipo VPIH-1 y VPIH-4 pero el porcentaje relativo del VPIH-4 fue mayor respecto al resto de grupos con diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 59.-** Distribución de los serotipos por grupos de edad en los casos diagnosticados de asma.

Asma	VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3	VPIH-4	
Edad (en meses)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p
< 6 (n=4)	1 (16,7)	0	3 (15,0)	0	>0,05*
6-11 (n=8)	0	0	7 (35,0)	1 (25,0)	
12-23 (n=7)	1 (16,7)	0	6 (30,0)	0	
24-59 (n=6)	1 (16,7)	1 (100,0)	4 (20,0)	0	



≥ 60 (n=6)	3 (50,0)	0	0	3 (75,0)	0,02 <sup>π</sup>
Total (n=31)	6 (100)	1 (100)	20 (100)	4 (100)	

\*Comparaciones intragrupalas mediante la prueba exacta de Fisher. π: prueba exacta de Fisher para la comparación de VPIH-4 en mayores de 60 meses frente al resto de serotipos y subgrupos de edad.

El 71,9% (n=23) de los casos ingresó en planta de hospitalización, requiriendo el 9,4% (n=3) ingreso en la UCIP para soporte respiratorio. Dos casos presentaron comorbilidad neurológica asociada y precisaron ventilación mecánica no invasiva. El 12,5% (n=4) ingresó durante unas horas en OUP siendo dado de alta posteriormente.

La mediana de edad de los niños hospitalizados fue mayor que la de los no hospitalizados (p=0,01) (mediana 26, rango 2-126 *versus* mediana 10, rango 2-19). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre hospitalización y serotipos.

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se analizó la proporción de hospitalizados en los diferentes serotipos VPIH-1 a VPIH-4 (5/6 VPIH-1, 1/1 VPIH-2, 13/20 VPIH-3, 3/4 VPIH-4) (prueba exacta de Fisher, p>0,05).

De los pacientes con diagnóstico de asma, el 65,6% (n=21) recibieron tratamiento con antibióticos y el 62,5% (n=20) recibieron oxigenoterapia, en la siguiente tabla (tabla 60) pueden observarse los datos evolutivos de estos pacientes.

**Tabla 60.-** Variables de evolución en los diagnosticados de asma.

Asma	Mediana (días)	Rango
Estancia media hospitalaria (n=23)	6	3-30
Estancia media en UCIP (n=3)	2	2-4
Fiebre	1	0-5
Oxigenoterapia (n=23)	3	0-14
Antibióticos	5	0-15

UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos.

### 6.3.7.6. Episodios de apnea

El 5% (n=13) de los casos presentaron episodios de apnea. La mediana de edad fue de un mes (rango 0-18) y la mayoría de los casos (12/13) (92,3%) ocurrieron en lactantes menores de seis meses. El serotipo VPIH-3 fue el serotipo predominante en este grupo (8 casos) (61,5%) debido a su mayor frecuencia global, sin embargo en el contexto de infecciones por el serotipo VPIH-2 (4 casos), éste se asoció con mayor frecuencia a apnea como se describe en el apartado 6.3.5 (ver tabla 35). No se encontró ningún caso del serotipo VPIH-1. El único caso detectado fuera de la franja etaria de menores de 6 meses de edad fue del serotipo VPIH-3.

El 84,6% de los episodios de apnea (n=11) ingresaron en planta de hospitalización. Dos casos, en el contexto de infecciones por VPIH-2 y VPIH-4 respectivamente (de 0 meses de edad ambos) no fueron hospitalizados. Tres pacientes (23,1%) ingresaron en la UCIP para soporte respiratorio.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mediana de edad de los pacientes hospitalizados y los no hospitalizados (prueba U de Mann-Whitney,  $p=0,10$ ) (mediana 1, rango 0-18 *versus* mediana 0, rango 0-0). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas al analizar la distribución de los niños hospitalizados con el serotipo VPIH-3 (8/8) frente al resto (3/5) (prueba exacta de Fisher,  $p=0,13$ ) (se agruparon debido al pequeño número de casos. 0/1).

De los pacientes diagnosticados de episodio de apnea, tres recibieron antibioterapia y cuatro oxigenoterapia por episodios repetidos de pausas respiratorias. En la tabla 61 se señalan las variables relacionadas con los casos ingresados por episodios de apneas.

**Tabla 61.-** Variables de evolución en los diagnósticos de episodios de apnea.

Apnea	Mediana (días)	Rango
Estancia media hospitalaria (n=11)	6	3-20
Estancia media en UCIP (n=3)	2	2-4
Fiebre	-	-
Oxigenoterapia (n=11)	0	0-10
Antibióticos	0	0-9

UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos.

### 6.3.7.7. Laringitis

Tres casos (1,1%) fueron diagnosticados de laringitis, correspondiendo a niños de 10, 16 y 23 meses de edad. En dos de ellos se detectó VPIH-3 y en uno VPIH-2. Los tres ingresaron en planta de hospitalización y recibieron tratamiento antibiótico. Un paciente necesitó oxigenoterapia durante un día.

Para esta entidad clínica, y por la relación histórica existente entre virus parainfluenza y laringitis puesta de manifiesto en la revisión académica efectuada en la Introducción de esta Tesis, se realizó un estudio adicional de todos los casos de la serie correspondieran a infecciones únicas o mixtas (es decir, sin excluir las detecciones virales múltiples), obteniéndose un porcentaje de 3,3% de los casos (n=18) con diagnóstico de laringitis en la serie total (n=551). La mediana de edad de este grupo fue de 15 meses (rango 1-80). Los serotipos identificados fueron los siguientes: VPIH-1 (44,4%), VPIH-3 (27,8%), VPIH-4 (16,7%), VPIH-2 (5,6%) y un caso de infección mixta con los serotipos VPIH-1 y VPIH-4 (5,6%) (tabla 62). La proporción de casos de laringitis fue mayor entre infectados con el VPIH-1 que con los serotipos VPIH-3 y VPIH-4 (8/76 para el VPIH-1 [referencia]; 1/52 para el VPIH-2, Fisher exact test 0,08; 5/303 para el VPIH-3, Fisher exact test 0,00; 3/114 para el VPIH-4, Fisher exact test 0,02).

La mayoría de los casos fueron niños mayores de 12 meses, sobre todo entre 12-23 meses (tabla 62).

**Tabla 62.-** Distribución de los grupos de edad por serotipos en los casos diagnosticados de laringitis.

Laringitis	VPIH-1	VPIH-2	VPIH-3	VPIH-4	
Edad (en meses)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	p*
< 6 (n=1)	0	0	0	1 (33,3)	--
6-11 (n=4)	2 (25,0)	0	1 (20,0)	1 (33,3)	
12-23 (n=9)	5 (62,5)	1 (100,0)	3 (60,0)	0 (0,0)	
24-59 (n=2)	1 (12,5)	0	1 (20,0)	0	
≥ 60 (n=1)	0	0	0	1 (33,3)	
Total (n=17)	8 (100)	1 (100)	5 (100)	3 (100)	

\*Los datos estadísticos no son valorables debido al limitado número de pacientes.

Doce niños (66,7%) de este grupo ingresaron en planta de hospitalización y siete (38,9%) requirieron ingreso en la UCIP, correspondiendo tres al serotipo VPIH-1 (37,5% sobre los casos del serotipo VPIH-1), dos al VPIH-3 (40% sobre los casos del serotipo VPIH-3), uno al VPIH-2 (solo hubo un caso de este serotipo y fue hospitalizado) y uno al serotipo VPIH-4 (33,3% sobre los casos del serotipo VPIH-3). Tres pacientes ingresaron durante unas horas en el área de OUP.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la mediana de edad entre pacientes hospitalizados y no hospitalizados (prueba U de Mann-Whitney,  $p= 0,32$ ) (mediana 16, rango 9-80 *versus* mediana 15, rango 1-18).

Tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas cuando se analizó la proporción de hospitalizados en los diferentes serotipos VPIH-1 a VPIH-4 (VPIH-1 5/8, VPIH-2 1/1, VPIH-3 4/5, VPIH-4 2/3) (prueba exacta de Fisher,  $p>0,05$ ).

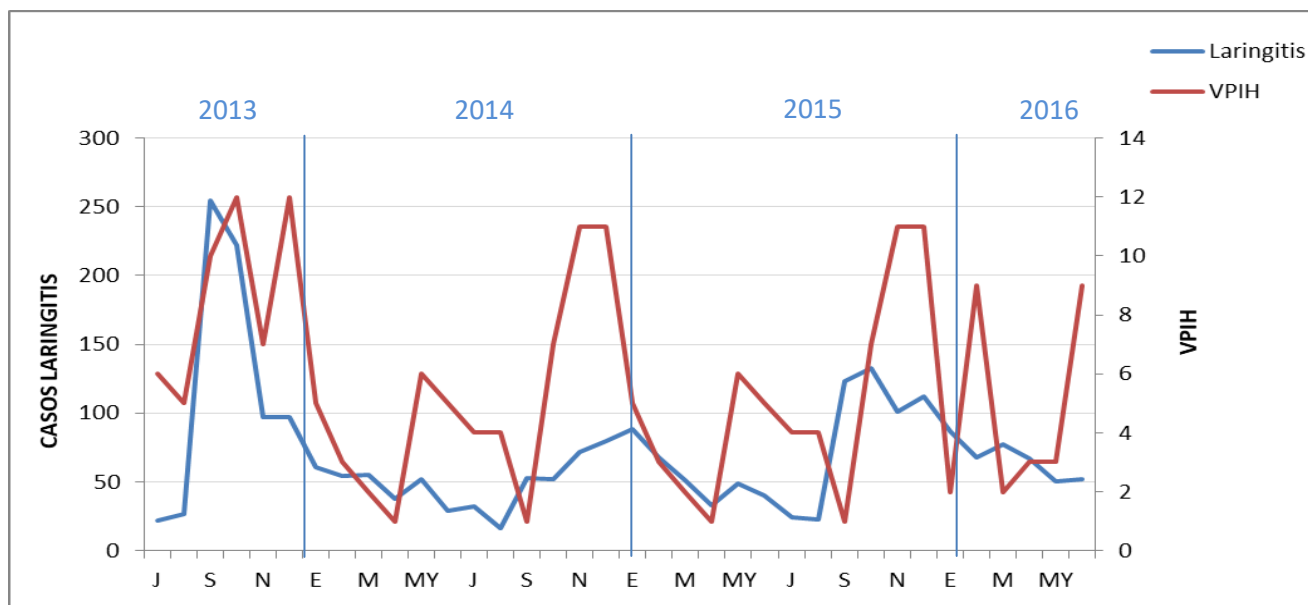
En la tabla 63 se muestran los datos de las hospitalizaciones por laringitis con detecciones virales múltiples.

**Tabla 63.-** Variables evolutivas de los pacientes con diagnóstico de laringitis.

Laringitis	Mediana (días)	Rango
Estancia media hospitalaria (n=12)	5	4-7
Estancia media en UCIP (n=7)	2	2-3
Fiebre	1	0-3
Oxigenoterapia (n=12)	0,5	0-6
Antibióticos	6,5	0-12

UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos.

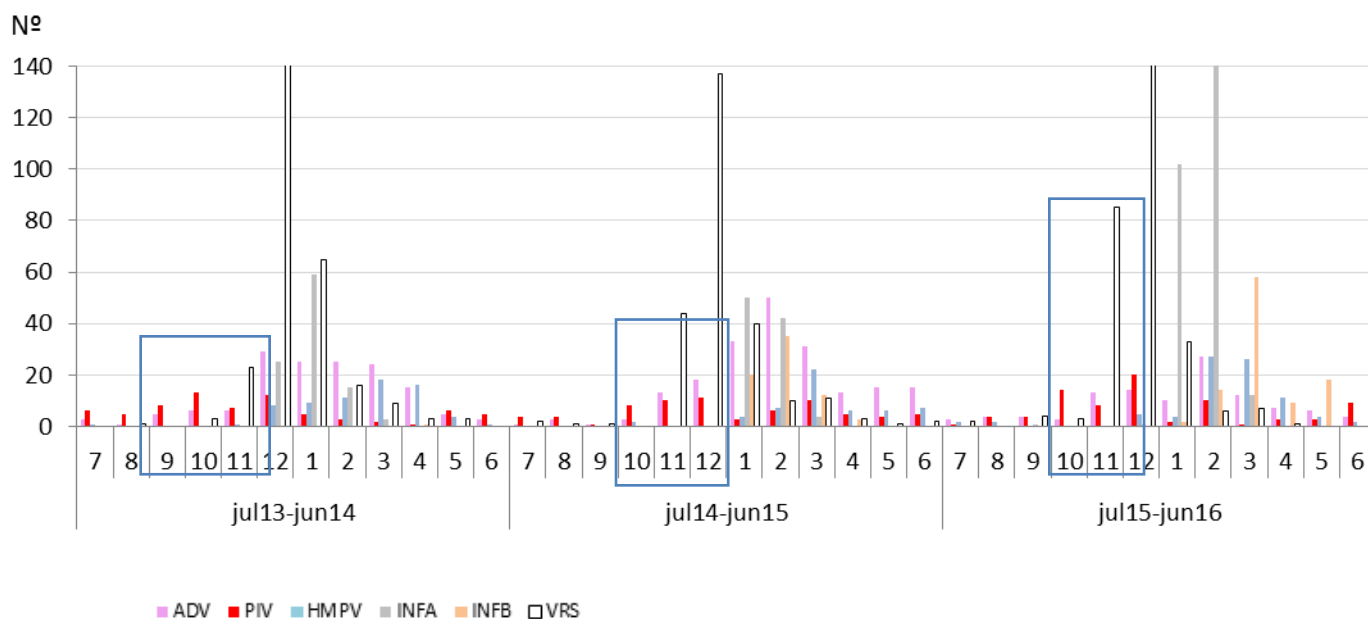
Dado que en la mayoría de los casos de laringitis en el Servicio de Urgencias de Pediatría no se obtiene muestra nasofaríngea para análisis microbiológico, hemos realizado una inferencia entre los casos diagnosticados de laringitis en el HUD desde el 1 de julio de 2013 y el 30 de junio de 2016 y de los virus circulantes más frecuentemente asociados con laringitis durante ese periodo de tiempo (figura 30).



**Figura 30.-** Circulación mensual de VPIH y distribución mensual de casos de laringitis desde el 1-7-2013 hasta el 30-6-2016.

Los datos no ponen de manifiesto una relación directa. Sin embargo, los dos aumentos de frecuencia de casos de laringitis más claros, superando los 100 casos/mes en Urgencias de Pediatría, fueron observados en los meses 3-5 y 27-29 de la serie y correspondieron con picos de detección de VPIH, concretamente durante los otoños de los años 2013 y 2015 (figura 30), en los que, como se ha referido en el apartado 6.1.2.4 se observaron incrementos en la circulación de VPIH-1 y en menor medida, VPIH-2. Los datos son, por tanto, sugestivos de una relación entre la intensificación de la circulación de los serotipos VPIH-1 y VPIH-2 y el número de niños atendidos por laringitis en Urgencias de Pediatría. En la serie de casos de laringitis se aprecia un tercer incremento en el número de casos diagnosticados en el Servicio de Urgencias de Pediatría (figura 30), pero no queda claro, debido a su menor intensidad (escasa diferencia con la situación basal) y a la falta de inicio abrupto.

Los periodos de incremento en el diagnóstico de laringitis no correspondieron con incrementos en la circulación de adenovirus, VRS, influenza A y B y metapneumovirus humanos (figura 31).



**Figura 31.-** Circulación de otros virus respiratorios desde el 1-7-2013 al 30-6-2016 (marcado con un rectángulo los periodos de aumento de casos de laringitis).

### 6.3.7.8. Patología gastrointestinal

Dos casos (0,8%) fueron diagnosticados de patología gastrointestinal (gastroenteritis aguda), correspondiendo a niños de 4 y 12 meses de edad. Los dos pacientes presentaron detecciones del serotipo VPIH-3. En estos dos pacientes la clínica predominante fue la gastrointestinal aunque también presentaban cuadro catarral.

### 6.3.7.9. Patología neurológica

Cinco episodios (1,9%) presentaron patología neurológica siendo los diagnósticos convulsión febril (2 casos), patología neurológica de base presentando crisis epiléptica (1 caso), patología oncológica más cefalea (1 caso) y ataxia aguda transitoria (1 caso). La edad media fue de  $36,6 \pm 14,3$  meses. En los cinco casos se detectó serotipo VPIH-3. En los cinco pacientes la clínica predominante fue la neurológica asociada a cuadro catarral.

## **7. DISCUSIÓN**





## **7. DISCUSIÓN**

La infección respiratoria aguda es la enfermedad más frecuente en el ser humano y uno de los motivos de consulta más frecuentes en Pediatría, tanto hospitalaria como extrahospitalaria, siendo la principal causa de ingresos hospitalarios en los meses de invierno (2).

La etiología de estas infecciones respiratorias es predominantemente viral, siendo los virus parainfluenza humanos agentes etiológicos importantes.

La identificación de patógenos virales puede ser de importancia tanto para el manejo individual del paciente como para el control de infecciones nosocomiales. El diagnóstico precoz podría contribuir a una reducción significativa de los exámenes de laboratorio innecesarios y de las pruebas de imagen costosas, como han comunicado Bonner et al. (205).

Sin embargo, en los últimos años se han publicado estudios que sugieren que durante los episodios de infección respiratoria, en niños sanos sin comorbilidades asociadas no se deberían obtener muestras nasofaríngeas de manera rutinaria para el diagnóstico de infecciones respiratorias virales, debido a que no parece que modifiquen las pruebas diagnósticas que se realizan, las tasas y la duración de los ingresos o el uso de antibióticos (206)(207)(208). Así, en un trabajo reciente los autores concluyeron que se deberían recoger muestras nasofaríngeas solo para aquellos patógenos para los que existe una terapia o tratamiento que pueda modificar el curso de la infección (*Bordetella*, virus influenza, VRS) (209).

### **7.1. EPIDEMIOLOGÍA**

#### **Epidemiología general de los virus respiratorios**

En nuestro ámbito geográfico, el virus más frecuentemente detectado fue rinovirus, presente durante todas las temporadas del periodo de estudio y en todas las franjas etarias, seguido de VRS y virus influenza, al igual que han publicado otros autores (207). En nuestra cohorte, virus parainfluenza circuló en frecuencias similares a adenovirus y bocavirus. Sin embargo fue más frecuentemente detectado que otros virus respiratorios importantes como metapneumovirus, influenza B y coronavirus.

Un estudio llevado a cabo en España (80), en el que participaron pacientes menores de 14 años hospitalizados por infección respiratoria aguda y que utilizó la PCR como método de detección viral, ubicó a los VPIH en cuarto lugar entre los virus más frecuentemente detectados, después de VRS, rinovirus y adenovirus. En otro estudio publicado en el 2016 por

este mismo grupo de trabajo, situaron a los VPIH en quinto lugar en frecuencia, tras bocavirus (210).

En el año 2005 un estudio prospectivo realizado en Inglaterra con pacientes no hospitalizados, señaló a los VPIH como tercer patógeno más frecuente tras los ampliamente detectados rinovirus y VRS (211). En el trabajo de Bicer et al. realizado en Italia (6) los VPIH fueron terceros en frecuencia tras VRS y adenovirus. En la serie de Frost et al. (71) en Colorado (EEUU), cohorte similar a la presentada en este trabajo en cuanto al diseño, los virus parainfluenza circularon con frecuencias similares a virus influenza y a VRS. Por último, en el estudio de Pecchini et al. realizado en Brasil (212) se mostró que los VPIH eran responsables de una importante morbilidad, siendo el segundo agente viral más frecuente después de VRS, al igual que la serie de Lu et al. recogida en China (213).

Por tanto, los VPIH se situaron en una posición intermedia tanto en éste como en los diferentes estudios consultados en el mundo, en general en cuarto lugar tras rinovirus, VRS y virus influenza. Las diferencias observadas en unos y otros estudios dependen principalmente de su duración en el tiempo y de la metodología de laboratorio empleada, que permite la detección eficiente de más o menos virus, no pareciendo establecerse diferencias importantes en la circulación de los principales virus respiratorios en unas y otras poblaciones del mundo.

En la mayor parte de los años analizados la circulación de los VPIH en periodos interepidémicos ha sido destacable, lo que junto a la menor intensidad de los picos epidémicos contribuye a que la línea que refleja la circulación mensual de este virus presente oscilaciones menos acusadas que en el caso de otros virus respiratorios (61)(189)(214). Esto explica que los VPIH, excluyendo rinovirus que fue el virus predominante todo el año, hayan sido los virus respiratorios más frecuentemente detectados en los meses templados (de primavera y verano) (215) de la mayoría de las temporadas analizadas, por delante de adenovirus, VRS, influenza o metapneumovirus humano.

Ocasionalmente, otros virus han ocupado el primer lugar en algunos trimestres del periodo templado, como ocurrió en el verano de 2009 con la gripe pandémica influenza A (H1N1), en la primavera de 2013 con metapneumovirus y en la del año 2016 con el virus influenza B, pero también en estos periodos la circulación de los VPIH fue significativa.

En los pacientes menores de seis meses VPIH fue el segundo virus más frecuentemente detectado después de VRS, excluyendo a rinovirus, que fue predominante con una importante diferencia respecto al resto de virus detectados. La distribución por edades de VPIH fue muy similar a la de metapneumovirus, aunque en los menores de 36 meses VPIH fue detectado con frecuencia mayor. Globalmente, parece que el protagonismo de VPIH en el conjunto de virus

respiratorios es mayor a menor edad y especialmente importante en los menores de seis meses.

En el presente proyecto de investigación, casi el 30% del total de muestras positivas, correspondieron a detecciones virales múltiples, lo que concuerda con lo descrito por numerosos autores (1)(207)(216). En algunos estudios se han referido cifras menores de detección múltiple (209)(217)(6)(213)(218)(219)(220)(221)(222)(223)(224), lo que puede estar relacionado con la mayor o menor sensibilidad de las metodologías de laboratorio empleadas, así como con diferencias en los diseños de los estudios como la inclusión en algunas series de pacientes adultos (225)(226). Unos pocos estudios han referido cifras de detección múltiple algo más elevadas, de alrededor del 40-45% (227)(228), incluso alguno del 63% (229).

Las detecciones múltiples fueron frecuentes para los diferentes virus respiratorios aunque han oscilado considerablemente, siendo el virus que más frecuentemente presentó detecciones múltiples bocavirus (84%) (1)(230), seguido de adenovirus (74%) y coronavirus (67%) y el que menos influenza B (21%). Es conocido que bocavirus y adenovirus pueden establecer latencia en mucosa respiratoria (vías altas y especialmente tejido adenoideo), donde pueden ser detectados durante meses e incluso volver a ser excretados ante diferentes estímulos (inmunosupresión, infecciones agudas por otros microorganismos...). Los virus que menos detecciones múltiples presentaron fueron los virus influenza (A y B), un hallazgo común a otros estudios. A diferencia de nuestra cohorte, los resultados comunicados por Essa et al. (225), Swamy et al. (189), Wishaupt et al. (209) y Kumar et al. (224), rinovirus fue el virus que más frecuentemente presentó codetecciones. Otros autores describieron VRS, rinovirus y adenovirus como los virus más frecuentemente implicados en las codetecciones (217)(216). Numerosos factores pueden explicar las diferencias observadas en unos y otros estudios como el diseño de los mismos, su duración (estudios cortos amplifican el papel de determinados virus en caso de epidemias ocasionales, pudiendo artefactar los resultados), el panel de virus estudiados, la metodología empleada, etc. El presente estudio que ha analizado a lo largo de nueve años a un gran número de niños con infección respiratoria aguda, con una metodología sensible (PCR múltiple) y un amplio panel de virus proporciona probablemente una visión bastante cercana de la presentación en forma de detección única o múltiple para los diversos virus respiratorios.

El 25% de los episodios aquí estudiados presentaron resultado negativo en la muestra nasofaríngea, un resultado intermedio respecto a los obtenidos por otros autores empleando PCR. Autores como Wishaupt et al. refirieron cifras algo menores (209) de alrededor del 18%, y Calvo et al. (80) de alrededor del 20%. Sin embargo, en otro estudio publicado por este último grupo (221), las muestras negativas alcanzaron el 34% (218).

### **Epidemiología de los VPIH:**

En el presente estudio, el porcentaje de detección de VPIH fue del 6,3% (8% de las muestras positivas), cifras similares a las referidas en el amplio estudio de Frost et al. en EEUU (6,5%) (71). En la serie de Swamy et al. (189) se comunicaron valores algo mayores (9%) pero a diferencia del presente estudio no fueron incluidos niños de 5-14 años de edad en los que la prevalencia de la infección es claramente menor. Bharaj et al. (223), que como se ha realizado en el presente estudio analizaron pacientes hospitalizados y no hospitalizados, refirieron cifras de detección de VPIH de alrededor del 13%, si bien incluyeron sólo pacientes menores de 6 años y un número de muestras pequeño (n=301). En España, en el estudio realizado por Calvo et al. durante dos años en pacientes hospitalizados se obtuvieron porcentajes ligeramente más elevados que los obtenidos en el presente estudio en Gipuzkoa del 8,9% del total de muestras investigadas (11% del total de muestras positivas detectadas) (80), habiendo estos mismos autores comunicado en otro estudio previo de duración similar en una muestra de población de las mismas características un porcentaje del 4,8% (231). Las diferencias obtenidas pueden ser atribuidas en gran parte a fluctuaciones naturales en la circulación de los VPIH. De hecho, en el presente estudio, el porcentaje de positividad anual osciló entre 4,8 y 8,7%. En otras series que analizaron muestras nasofaríngeas de pacientes pediátricos y población adulta, los VPIH se detectaron en el 3-9% (61) (226) de los pacientes investigados.

Hemos observado un número discretamente mayor de episodios en varones (relación varón/mujer 1,3), lo cual concuerda con lo descrito por la mayor parte de los autores (5)(6)(71)(80)(212)(65)(232). En algún estudio este porcentaje fue incluso mayor, llegando al 75-80% (189), lo que también se observó en población pediátrica y de adultos (61). En la serie de Wishaupt et al. (209) observaron mayor porcentaje de varones en las detecciones múltiples respecto a las detecciones únicas. Anteriormente se ha referido que la susceptibilidad a muchas infecciones virales y la intensidad de éstas es algo mayor para los varones, y que el dimorfismo sexual y su influencia en la respuesta inmune puede estar en la base de las diferencias encontradas en la respuesta a infecciones y vacunas virales vivas, así como en la prevalencia de algunas enfermedades autoinmunes (233) (234).

Algo más del 40% de los casos detectados en esta serie correspondieron a menores de 6 meses de edad, siendo la mediana de edad de ocho meses, ligeramente superior a la encontrada por Wishaupt et al. (209) y Pecchini et al. (212), con 5,6 y 6,8 meses respectivamente. En la serie de Essa et al. (232), que englobó únicamente pacientes ingresados en UCIP, se obtuvieron cifras similares. Sin embargo, la serie de Frost et al. (71) obtuvo una edad media que osciló entre 3 y 5 años, claramente más elevada que la observada en este estudio, lo que podría explicarse por el mayor número de pacientes con comorbilidad

asociada que fueron incluidos (casi el 60% de su cohorte), requiriendo ingreso a mayor edad que en pacientes sin comorbilidad asociada. Hsieh et al. (65) también refirieron una edad media más alta, cercana a 25 meses de edad, teniendo en cuenta que solo analizaron pacientes hospitalizados.

Por tanto, la mayoría de las series publicadas coinciden al mostrar un aumento de frecuencia de VPIH en el lactante pequeño, como Hsieh et al. (65) que dos tercios del total de la cohorte estudiada eran menores de tres años; y Swamy et al. (189) que la mayoría de casos detectados presentaban entre 25-36 meses, seguido del grupo 13-24 meses. La mayor tasa de detecciones de patógenos respiratorios en los niños más pequeños, se ha atribuido a una mayor tasa de infecciones, menor tasa de eliminación viral debido a un sistema inmunológico específico todavía en desarrollo contra estos virus y a un mayor riesgo de infección, asociada a la asistencia a guardería y a condiciones de hacinamiento.

El serotipo de VPIH predominante fue el VPIH-3. Este resultado concuerda con lo descrito por muchos otros autores, tanto en pacientes ambulatorios como en hospitalizados (80)(189)(212)(223)(65)(232)(235)(214). Por ejemplo, en el amplio estudio efectuado en Inglaterra y Gales y que recoge las infecciones por VPIH diagnosticadas durante 15 años (1998-2013), VPIH-3 fue el serotipo principal, representando el 68% de los informes positivos seguido por el VPIH-1 (20%), VPIH-2 (8%) y VPIH-4 (4%) (236). Por otro lado, en el estudio de Calvo et al. (80) al igual que en nuestra cohorte se describió como el segundo serotipo en frecuencia el VPIH-4. A lo largo del presente siglo, el VPIH-4 parece estar ganando protagonismo entre los VPIH (236), probablemente por las mejoras diagnósticas, dado que este virus solo recientemente ha entrado a formar parte de muchos paneles de diagnóstico molecular para detección de virus respiratorios. Por el contrario, Frost et al. (71) describieron el serotipo predominante el VPIH-4, seguido de VPIH-1 y VPIH-3; y al excluir las detecciones múltiples virales, el serotipo predominante fue el VPH-1, seguido de VPIH-4 y VPIH-3, resultados de difícil explicación y que contrastan con los obtenidos en la mayor parte de los estudios recientes, que como se ha referido, atribuyen al VPIH-3 un papel dominante entre los VPIH.

En nuestra cohorte todos los serotipos de VPIH han sido detectados mayoritariamente en pacientes menores de seis meses, siendo VPIH-3 el más frecuentemente detectado en los menores de 5 años de edad. En esta amplia serie, el predominio del VPIH-3 fue más acusado a menor edad, representando un 60% de los VPIH detectados en menores de dos años de edad, 43% en niños de 2 a 5 años y 23% en niños de 5 a 14 años de edad. Hsieh et al. (65) observaron que el serotipo VPIH-3 afectaba a pacientes de menor edad respecto a VPIH-1. En la serie de Liu et al. (61) se refirió un predominio del serotipo VPIH-3 en la franja etaria 7-12

meses y del serotipo VPIH-2 en menores de seis meses. En la serie de Tran et al. (218) se describió también un predominio del serotipo VPIH-3 durante los cinco primeros años de vida a excepción del segundo año de vida en el que fue superado por VPIH-1.

La estación en la que más casos de VPIH se detectaron globalmente fue otoño (212), por orden de frecuencia los meses de diciembre, noviembre y octubre, con otro pico de intensificación de detección, aunque menor que el anterior, en los meses de febrero y marzo.

### **-Serotipo VPIH-1**

En nuestra cohorte se pudo observar el patrón de circulación cíclico bienal (excepto en la temporada 2007-08 del estudio) que correspondió con la circulación viral más intensa durante los otoños de los años impares, puesto de manifiesto repetidamente en EEUU y menos frecuentemente en Europa (236)(5)(68)(69)(71)(237). Se ha referido también un pico de detección en el mes de octubre (80), que coincidió con la circulación otoñal.

### **-Serotipo VPIH-2**

Este serotipo ha sido el menos frecuentemente detectado (71)(80)(189)(65). Al igual que el serotipo VPIH-1, aunque menos acusadamente, se observó una circulación más intensa los otoños de los años impares (68)(71). En nuestra cohorte el pico de detección se observó en noviembre, seguido de octubre y diciembre. En el estudio de Calvo et al. (80) se describió el pico de detección durante el mes de octubre.

### **-Serotipo VPIH-3**

En nuestra serie la mayoría de los casos se detectaron en primavera, como en otras publicaciones (68)(192)(238). Concretamente se detectó un pico de detección en marzo (80), con un aumento de detección general entre marzo y junio (65). Hay publicaciones que describen que durante los años que hay menor circulación de VPIH-1, el serotipo VPIH-3 puede mostrar una temporada más extensa o tener un pico adicional en otoño (69)(71)(239). En la presente serie, parece haber un aumento de las detecciones del serotipo VPIH-3 cuando hay un descenso de la circulación del serotipo VPIH-1.

### **-Serotipo VPIH-4**

Este serotipo ha sido menos frecuentemente detectado porque como se ha dicho en las líneas anteriores, hasta hace pocos años no ha podido ser detectado con adecuada sensibilidad: el virus presenta una baja tasa de rendimiento en cultivo celular, los paneles de Ac fluorescentes directos no incluían de manera rutinaria el serotipo 4, la serología consume mucho tiempo con una limitada disponibilidad comercial (71), y especialmente los métodos moleculares solo recientemente han incluido este virus, si bien en un estudio publicado en 2008 por investigadores del Hospital Universitario Donostia (240), ya se refirió una frecuencia de detección de este serotipo nada desdeñable (29%).

Al contrario de lo que ocurre con el serotipo VPIH-3, hemos observado un aumento progresivo de su detección en los últimos años, si bien es cierto que la última temporada de estudio, las detecciones presentaron nuevamente un descenso.

Otoño fue la estación en la que más casos se detectaron con un máximo entre noviembre y diciembre, a diferencia de Calvo et al. (80) que observaron una mayor detección en primavera, con pico de detección en marzo. Como han descrito diferentes autores (61)(69), la variación estacional de VPIH-4 es menos conocida. La serie de Frost et al. (71) mostró un pico de detección en otoño de años impares a diferencia de nuestra serie, en la que aparece anualmente.

### **-Detecciones múltiples de VPIH y episodios de repetición**

La codetección de varios serotipos de VPIH en la misma muestra nasofaríngea ha sido descrita por otros autores (5)(61)(71)(189)(235), habiéndose detectado en nuestra cohorte 6 casos. Podría especularse que ello fuera debido a que uno de los dos serotipos fuera consecuencia de una excreción prolongada y no el causante de la sintomatología.

La utilización de las técnicas moleculares para la detección viral ha potenciado la identificación de detecciones virales múltiples en una única muestra. Llama la atención el alto porcentaje de detecciones virales múltiples que hemos observado, ocurriendo en el 53% de los casos, y en el 28% de los casos con detección de tres o más virus respiratorios. Otros autores han descrito cifras de detección viral múltiple menor (30%), teniendo en cuenta únicamente niños hospitalizados (61)(189)(232), si bien en España Calvo et al. (80) y Cilla et al. (240) refirieron detecciones múltiples en una proporción muy próxima, del 43% (niños hospitalizados) y del 42% (niños con neumonía) de los casos en los que se detectó VPIH, respectivamente. Sin embargo, en la serie de Wishaupt et al. (209), que incluyó pacientes ambulatorios y

hospitalizados y el diagnóstico se realizó mediante técnicas moleculares se obtuvieron cifras de detecciones múltiples de VPIH mayores, de casi el 70%, al igual que Ren et al. (235).

Al igual que ha sido referido por otros autores, rinovirus fue el virus que apareció con mayor frecuencia en las codetecciones con VPIH (189)(232), seguido de la detección múltiple con implicación de tres o más virus respiratorios y la codetección con VRS (71)(235). Estos resultados son esperables dada la amplia presencia de rinovirus durante todo el año y en el caso del VRS la habitual coincidencia de circulación de este virus y VPIH entre noviembre y enero y la elevada incidencia de ambas viriasis en los niños más pequeños. Otros autores describieron otras combinaciones frecuentes con VPIH, como VRS, metapneumovirus y rinovirus (61), aunque este último trabajo analizó pacientes pediátricos y adultos.

En nuestra cohorte la mayor parte de las detecciones múltiples se observaron en menores de 12 meses (189)(217)(216). Sin embargo, la relación infecciones únicas/múltiples fue mayor a favor de las únicas en los primeros 6 meses de vida, disminuyendo posteriormente para volver a ser más frecuentes las únicas en los mayores de 5 años. Esto podría deberse a la persistencia de inmunidad materna en los niños menores de 6 meses combinado con la escasa exposición a virus respiratorios en esta franja de edad por la baja tasa de asistencia a guardería. Sin embargo a partir de los 6 meses el incremento de la asistencia a guardería y la desaparición de la inmunidad materna podrían explicar el aumento de la frecuencia de infecciones múltiples. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Wishaupt et al. (209), quienes, como en el presente estudio refirieron una mediana de edad más elevada para las infecciones múltiples.

En el presente estudio el serotipo VPIH-4 fue el que más codetecciones virales presentó, lo que ha sido encontrado también en otro estudio americano reciente (71). Ren et al. (235) comunicaron en China que el serotipo VPIH-4 era el que menos codetecciones virales múltiples presentaba, si bien el número de cepas de VPIH-4 analizadas fue escaso (n=25), menor que en este estudio y por tanto con menor fiabilidad. Otros autores describieron el serotipo VPIH-3 como el serotipo con mayor frecuencia de codetecciones (189). Hay pocos estudios que hayan analizado la distribución de los serotipos de VPIH en el total de las infecciones causadas por estos virus y su relación con las codetecciones virales y por tanto, la información existente al respecto es aún escasa.

Sólo en un 2% de los pacientes se documentaron episodios de repetición por VPIH. Para asegurar que los episodios de repetición no correspondían a un mismo periodo de enfermedad se definió un intervalo de al menos ocho semanas entre dos muestras para considerarlas indicativas de distinto episodio, siendo aceptado un intervalo menor en caso de descripción de dos episodios de infección causados por diferente serotipo. La información existente en la



literatura médica reciente respecto al impacto en la población de los episodios de repetición por VPIH es muy escasa. De estudios de cohortes prospectivos es conocido que las reinfecciones son frecuentes (49)(238), posiblemente en relación a la habilidad de estos virus para replicar en la superficie de las células epiteliales sin invasión más profunda, lo que dificulta la acción de la respuesta inmune. Para el segundo año de vida, casi un tercio de los niños del “Houston Family Study” habían sido re infectados por VPIH (49).

Sin embargo, en el estudio aquí presentado, el impacto de las reinfecciones en la población infantil inmunocompetente no pareció importante. Los resultados apoyan que en el caso de los VPIH, la expresión clínica de las infecciones sucesivas es menor (7).

En el presente estudio, los episodios de reinfección detectada se documentaron más frecuentemente en niños con comorbilidades (10/14), los cuales manifiestan globalmente mayor susceptibilidad a infecciones respiratorias, y estuvieron causados más frecuentemente por virus de diferente serotipo (12/14). Aunque todavía no ha sido adecuadamente estudiado, las reinfecciones parecen ser frecuentes en adultos y especialmente ancianos (238), los que a menudo requieren asistencia médica.

## **7.2. ANTECEDENTES PERSONALES Y PATOLOGÍA PREVIA**

### **Variables relacionadas con el paciente y ambientales**

Clásicamente se ha descrito que la lactancia materna protege de infecciones respiratorias (59) y que disminuye el riesgo de hospitalización por estas infecciones (241)(242)(243)(244)(245). Además, algún investigador sugiere que la mayor duración de la lactancia materna disminuye el riesgo de episodios de sibilancias durante los primeros cuatro meses de vida (246). Contrariamente, Patel et al. (247) comunicaron que la lactancia materna no protege de las infecciones respiratorias, aunque sí de las infecciones gastrointestinales.

En nuestra cohorte, el porcentaje de pacientes que recibieron lactancia materna al menos durante cuatro meses fue bajo (36%), lo cual se explica por la alta proporción de pacientes menores de cuatro meses (36%). Los pacientes alimentados con lactancia materna durante al menos cuatro meses presentaron significativamente menos infecciones con detección única de VPIH que múltiple, diferencias confirmadas con el análisis multivariante.

En el presente estudio se observó un porcentaje de prematuridad del 13%, lo cual concuerda con los datos del hospital de referencia del área de estudio. En cuanto a los antecedentes gestacionales y de patología previa y las variables ambientales o no relacionadas con el

paciente no hemos encontrado diferencias entre los cuatro serotipos. Frost et al. (71) describieron que el serotipo VPIH-3 era el que más patología previa presentaba (incluyendo inmunodeprimidos, patología pulmonar excluyendo asma, y patología neurológica), sin encontrar diferencias en cuanto a la prematuridad, asma o patología cardíaca.

Aunque en el presente estudio se observó mayor frecuencia de neumopatías, asistencia a guardería y vacunación adecuada para la edad entre los pacientes con detecciones múltiples y mayor frecuencia de prematuridad entre los pacientes con detecciones de VPIH único, estas diferencias no se confirmaron estadísticamente con el análisis multivariante.

### 7.3. CLÍNICA

La mayor parte de los estudios publicados sobre VPIH engloban pacientes pediátricos hospitalizados, siendo minoritarios los que estudian la expresión clínica de las infecciones causadas por estos virus en los pacientes extrahospitalarios (5)(71).

En este estudio, el síntoma predominante de los pacientes con detección de VPIH único fue el cuadro catarral, seguido de la tos y la fiebre. En la serie de Frost et al. (71), la más parecida a la aquí presentada en cuanto al diseño, se describieron síntomas y frecuencias similares. Swamy et al. (189) describieron por orden de frecuencia tos, fiebre, episodios de apnea, faringitis, cuadro catarral y neumonía, pero no excluyeron las codetecciones. Entre los estudios que analizaron únicamente pacientes hospitalizados, destacan el de Hsieh et al. (65) que describieron como síntomas más frecuentes también la fiebre, tos, rinorrea y disfonía, este último síntoma no estudiado en el presente estudio; el de Calvo et al. (80) que destacaron fiebre e hipoxia; y el de Pecchini et al. (212) en el cual la sintomatología más frecuentemente observada fue la tos, sibilancias, episodios de apnea y fiebre. Por lo tanto, los resultados aquí presentados refuerzan los obtenidos en otros estudios amplios en los que manifestaciones inespecíficas como cuadro catarral, fiebre y tos dominaron la presentación clínica de la mayor parte de los casos.

Los cuatro serotipos de VPIH han presentado similar espectro de signos y síntomas, no habiendo sido posible en este estudio correlacionar un serotipo de VPIH con un síntoma o signo en particular, como han referido también otros investigadores (61)(235). Sin embargo, en el trabajo de Frost et al. (71) se observó una mayor frecuencia de estridor entre los casos de los serotipos VPIH-1 y VPIH-2 respecto al VPIH-3 (ninguna detección del VPIH-4 presentó estridor), y de cianosis entre los VPIH-3, siendo VPIH-1 el menos frecuentemente asociado a convulsiones e hipoxia. En la cohorte de Hsieh et al. (65) el serotipo VPIH-2 se asoció con

mayor frecuencia a episodios de sibilancias que el serotipo VPIH-3 y el VPIH-1 se asoció a disfonía. Probablemente los diferentes serotipos solapan su expresión clínica y todos son capaces de expresar la diversidad de síntomas atribuidos a los VPIH, por lo que la diferencia en el espectro de signos y síntomas entre ellos sería cuestión de grado. Sin embargo, aún son pocos los estudios que han abordado este tema y poco frecuentes los prospectivos y amplios, dado que al dividir en serotipos, las series de VPIH en general quedan demasiado fragmentadas para disponer de poder estadístico elevado. Otra limitación en este sentido es la escasa inclusión de casos con laringitis, diagnóstico que no motiva habitualmente estudios virológicos, lo que puede haber dificultado la valoración de ciertos síntomas como disfonía o estridor.

Clásicamente el papel etiológico del VPIH en las infecciones respiratorias puede haber sido infraestimado, pues son pocos los estudios que incluían su detección específica. No obstante, en los últimos años su importancia en relación a las infecciones respiratorias ha ido creciendo particularmente en las infecciones del tracto respiratorio inferior. Esto pudiera ser debido a que la mayoría de estudios recientes incluyen a pacientes hospitalizados, y no pacientes extrahospitalarios donde predominan las infecciones del tracto respiratorio superior.

En esta serie, entre los pacientes hospitalizados fueron más frecuentes los episodios de apnea, estridor, broncoespasmo y dificultad respiratoria respecto a los no hospitalizados, lo que es esperable debido a la gravedad que conllevan estos signos y síntomas. Sin embargo, manifestaciones como cuadro catarral, fiebre, tos o vómitos, se distribuyeron de manera similar en ambos grupos.

Por otra parte, síntomas como fiebre, dificultad respiratoria y broncoespasmo fueron observados con mayor frecuencia en los pacientes con detecciones virales múltiples, y los episodios de apnea en pacientes con detección única de VPIH. Sin embargo ambos grupos (infección única *versus* múltiple) difieren, entre otras variables en edad (medianas de edad de 3 y 9 meses respectivamente), y cuando el análisis de la diferencia observada entre las manifestaciones clínicas referidas se realizó mediante regresión logística (análisis multivariante), las diferencias no fueron confirmadas, indicando una presentación clínica similar de ambos tipos de infecciones.

Pocos estudios han analizado las diferencias entre infecciones por VPIH únicas y aquellas asociadas a codetección con otros virus. Liu et al. (61) describieron mayor disfonía en pacientes con detección única de VPIH. Este aspecto es de difícil estudio dado que a menudo las manifestaciones clínicas expresadas por los diferentes virus respiratorios son parecidas y algunas detecciones múltiples pueden ser consecuencia de excreciones residuales de infecciones previas. Para abordar este estudio adecuadamente se necesitaría el desarrollo y

validación de una PCR multiplex cuantitativa y estandarizada, así como la correlación de sus resultados con los síntomas clínicos, lo que podría convertirse en una herramienta útil para aclarar el papel de las infecciones múltiples.

La infección por VPIH está generalmente asociada a enfermedades y/o síntomas de las vías respiratorias superiores e inferiores, pero en ocasiones se detectan personas con muestra nasofaríngea positiva para VPIH que no presentan signos de infección de las vías respiratorias (78). En nuestra cohorte estos casos representaron el 3%, tasa muy inferior a la comunicada por otros autores (23%) (65) (40-60%) (209), pero esperable dado que la gran mayoría de los niños incluidos lo fueron por presentar patología.

A lo largo del estudio se detectaron 21 casos de infección por VPIH adquiridos en ámbito nosocomial, poco más de dos por año, repartidos de modo uniforme a lo largo del estudio, lo que pone de relieve la capacidad de transmisión de estos virus. El origen de estos casos podrían ser niños ingresados simultáneamente en el hospital con infecciones por VPIH o familiares visitantes con infección por VPIH, normalmente en forma de IVRS. De cualquier forma, los casos adquiridos en ámbito hospitalario representaron solo un 3% del total de casos detectados, porcentaje similar al referido por Hsieh et al. (65). Se han comunicado previamente brotes de infección nosocomial por estos virus (249)(250)(251), algunos de los trabajos analizando específicamente el serotipo VPIH-3 (252)(253)(254). La frecuencia más bien baja de infecciones nosocomiales detectada en este estudio, es coincidente con observaciones también realizadas en nuestro medio en relación a otros virus frecuentemente asociados a infecciones nosocomiales como rotavirus [Ainara Arana, Tesis doctoral, 2017 (255)], y puede ser debido a la creciente concienciación y esfuerzos del personal del Servicio de Pediatría en la prevención de estas infecciones.

### **Pruebas complementarias**

En el 65% de la cohorte se obtuvo radiografía de tórax (71), estando alterada en el 45% (51% en el caso de los hospitalizados), cifras similares a las referidas por Calvo et al. (80).

En el 66% de los casos de la presente serie se realizó analítica sanguínea y se valoraron los niveles de PCR, leucocitos y neutrófilos. Una elevación de la PCR ha sido previamente asociada a infecciones por VPIH (65). En este estudio la PCR estuvo elevada en el 16,1% (18,2% en el caso de los niños de 6-59 meses de edad) siendo ligeramente más alta (tanto cualitativa como cuantitativamente) en el caso de las infecciones por VPIH-3 y VPIH-4, como ha sido referido previamente, si bien sin haberse alcanzado igualmente significación estadística (71).

Tampoco se encontraron diferencias significativas para las variables radiológicas y analíticas entre los serotipos (65), lo cual contrasta con los resultados comunicados por Frost et al. (71) que mostraron una leucocitosis ligeramente más elevada con el serotipo VPIH-4.

Los pacientes con detecciones múltiples presentaron mayores alteraciones en los reactantes de fase aguda y radiografía de tórax, que los pacientes con detecciones únicas de VPIH. Esta asociación podría estar sesgada por múltiples factores difíciles de controlar.

#### **7.4. SÍNDROMES CLÍNICOS**

En este trabajo de investigación, los cuadros clínicos más frecuentemente atribuidos a infección por VPIH fueron por orden de frecuencia la infección de vías respiratorias superiores (IVRS), la bronquiolitis, la bronquitis/neumonía y el asma. Entre los pacientes hospitalizados destacó la bronquitis/neumonía, seguida de la bronquiolitis y reagudización asmática, datos similares a los descritos por otros autores (80)(212).

Los episodios de apnea, infección de vías respiratorias superiores y síndrome febril se describieron con mayor frecuencia en los pacientes con detecciones de VPIH único, y en su mayor parte en menores de 6 meses de edad. En estudios como el de Essa et al. (225) se describieron con mayor frecuencia detecciones múltiples en los pacientes con infecciones del tracto respiratorio inferior respecto a las del tracto superior.

Entre los síndromes clínicos que requirieron más frecuentemente hospitalización, se encontraron la bronquitis/neumonía, los episodios de apnea y asma, lo cual es esperable debido al manejo y tratamiento que implican estas entidades.

##### **Laringitis**

Las laringitis suponen en torno al 15% de las infecciones del tracto respiratorio superior y ocurren en menores de dos años de edad en un porcentaje cercano al 35%. A pesar de tratarse de una infección leve y generalmente autolimitada, hasta el 1-3% de los pacientes con laringitis pueden requerir hospitalización (85).

Clásicamente, el agente etiológico más frecuentemente relacionado con la laringitis ha sido VPIH, habiéndosele atribuido hasta dos tercios de los casos, principalmente asociados al serotipo VPIH-1, aunque también se han asociado a otros agentes como VRS, influenza, adenovirus y rinovirus (85)(256)(257). En series prospectivas destinadas a estudiar el papel de

los virus respiratorios en la laringitis, Rihkanen et al. (256) refirieron en 2008 que se detectaron VPIH-1 y VPIH-2 en el 31% y 6% de los niños con laringitis, respectivamente. También Sung et al. (258) detectaron entre 2005 y 2009, VPIH-1 y VPIH-3 en el 24% y 8% de los casos de laringitis y Miller et al. (257) a lo largo de 4 años encontraron VPIH en el 28% de los casos con laringitis entre pacientes hospitalizados y tratados ambulatoriamente y excluyendo codetecciones virales múltiples; sin embargo en este último trabajo también se describieron con la misma proporción que VPIH, casos de laringitis por VRS y una proporción mayor de casos de laringitis por rinovirus (39%).

En el presente trabajo, se detectaron muy pocos casos de laringitis asociados a VPIH, resultado similar al obtenido en otras series diseñadas para evaluar el papel de los VPIH en la infección respiratoria aguda (80)(212), probablemente debido a que la severidad de este cuadro clínico no suele ser importante y la mayoría de los pacientes son dados de alta de Urgencias de Pediatría, sin ser recogida una muestra nasofaríngea para estudio microbiológico. Por ello, para obtener información sobre la relación entre laringitis y circulación de VPIH en nuestro medio, hemos realizado una inferencia de la comparación entre el número de casos con diagnóstico clínico de laringitis durante un periodo de tres años en el Servicio de Urgencias de Pediatría y la circulación del VPIH durante ese mismo periodo, mostrando los resultados que los dos periodos con mayor aumento de frecuencia de episodios de laringitis, coincidieron con los picos de detección de VPIH observados en los otoños de 2013 y 2015, causados en gran parte por el serotipo VPIH-1 y en menor medida por el VPIH-2. Una correlación similar se ha observado en Nueva York (EEUU) entre 1993 y 1998 (238).

En el estudio realizado por Peltola et al. (Finlandia, 2002) (85) entre 1980 y 1999 fueron analizados retrospectivamente los niños hospitalizados por laringitis por virus influenza o virus parainfluenza. Se consideró laringitis como la presencia de estridor inspiratorio o distrés respiratorio con/sin ronquera o tos perruna, sin que otra explicación los justificara, y se evaluaron las detecciones virológicas, realizadas mediante Ag por radioinmunoensayo, inmunofluorescencia, inmunoensayo enzimático, por cultivo viral y serología. Los autores refirieron que la mayor parte de los casos de laringitis no fueron estudiados virológicamente. Entre los investigados, se identificaron 29 casos de laringitis con detección de virus influenza y 88 con detección de VPIH (33 casos VPIH-1, 26 VPIH-2 y 29 VPIH-3; el VPIH-4 no fue investigado). No se mencionaron datos de posibles codetecciones múltiples.

Como hallazgo común, los autores que han abordado la etiología de la laringitis han referido una mayor asociación de esta enfermedad con infecciones por el serotipo VPIH-1 que para el resto de serotipos de VPIH, tanto excluyendo las codetecciones virales múltiples (71)(218), como no excluyéndolas (65)(5).

### **Infección de vía respiratoria superior**

En la presente cohorte, la IVRS fue la entidad más frecuentemente asociada a VPIH, probablemente debido a la inclusión en el estudio de pacientes no hospitalizados, a diferencia de la mayoría de los artículos publicados, y al importante papel de los VPIH en los episodios de IVRS. En la amplia serie de Wang et al. (Pekin, 9 años), en la que se estudio la etiología de las infecciones respiratorias agudas de niños hospitalizados, los VPIH fueron detectados más frecuentemente de pacientes con IVRS (12,5%) o bronquitis (11%) que en otras infecciones como neumonía (6,1%) o bronquiolitis (5,9%) (259). En la cohorte de Kumar et al. (224) en la que se determinó la etiología de los episodios de infección respiratoria aguda ocurridos en el primer año de vida, se detectaron VPIH en 42 episodios (10,6%) y > 95% de los mismos correspondieron a infecciones de vías respiratorias altas. Los VPIH aparecen en las primeras posiciones entre los virus detectados en casos de IVRS, en general tras rinovirus y rivalizando con VRS, adenovirus y/o virus influenza, variando el orden en función de la localización geográfica y la edad de los casos (224)(260). Frost et al. (71) también describieron en su serie un alto porcentaje de síntomas relacionados con IVRS en niños con infecciones por VPIH. Estos autores, como Hsiet et al. (65) y al igual que en la presente cohorte, no encontraron diferencias en la proporción de infecciones asociadas a IVRS con cada serotipo, aunque el más frecuentemente detectado en todas las series fue el serotipo VPIH-3.

### **Bronquiolitis**

El virus respiratorio más frecuentemente asociado a bronquiolitis es el VRS (261) (262), sin embargo hay numerosas series que relacionan la bronquiolitis también con los VPIH (4)(59)(263)(264), algunos considerándolos segunda causa tras VRS (265). En nuestra cohorte la bronquiolitis fue la segunda entidad más frecuentemente asociada a infección por VPIH. El serotipo más frecuentemente detectado fue VPIH-3, seguido de VPIH-4, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre la proporción de casos de los diferentes serotipos. Varios autores describieron mayor asociación entre la bronquiolitis y el serotipo VPIH-3 (5)(80)(192)(212)(232)(259); en nuestra cohorte el serotipo VPIH-3 ha sido el más frecuente entre los pacientes menores de seis meses de edad afectos de bronquiolitis.

El 56,4% de la presente cohorte precisaron ingreso en planta de hospitalización. La mayoría de los pacientes con bronquiolitis por VPIH fueron pacientes menores de seis meses de edad, siendo la mediana de los pacientes hospitalizados menor que la de los no hospitalizados, lo que es esperable debido a la mayor gravedad que supone la bronquiolitis a menor edad.

En el presente estudio no hemos encontrado diferencias significativas para los diferentes serotipos entre los hospitalizados y no hospitalizados. Por el contrario, en algún estudio se sugiere que las bronquiolitis producidas por VPIH-3 son de mayor gravedad, debido a que presentan mayor frecuencia de hospitalizaciones que el resto de serotipos (4), situando a VPIH-3 como segunda causa tras VRS en niños hospitalizados.

### **Bronquitis/neumonía**

Debido a la dificultad de la catalogación correcta de manera retrospectiva por ser muy numerosos y diferentes los facultativos implicados en los diagnósticos, en este subgrupo se englobaron los pacientes con bronquitis y neumonía, como infecciones del tracto respiratorio medio e inferior (analizando por separado la bronquiolitis y los episodios de sibilancias). Se excluyeron las neumonías de origen bacteriano demostrado o sospechado, como se ha mencionado previamente, para no atribuir de manera sesgada a las infecciones por VPIH síntomas o signos correspondientes a otros agentes etiológicos.

Como en algún estudio se ha referido las infecciones del tracto respiratorio inferior por VPIH son menores que las del tracto superior, siendo más frecuentemente producidas por gérmenes como VRS o rinovirus (224)(266). Además este tipo de infecciones del tracto respiratorio inferior requieren mayor hospitalización (224). En alguna serie se han referido los VPIH como los segundos agentes causantes de neumonía tras VRS (267), al igual que lo referido en otra serie que incluyeron también pacientes adultos (214). En una amplia serie (2004-2012, China) se encontró que más del 60% de los pacientes hospitalizados con infección respiratoria por VPIH fueron diagnosticados de neumonía y el 16% de bronquitis (259).

En el presente trabajo, la bronquitis/neumonía relacionada con VPIH ha ocurrido preferentemente en pacientes mayores de 12 meses, sin predominancia de ningún serotipo, si bien VPIH-1 ha mostrado una frecuencia significativamente menor que el resto. En los pacientes menores de 12 meses sin embargo el serotipo predominante ha sido el VPIH-3.

Casi la totalidad de los pacientes con este diagnóstico requirieron ingreso hospitalario y precisaron antibioticoterapia durante más días que el resto de entidades clínicas.

Pecchini et al. (212), Essa et al. (232), Weinberg et al. (5), Abedi et al. (192) y Swamy et al. (189) describieron una mayor asociación del VPIH-3 con neumonía, sin embargo Calvo et al. (80) detectaron más frecuentemente el serotipo VPIH-4, sin excluir las codetecciones virales. Wang et al. describieron que el serotipo VPIH-3 es el más frecuentemente implicado en ambas entidades (259).



## Asma

En un trabajo publicado recientemente por Mummidi et al. (India, 2017) (1) se estudiaron los niños menores de cinco años hospitalizados por episodios moderados-graves de sibilancias, observando que los VPIH eran los segundos en frecuencia tras VRS, al igual que Nasreen et al. (268). Sin embargo, en otra serie en la que se estudió la primera infección respiratoria aguda (definida como más de dos días con tos o sibilancias, con fiebre y síntomas de IVRS acompañantes) los primeros agentes etiológicos encontrados fueron los rinovirus, seguido de coronavirus y VPIH (266), aunque no todos los pacientes presentaron sibilancias por lo que hay que interpretar los resultados con cautela. Hay numerosas series que han referido los rinovirus los más frecuentemente asociados a sibilancias (269)(270).

En nuestra cohorte, el serotipo VPIH-3 se encontró con mayor frecuencia (259), sin embargo las diferencias entre los cuatro serotipos no fueron estadísticamente significativas. Este serotipo a su vez presentó una distribución homogénea en todos los grupos de edad salvo en los pacientes mayores de 60 meses en los que no se detectó ningún caso. En esta franja etaria fue el serotipo VPIH-4 el que obtuvo un porcentaje relativo mayor.

Casi tres cuartas partes de los pacientes con este diagnóstico precisaron ingreso. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los serotipos entre los pacientes hospitalizados y los no hospitalizados, salvo para la mediana de edad, que fue mayor en los pacientes hospitalizados.

Calvo et al. (80) detectaron más casos de serotipo VPIH-4 con asma y episodios de sibilancias, si bien no se excluyeron las detecciones múltiples.

## Episodios de apnea

Varios autores han referido episodios de apnea en relación a infecciones respiratorias, mayoritariamente en el contexto de bronquiolitis pero también de manera aislada, siendo producidos estos episodios por diferentes virus respiratorios, siendo VRS el principal (271) (272). Varias cohortes han descrito episodios de apnea asociados a infección por VPIH (189)(212), incluso con cifras similares a la presente serie (5) (5% aproximadamente).

En el presente trabajo, entre los pacientes con episodios de apnea se detectó más frecuentemente el serotipo VPIH-2, siendo estos pacientes mayoritariamente menores de seis meses de edad, al igual que lo descrito por otros autores (5) y habiendo requerido hospitalización casi en su totalidad. Sin embargo, Swamy et al. (189) y Weinberg et al. (5) no

encontraron predominancia de ningún serotipo para esta entidad, si bien no excluyeron las codetecciones virales.

### **Síndrome febril**

La distribución por grupos de edad de los pacientes afectos de síndrome febril fue similar para los cuatro serotipos, siendo aproximadamente el 60% pacientes menores de seis meses de edad.

Al igual que la cohorte de Weinberg et al. (5) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los serotipos, si bien la mediana de edad fue menor en los pacientes hospitalizados respecto a los no hospitalizados, debido al mayor riesgo inherente a los pacientes de menor edad.

### **Otros**

Hsieh et al. (65) describieron que el 10% de los pacientes de su cohorte presentaban clínica gastrointestinal, tras excluir a los pacientes con Ag a rotavirus positivo, pero no queda claro si analizaron otros posibles agentes etiológicos gastrointestinales. Liu et al. (61) observaron mayor proporción de diarrea en los pacientes con infección a VPIH sugiriéndose una implicación de este virus en las enfermedades gastrointestinales, aunque no queda claro si descartaron agentes etiológicos enteropatógenos. En el presente trabajo únicamente dos pacientes (ambos con serotipo VPIH-3) presentaron clínica compatible con gastroenteritis aguda (sin otro agente etiológico causante detectado).

De acuerdo con otros autores (71)(273), hemos encontrado casos de patología neurológica en pacientes previamente sanos. Cinco pacientes presentaron clínica neurológica, todos con infección asociada a VPIH-3, sin otro posible agente etiológico causante.

La relación entre la infección por VPIH y la enfermedad neurológica ha sido estudiada previamente. Un estudio (274) describió convulsiones febriles en niños ingresados por VPIH, aunque otros estudios ponen en duda esta asociación (61).

En conclusión, la infección respiratoria por VPIH presenta un variado espectro de signos y síntomas, pudiendo estar implicados en diferentes cuadros clínicos, como otros autores han señalado previamente (61)(65)(189)(235). Los resultados de esta serie confirman el papel

predominante del VPIH-3 en la mayor parte de los cuadros clínicos, pero no apoyan que los VPIH presenten clínica específica para cada serotipo.

## 7.5. IMPACTO

Aunque la mayoría de los pacientes con infección por VPIH son tratados ambulatoriamente (188), una parte importante de los mismos requieren hospitalización (215), siendo la mortalidad muy baja (65).

### Hospitalización

VPIH es un importante agente causal de las infecciones respiratorias agudas, siendo el segundo o tercero en frecuencia en la mayor parte de las series que han estudiado pacientes menores de cinco años (189)(237).

En los últimos años a consecuencia del empleo extendido de métodos de diagnóstico molecular en las infecciones respiratorias agudas infantiles, se considera al VPIH-3 como el principal virus parainfluenza asociado a hospitalización (5)(65)(80)(189)(212)(259), lo que ha sido corroborado por los hallazgos de la presente serie, en la que VPIH-3 fue detectado en el 54,2% de las hospitalizaciones asociadas a VPIH. En estudios previos se ha sugerido que el VPIH-4 produce infecciones más leves, pero en los últimos años esta idea está cambiando, habiéndose publicado recientemente un impacto para este virus comparativamente similar o mayor al causado por los serotipos VPIH-1 y VPIH-2 (71)(72)(235). En la presente serie, en los niños hospitalizados se detectó menos VPIH-4 que VPIH-3, pero más que VPIH-1 y VPIH-2.

La información existente sobre la incidencia de hospitalización a causa de infecciones por virus parainfluenza es muy escasa. Weinberg et al. (5) en un estudio realizado por la denominada "Nueva Red de Vigilancia de Vacunas" de EEUU entre 2000 y 2004, refirieron que VPIH se identificó en el 7% de la muestra global de niños hospitalizados a causa de infección respiratoria aguda. La tasa anual promedio de hospitalizaciones por VPIH fue de 10,2/10.000 habitantes de 0-59 meses de edad, siendo la tasa más alta 30,1/10.000 habitantes en niños de 0-5 meses de edad y disminuyendo progresivamente hasta 3,9/10.000 habitantes en el grupo de 24-59 meses de edad, el de mayor edad investigado (Tabla 64). Por otra parte, Iwane et al. (237) en otro estudio realizado entre 2000 y 2001 en Nueva York y Tennessee refirieron datos muy similares a los anteriores, concretamente una tasa de incidencia anual de 12/10.000 habitantes de 0-59 meses de edad, siendo la tasa más elevada la de los menores de 6 meses

de edad (46/10.000) y disminuyendo con rapidez conforme aumenta la edad hasta 4/10.000 en el grupo de 24-59 meses. Estos datos concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, y se situaron entre los valores obtenidos para los dos grupos de niños con infección por VPIH analizados en Gipuzkoa: niños con infecciones únicas y con codetección de otros virus respiratorios (múltiples). Cabe destacar que los estudios americanos no diferenciaron entre ambos tipos de infecciones, por lo que sus datos deberían compararse con las detecciones múltiples obtenidas en el presente trabajo.

Por lo tanto, los datos del presente estudio son coincidentes con los resultados obtenidos en trabajos realizados en EEUU en el presente siglo, e indican que los niños menores de cinco años de edad y particularmente los menores de doce meses, tienen una carga de hospitalización elevada a causa de las infecciones por VPIH (5)(237).

**Tabla 64.-** Comparación de la incidencia de hospitalización obtenida en el presente estudio con otros realizados en EEUU.

Grupos de edad en meses	Iwane et al. (237)	Weinberg et al. (5)	Gipuzkoa (infecciones únicas)	Gipuzkoa (infecciones únicas + múltiples)
0-5	46 (26-69)	30,1 (22,0-38,9)	34,2 (27,3-42,9)	55,7 (46,7-66,4)
6-11	18 (6-32)	17,3 (11,7-23,9)	8,2 (5,2-13,0)	27,4 (21,3-35,2)
12-23	15 (6-26)	15,3 (11,1-19,6)	3,6 (2,2-5,9)	14,6 (11,4-18,6)
24-59	4 (1-6)	3,9 (2,6-5,2)	1,5 (0,9-2,1)	3,4 (2,6-4,5)
<60	12 (8-15)	10,2 (8,8-11,7)	5,8 (4,9-6,9)	13,3 (11,9-14,9)

Incidencia media anual de hospitalización obtenida en el presente estudio y en otros dos realizados en EEUU (los números hacen referencia a casos/10.000 niños).

Como en la cohorte analizada en Gipuzkoa, los resultados del estudio de Weinberg et al. (5) refirieron tasa de hospitalización para VPIH-3 más elevada que para el resto de serotipos. Las cifras de incidencia de hospitalización obtenidas en Gipuzkoa para VPIH-3 son algo menores a las estimadas en EEUU en 2000 (24,4 frente a 40,5/10.000 e menores de 12 meses de edad) si bien este estudio no se basó en datos propios sino en el análisis de diversos estudios previos (275).

Por otra parte, no se encontraron diferencias entre los serotipos en cuanto a la hospitalización global. La información existente en la literatura sobre este aspecto es escasa. Frost et al. (71)

describieron menor frecuencia de hospitalización para el serotipo VPIH-1. En el trabajo de Swamy et al. (189) se refirió que el serotipo VPIH-3 fue la segunda causa de hospitalización por infección respiratoria en menores de cinco años de edad, tras VRS.

Es interesante comparar los resultados de incidencia de hospitalización obtenidos en este largo estudio con otros existentes de incidencia de hospitalización por otros virus respiratorios en Gipuzkoa (Tabla 65). Aunque se tratan de estudios realizados en diferentes periodos, y las variaciones en la circulación viral y en la tecnología empleada pueden haber influido en alguna de las diferencias que se observan, el análisis epidemiológico ha sido realizado de manera similar en todos ellos. Los resultados indican una carga de hospitalización superior para el VRS, 5-10 veces mayor entre menores de un año de edad que para otros virus respiratorios considerados de modo individual, diferencia que se reduce conforme se analizan grupos de mayor edad. Sin embargo, la carga atribuible a los VPIH, es similar a la constatada para otros patógenos respiratorios virales importantes como los virus influenza o el metapneumovirus humano.

**Tabla 65.-** Comparación de la incidencia de hospitalización para diferentes virus respiratorios en diferentes estudios realizados en Gipuzkoa.

Grupos de edad en meses	Cilla et al. 2004-07 (276) VRS	Cilla et al. 2004-07 (276) MPVH*	Oñate** 2004-2012 (277) Virus influenza	Gipuzkoa infección única 2007-16	Gipuzkoa infecciones únicas+múltiples 2007-16
0-5	394	67	26,8	34,2	55,7
6-11	108	34	18,2	8,2	27,4
12-23	30	18	11,9	3,6	14,6
24-59	-	-	4,4	1,5	3,4
<60	-	-	9,5	5,8	13,3

Incidencia media anual de hospitalización para virus respiratorios obtenida en el presente estudio y en otros previos realizados en Gipuzkoa (los números hacen referencia a casos/10.000). \*MPVH: metapneumovirus humano. \*\*E. Oñate, Tesis Doctoral 2013.

El 55% de los pacientes con infección asociada a VPIH único precisaron hospitalización, al igual que describieron Frost et al. (60%) (71). Wishaupt et al. (209) por el contrario, describieron cifras de ingreso cercanas al 80%, si bien el número de pacientes analizados fue

pequeño. En este último trabajo al igual que en el presente estudio, no encontraron diferencias en cuanto a la hospitalización entre las infección únicas y múltiples.

Pecchini et al. (212) refirieron que VPIH causa predominantemente infección del tracto respiratorio inferior (6) y que la importancia del virus podía haber estado clásicamente infraestimada. Hay que tener en cuenta que en su trabajo se analizaron únicamente muestras nasofaríngeas de pacientes hospitalizados y que las infecciones del tracto respiratorio inferior requieren hospitalización más frecuentemente; por el contrario, no analizaron los pacientes con infecciones respiratorias manejadas de manera ambulatoria, mayoritariamente del tracto respiratorio superior y probablemente más frecuentes.

Como otros autores han descrito previamente (5) el peso de la hospitalización de VPIH es mínimo en comparación con la asistencia a los servicios de Urgencias de Pediatría y a los Centros de Salud atribuibles a este virus, dado que la mayoría son infecciones leves y se manejan de manera ambulatoria sin obtenerse diagnóstico etiológico, por lo que probablemente esté subestimada la carga o el impacto de dicha infección (7). Los pacientes mayores de 60 meses han presentado mayor porcentaje de ingresos que el resto de subgrupos de edad, lo cual podría guardar relación, entre otros factores, con la patología que presentan en función de los grupos de edad.

Casi el 6% de la cohorte requirió ingreso en UCIP, al igual que describen Weinberg et al. (5), situándose este porcentaje entre los comunicados por Pecchini et al. (212) y Calvo et al. (80) de 15% y 2%, respectivamente. Por el contrario, en la serie de Frost et al. (71) se refirió que un 30% de los casos ingresaron en UCIP. Recientemente se ha publicado un estudio realizado en Kuwait (232) que incluyó pacientes adultos y pediátricos ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos (sin excluir las detecciones virales múltiples), concluyendo que el VPIH es un agente causal importante de infecciones del tracto respiratorio en pacientes críticamente enfermos, principalmente en países en desarrollo, donde existen pocos datos sobre virus respiratorios. Sólo obtuvieron casos del serotipo VPIH-1 y VPIH-3; siendo los síndromes clínicos más frecuentemente asociados los de neumonía y bronquiolitis.

En el presente estudio no se documentó ningún fallecimiento en el contexto de infecciones respiratorias por virus parainfluenza. La mortalidad, excepcional, se observa en niños muy pequeños, ancianos o inmunodeprimidos, especialmente en pacientes con leucemia y receptores de trasplantes de médula ósea, poblaciones no estudiadas específicamente en este trabajo, y en las que, tanto la progresión de la infección viral hacia las vías respiratorias bajas como las sobreinfecciones bacterianas y fúngicas no son inusuales (4)(65)(278)(279). Sin embargo, estudios recientes y amplios, en pacientes pediátricos oncológicos con fiebre y neutropenia e infecciones causadas por virus respiratorios, sugieren un curso favorable

también para la mayoría de estos episodios (111)(280) y en el caso de pacientes con leucemia, menor mortalidad que en adultos (111).

Frost et al. en EEUU (71) y Pecchini et al. en Brasil (212) comunicaron cinco y cuatro pacientes fallecidos respectivamente, sin diferencias entre serotipos, todos ellos con comorbilidades asociadas. En países en vías de desarrollo, la situación es diferente en el contexto de malnutrición y falta de asistencia sanitaria, la mortalidad de las infecciones por virus respiratorios y específicamente por VPIH es significativa, generalmente como consecuencia de sobreinfecciones bacterianas (63). La iniciativa de la OMS “Batalla contra los virus respiratorios” ([http://www.who.int/influenza/patient\\_care/clinical/brave/en](http://www.who.int/influenza/patient_care/clinical/brave/en)) reconoce el importante papel de los virus respiratorios en la morbilidad y mortalidad de las poblaciones, aunque se considera aún insuficientemente estudiado (281).

### **Otros indicadores de impacto**

En lo que respecta a la estancia media, la mediana de estancia hospitalaria fue de seis días, similar a la referida en otras publicaciones (65)(212)(227); y la mediana de estancia en UCIP de tres días. Otros autores describieron estancias hospitalarias menores (71)(80)(209).

No se encontraron diferencias entre los serotipos ni tampoco entre detecciones únicas y múltiples para esta variable (209). Por el contrario, Frost et al. (71) describieron una estancia en UCIP mayor para el serotipo VPIH-3. Los pacientes mayores de 60 meses presentaron una estancia media en UCIP mayor, dato que puede estar relacionado con la entidad clínica presentada.

En cuanto al empleo de antibióticos, el abuso de antibióticos en pacientes con patología viral es un importante problema en Pediatría. Como previamente se ha mencionado, el uso de test rápidos de diagnóstico podría ser importante para limitar pruebas innecesarias y disminuir el uso de antibióticos.

El empleo de antibioticoterapia en el presente estudio fue alto (42,5%) e incluso casi el 2% recibió antibioticoterapia de amplio espectro. Esto podría deberse a una mayor complejidad médica inicial de los pacientes, una impresión de gravedad mayor al diagnóstico o un diagnóstico incierto inicialmente. Si bien, la utilización tan amplia de antibióticos en una infección viral debe ser motivo de reflexión; cifras similares presentó la cohorte de Frost et al. (45,2%) (71). Sin embargo Calvo et al. (80) presentaron cifras algo menores, de alrededor del 29%, y la cohorte Wishaupt et al. (209) cifras muy superiores rozando casi el 70% de la muestra, en este último caso con un número de episodios de VPIH muy inferior.

En el presente trabajo, la mediana de días de antibioticoterapia osciló en función de las entidades clínicas, siendo significativamente mayor entre los pacientes con bronquitis/neumonía y asma. No se encontraron diferencias en estos parámetros para los diferentes serotipos. Por el contrario, Frost et al. (71) describieron mayor empleo de antibióticos en el caso del serotipo VPIH-2. En nuestra serie se observó una mediana de días de antibioticoterapia mayor para los pacientes con detecciones múltiples, a diferencia de lo referido por Wishaupt et al. (209) que no encontraron este hallazgo.

En cuanto a los días de fiebre, la mediana de días de fiebre fue de un día, a diferencia de lo referido por otros autores que describen una mediana de hasta cuatro días (6)(65)(80). No se encontraron diferencias entre los diferentes serotipos (71), ni en el caso de las detecciones únicas *versus* múltiples.

En cuanto al soporte respiratorio precisado, el 25% de la cohorte recibió oxigenoterapia (con una mediana de duración de un día) cifra similar a la descrita por Weinberg et al. (5). Ningún paciente precisó ventilación mecánica invasiva (VMI) y el 3% precisó ventilación mecánica no invasiva. Wishaupt et al. (209) describieron una mediana de oxigenoterapia mayor, de tres días.

No se encontraron diferencias entre los días de oxigenoterapia y los diferentes serotipos. Frost et al. (71) describieron una frecuencia mayor de VMI en los pacientes con serotipo VPIH-2. Los casos con detección de VPIH múltiple presentaron una mediana de días de oxigenoterapia mayor que los casos con detección de VPIH único, resultado contrario a Wishaupt et al. (209) que no encontraron éstas diferencias.

Independientemente del impacto en la hospitalización, en el presente estudio, no se encontraron datos que apoyen una mayor severidad para ningún serotipo en concreto (65) (282). Sin embargo, Frost et al. (71) refirieron una severidad mayor para el serotipo VPIH-3 y menor para el serotipo VPIH-1, teniendo en cuenta los días de ingreso, los ingresos en UCIP y el mayor número de pacientes que precisaron oxígeno domiciliario al alta. Hay que mencionar que un alto porcentaje de pacientes en este estudio presentaban comorbilidades (60%). Wang et al. (283) y Stankova et al. (284) también refirieron que las infecciones respiratorias más severas estuvieron producidas por el serotipo VPIH-3.

En muchos hospitales se ha introducido en los últimos años la RT-PCR en tiempo real y el número de virus encontrados en las muestras nasofaríngeas de niños con infección aguda del tracto respiratorio están aumentando. Todavía no está claro el papel de las detecciones múltiples en la severidad y el curso clínico de la enfermedad, ya que los estudios difieren en



cuanto al diseño, la edad de inclusión, los criterios de reclutamiento, la forma de recolectar los datos, el método de detección y los virus estudiados. Aunque hay autores que sugieren una asociación entre la detección viral múltiple y la mayor severidad de los síntomas o la enfermedad (213)(221)(225)(285)(286)(287), para otros no hay relación entre estos parámetros (6)(61)(209)(211)(222)(288)(289)(290)(291)(292)(229). Se han propuesto varias razones para explicar la asociación entre la detección múltiple de virus respiratorios y la severidad de la infección del tracto respiratorio, que incluyen la alteración de las respuestas inmunes después de la infección primaria y la vulnerabilidad del huésped a múltiples virus (225). Se piensa que el estudio de la carga viral de cada virus presente en las infecciones múltiples puede contribuir a conocer la severidad de la enfermedad y/o a un mejor entendimiento del papel patógeno de estas infecciones; pero todavía no existen métodos estandarizados para abordar este tipo de análisis (209).

En el presente trabajo, las detecciones múltiples mostraron ciertos indicadores de mayor gravedad, ya que se encontraron diferencias en cuanto a parámetros de infección, mediana de días de antibióticos recibidos, radiografías de tórax alteradas, mediana de oxigenoterapia y distribución de los días de fiebre entre ambos grupos. Sin embargo, no hubo diferencias en cuanto al destino asistencial, la estancia media hospitalaria y el empleo de antibióticos entre ambos grupos. Si bien estos datos hay que interpretarlos con cautela porque podrían estar interferidos por múltiples factores.

Por último, en la tabla 66 se exponen los trabajos más representativos publicados en España, la mayoría realizados en Madrid y Cataluña, y teniendo el VPIH como objeto de estudio tanto como virus principal estudiado o junto a otros virus respiratorios.

**Tabla 66.-** Trabajos realizados en España que analizan el papel de los VPIH en las infecciones respiratorias.

Región (Referencia)	Autor Año	Periodo de estudio	Virus analizados	Serotipo VPIH	Dº	nº VPIH	Observaciones
Cataluña (293)	Godoy 2016	Octubre 2013-Mayo 2015	VPIH	VPIH-3	PCR	108/9.574	Adultos y niños No ofrece datos clínicos
Madrid (210)	Calvo 2016	Septiembre 2005-Agosto 2013	Rinovirus Adenovirus VRS	VPIH-1 a VPIH-4. No ofrece datos por	PCR	<200/3.275	Estudian de manera extensa bocavirus.

			Bocavirus VPIH	serotipo			
España (294) (13 hospitales terciarios)	Cebey-López  2015	Enero 2011- Enero 2013	VPIH Rinovirus VRS Influenza MPVH Otros	VPIH-1 a 4. No ofrece datos por serotipo	PCR	5/204	Detecciones únicas <i>versus</i> múltiples. No establece diferencias en su significado clínico.
Madrid (295)	García-García  2015	Octubre 2004-Julio 2011	VPIH Rinovirus VRS Influenza MPVH Otros	VPIH-1 a 4. No ofrece datos por serotipo	PCR	120/2468	Sugiere un papel significativo para los VPIH en las IRA de los niños prematuros
Barcelona (252)	Berrueco  2013	Verano 2012	VPIH	VPIH-3	PCR	6	Brote nosocomial en niños con leucemia
Madrid (296)	García-García  2012	Septiembre 2004- Julio 2010	VPIH Rinovirus VRS Influenza MPVH Otros	VPIH-1 a 4. No ofrece datos por serotipo	PCR	47/884	Niños hospitalizados con neumonía adquirida en la comunidad.
Madrid (80)	Calvo  2011	Septiembre 2008- Agosto 2010	VPIH Rinovirus VRS Influenza MPVH Otros	VPIH-1 a 4. Serotipos 3 y 4 detectados con mayor frecuencia	PCR	82/916	Niños hospitalizados
Gran Canaria (297)	Artilles-Campelo  2006	Mayo 2002-Mayo 2005	VPIH Rinovirus VRS Influenza MPVH Otros	VPIH-1 a 3.  VPIH-3 más frecuente	IF Cultivo celular	104/1957	Niños con IRA atendidos en Urgencias de Pediatría. VPIH segunda causa de IRA
Madrid (298)	Mendoza Sanchez	1989-2003	VPIH VRS	VPIH-3	Cultivo celular	7/53	Niños oncológicos o con infección

	2006		Influenza Adenovirus				por VIH con IRA
Madrid (299)	Aguilar  2000	Sept 1997- Julio 1998	VPIH	VPIH-1 a 4. No ofrece datos por serotipo	IF  Cultivo celular PCR	65/230	Enfocado en la descripción de un nuevo método de PCR
Gipuzkoa (240)	Cilla  2009	Julio 2004- Junio 2007	VPIH VRS Influenza MPVH	VPIH-1 a 4. No ofrece datos por serotipo	PCR	60/796	Estudio para conocer tasas anuales de hospitalización

D<sup>o</sup>: diagnóstico. n: número de casos de VPIH respecto al total de casos analizados. VPIH: virus parainfluenza humano. VRS: virus respiratorio sincitial. MPVH: metapneumovirus humano. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. IRA: infección respiratoria aguda.

## 7.6. LIMITACIONES

Una de las mayores limitaciones de este trabajo es el gran número de detecciones múltiples observado ya que dificulta el análisis de las variables clínicas y evolutivas de los virus parainfluenza humanos de manera aislada. Por ello, para el análisis de la expresión clínica de los VPIH hemos excluido las detecciones virales múltiples, lo cual ha disminuido el número de pacientes analizados.

Por otra parte, no ha sido el mismo facultativo el encargado en la anamnesis, exploración física, toma de decisiones o diagnósticos otorgados a los pacientes, lo que puede introducir cierta variabilidad en diagnósticos y cursos observados, siendo esta limitación inherente a todas las series como la presente de naturaleza retrospectiva.

La muestra nasofaríngea o exudado faríngeo no se ha extraído sistemáticamente a todos los pacientes, sino que ha sido recogida, según el criterio del observador, produciéndose un sesgo muestral.

Por último, otra limitación importante es la dificultad de establecer la diferencia entre causalidad y casualidad. La presencia de ARN viral en la muestra respiratoria no siempre refleja la causa de los síntomas que presenta el paciente. Es posible que algún paciente presente una muestra positiva resultado de una excreción viral prolongada sin que los síntomas presentados tengan relación con la detección viral y sean debidos a otro agente etiológico. Para paliar esta posible

situación, se ha excluido del estudio a los pacientes sin sintomatología respiratoria, y a los pacientes con agentes etiológicos bacterianos.

## **8. CONCLUSIONES**



## **8. CONCLUSIONES**

1. Los virus parainfluenza humanos (en adelante virus parainfluenza) fueron detectados en el 6% de los niños menores de 14 años de edad investigados para diagnóstico de infección viral respiratoria, durante un periodo de nueve años (julio de 2007 a junio de 2016), sin que se observaran variaciones importantes en los periodos anuales estudiados.
2. Los virus parainfluenza fueron detectados con menor frecuencia que rinovirus, virus respiratorio sincitial y virus influenza A, en un rango de frecuencia similar a adenovirus y con frecuencia superior a otros virus respiratorios importantes, como metapneumovirus, virus influenza B y coronavirus. En los menores de seis meses de edad, los virus parainfluenza ocuparon el tercer lugar en frecuencia, por detrás de rinovirus y virus respiratorio sincitial.
3. A diferencia de otros virus como el respiratorio sincitial, influenza o metapneumovirus que causaron infecciones de manera epidémica, los virus parainfluenza se asociaron a enfermedad durante todo el año, siendo habitualmente dominantes tras rinovirus en el semestre comprendido entre los meses de mayo y octubre.
4. El serotipo de virus parainfluenza predominante a lo largo del periodo de estudio fue el serotipo 3 que supuso el 56% de los virus parainfluenza detectados, y fue seguido a distancia por el serotipo 4, detectado en el 20% de los casos. El serotipo 3 circuló más intensamente en primavera y principio de verano, mientras que el serotipo 4 lo hizo en la parte final del año. Los serotipos 1 y 2 fueron menos frecuentes, presentando circulación bienal, preferentemente en el otoño de los años impares.
5. La incidencia de la infección por virus parainfluenza mostró una frecuencia claramente descendente conforme los niños aumentaban en edad: dos tercios en menores de un año, y la mitad aproximadamente en menores de seis meses de edad.

6. Menos del 2% de los casos de infección con virus parainfluenza correspondieron a episodios de repetición. Las reinfecciones fueron causadas habitualmente por serotipo diferente al que ocasionó el primer episodio, y ocurrieron más frecuentemente en niños con comorbilidades asociadas.
7. La expresión clínica de las infecciones asociadas a virus parainfluenza fue predominantemente respiratoria, siendo las tres entidades más frecuentes entre los pacientes hospitalizados la bronquiolitis, bronquitis/neumonía y reagudización asmática. Entre los no hospitalizados predominaron la infección de vía respiratoria superior, bronquiolitis y síndrome febril. Estas infecciones asociaron en pocas ocasiones otras morbilidades (neurológicas y gastrointestinales).
8. Aunque el comportamiento epidemiológico de los serotipos fue diferente, no se encontraron diferencias relevantes en cuanto a sintomatología, datos analíticos o radiológicos y factores epidemiológicos dependientes y no dependientes del paciente. Tampoco se encontraron diferencias en relación a las variables de impacto o pronóstico (tasa de hospitalización, estancia media, oxigenoterapia y antibioticoterapia). El serotipo VPIH-2 se asoció con mayor frecuencia a episodios de apnea.
9. En el prolongado periodo de estudio, apenas se detectaron casos de infección por virus parainfluenza en pacientes con laringitis. La comparación de la circulación de virus parainfluenza en el área de estudio con la serie de laringitis diagnosticadas clínicamente durante tres años consecutivos en el Servicio de Urgencias de Pediatría sugirió una relación entre los principales brotes de laringitis en la comunidad y las epidemias bieniales otoñales de infección por virus parainfluenza, especialmente del serotipo 1.
10. Más de la mitad de los pacientes atendidos en el Hospital Universitario Donostia con infección respiratoria por virus parainfluenza, confirmada virológicamente, fueron hospitalizados. La incidencia media de hospitalización en menores de seis meses de edad fue elevada (34 casos/10.000 habitantes para infección por VPIH único) y disminuyó rápidamente con la edad, siendo cuatro veces menor en los niños de 6 a 11 meses de edad y 90 veces menor en los de 5 a 14 años de edad (0,4 casos/10.000 habitantes).



11. La detección viral múltiple fue frecuente, estando presente en aproximadamente la mitad de los casos de infección con VPIH, siendo el serotipo 4 el más frecuentemente asociado a codetecciones virales. Las detecciones múltiples ocurrieron más frecuentemente que las simples en niños de mayor edad y parecieron mostrar mayor severidad en cuanto a la clínica, aunque la mayor parte de estas diferencias desaparecieron al ajustar los resultados por edad.
12. La infección de vía respiratoria superior, el síndrome febril y los episodios de apnea se observaron con mayor frecuencia en el caso de los virus parainfluenza únicos.



## **9. BIBLIOGRAFÍA**



## **9. BIBLIOGRAFÍA**

1. Mummidi PS, Tripathy R, Dwibedi B, Mahapatra A, Baraha S. Viral aetiology of wheezing in children under five. *Indian J Med Res.* 2017 Feb;145(2):189–93.
2. 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 Mar;27(3):168–77.
3. Anderson AJ, Snelling TL, Moore HC, Blyth CC. Advances in Vaccines to Prevent Viral Respiratory Illnesses in Children. *Pediatr Drugs.* 2017 Aug 14.
4. Henrickson KJ. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Apr;16(2):242–64.
5. Weinberg GA, Hall CB, Iwane MK, Poehling KA, Edwards KM, Griffin MR, et al. Parainfluenza virus infection of young children: estimates of the population-based burden of hospitalization. *J Pediatr.* 2009 May;154(5):694–9.
6. Bicer S, Giray T, Çöl D, Erdağ GÇ, Vitrinel A, Gürol Y, et al. Virological and clinical characterizations of respiratory infections in hospitalized children. *Ital J Pediatr.* 2013 Mar 27;39:22.
7. Schmidt AC, Schaap-Nutt A, Bartlett EJ, Schomacker H, Boonyaratanakornkit J, Karron RA, et al. Progress in the development of human parainfluenza virus vaccines. *Expert Rev Respir Med.* 2011 Aug;5(4):515–26.
8. Chanock RM. Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup. *J Exp Med.* 1956 Oct 1;104(4):555–76.
9. Chanock RM, Parrott RH, Cook K, Andrews BE, Bell JA, Reichelderfer T, et al. Newly Recognized Myxoviruses from Children with Respiratory Disease. *N Engl J Med.* 1958 Jan 30;258(5):207–13.
10. C.H.Andrewes,F.B.Bang,R.M.Chanock,V.M.Zhdanov. Para-influenza viruses 1, 2, and 3: Suggested names for recently described myxoviruses. *Virology.* 1959 May 1 ;8(1):129–30.
11. Lau SKP, To W-K, Tse PWT, Chan AKH, Woo PCY, Tsoi H-W, et al. Human parainfluenza virus 4 outbreak and the role of diagnostic tests. *J Clin Microbiol.* 2005 Sep;43(9):4515–21.
12. Johnson KM, Chanock RM, Cook MK, Huebner RJ. Studies of a new human

- hemadsorption virus. I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg.* 1960 Jan;71:81–92.
13. Karron RA & Collins PL. Parainfluenza Viruses. En Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Straus SE (eds). *Fields Virology* (5ª edición), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2007 (vol 1): 1497-1526.
  14. Leland DS. Parainfluenza and Mumps Viruses. En Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, Warnock SW (eds). *Manual of Clinical Microbiology* 11ª ed. American Society for Microbiology Press, Washington DC 2015 (vol 2): 1487-1497.
  15. Schomacker H, Schaap-Nutt A, Collins PL, Schmidt AC. Pathogenesis of acute respiratory illness caused by human parainfluenza viruses. *Curr Opin Virol.* 2012 Jun ;2(3):294–9.
  16. Patterson S, Gross J, Oxford JS. The intracellular distribution of influenza virus matrix protein and nucleoprotein in infected cells and their relationship to haemagglutinin in the plasma membrane. *J Gen Virol.* 1988 Aug;69 ( Pt 8):1859–72.
  17. Hamaguchi M, Yoshida T, Nishikawa K, Naruse H, Nagai Y. Transcriptional complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. *Virology.* 1983 Jul 15;128(1):105–17.
  18. Moscona A. Interaction of human parainfluenza virus type 3 with the host cell surface. *Pediatr Infect Dis J.* 1997 Oct;16(10):917–24.
  19. Fox TG, Christenson JC. Influenza and Parainfluenza Viral Infections in Children. *Pediatr Rev.* 2014;35(6).
  20. Bartlett EJ, Cruz A-M, Boonyaratanakornkit J, Esker J, Castaño A, Skiadopoulos MH, et al. A novel human parainfluenza virus type 1 (HPIV1) with separated P and C genes is useful for generating C gene mutants for evaluation as live-attenuated virus vaccine candidates. *Vaccine.* 2010 Jan 8;28(3):767–79.
  21. Boonyaratanakornkit J, Bartlett E, Schomacker H, Surman S, Akira S, Bae Y-S, et al. The C proteins of human parainfluenza virus type 1 limit double-stranded RNA accumulation that would otherwise trigger activation of MDA5 and protein kinase R. *J Virol.* 2011 Feb;85(4):1495–506.
  22. Murray, P.R., Pfaller MA, Tenover FC, Tenover KC. *Microbiología médica* (5ª edición). Editorial Elsevier, Madrid 2007: 597-602.

23. Zhang L, Collins PL, Lamb RA, Pickles RJ. Comparison of differing cytopathic effects in human airway epithelium of parainfluenza virus 5 (W3A), parainfluenza virus type 3, and respiratory syncytial virus. *Virology*. 2011 Dec 5;421(1):67–77.
24. Liu Y, Li N, Zhang S, Zhang F, Lian H, Hu R. Parainfluenza Virus 5 as Possible Cause of Severe Respiratory Disease in Calves, China. *Emerg Infect Dis*. 2015 Dec;21(12):2242–4.
25. J Canchola , A J Vargosko , H W Kim , R H Parrott , E Christmas , B Jeffries RMC. Antigenic Variation Among Newly Isolated Strains of Parainfluenza Type 4 Virus - *Journals - NCBI. Am J Hyg* . 1964;79: 357–364.
26. Ray , Duncan J., Quinn R., Matsuoka Y. R. Distinct hemagglutinin and neuraminidase epitopes involved in antigenic variation of recent human parainfluenza virus type 2 isolates. *Virus Res*. 1992 Jun 1;24(1):107–13.
27. Henrickson KJ. Monoclonal Antibodies to Human Parainfluenza Virus Type 1 Detect Major Antigenic Changes in Clinical Isolates. Vol. 164, *The Journal of Infectious Diseases*. Oxford University Press; p. 1128–34.
28. Yamashita M, Krystal M, Fitch WM, Palese P. Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology*. 1988 Mar;163(1):112–22.
29. Zhang L, Bukreyev A, Thompson CI, Watson B, Peeples ME, Collins PL, et al. Infection of ciliated cells by human parainfluenza virus type 3 in an in vitro model of human airway epithelium. *J Virol*. 2005 Jan;79(2):1113–24.
30. Crowe JE, Williams J V. Immunology of viral respiratory tract infection in infancy. *Paediatr Respir Rev*. 2003 Jun;4(2):112–9.
31. Schaap-Nutt A, Scull MA, Schmidt AC, Murphy BR, Pickles RJ. Growth restriction of an experimental live attenuated human parainfluenza virus type 2 vaccine in human ciliated airway epithelium in vitro parallels attenuation in African green monkeys. *Vaccine*. 2010 Mar 24;28(15):2788–98.
32. Hu XL, Ray R, Compans RW. Functional interactions between the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza viruses. *J Virol*. 1992 Mar;66(3):1528–34.
33. Moscona A, Peluso RW. Fusion properties of cells infected with human parainfluenza

- virus type 3: receptor requirements for viral spread and virus-mediated membrane fusion. *J Virol.* 1992 Nov;66(11):6280–7.
34. Fryer AD, el-Fakahany EE, Jacoby DB. Parainfluenza virus type 1 reduces the affinity of agonists for muscarinic receptors in guinea-pig lung and heart. *Eur J Pharmacol.* 1990 May 31;181(1–2):51–8.
  35. Bose S, Malur A, Banerjee AK. Polarity of human parainfluenza virus type 3 infection in polarized human lung epithelial A549 cells: role of microfilament and microtubule. *J Virol.* 2001 Feb 15;75(4):1984–9.
  36. Yao Q, Compans RW. Filamentous particle formation by human parainfluenza virus type 2. *J Gen Virol.* 2000 May 1;81(Pt 5):1305–12.
  37. Ah-Tye C, Schwartz S, Huberman K, Carlin E, Moscona A. Virus-receptor interactions of human parainfluenza viruses types 1, 2 and 3. *Microb Pathog.* 1999 Nov;27(5):329–36.
  38. Prince GA, Porter DD. Treatment of parainfluenza virus type 3 bronchiolitis and pneumonia in a cotton rat model using topical antibody and glucocorticosteroid. *J Infect Dis.* 1996 Mar;173(3):598–608.
  39. Le Nouën C, Munir S, Losq S, Winter CC, McCarty T, Stephany DA, et al. Infection and maturation of monocyte-derived human dendritic cells by human respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and human parainfluenza virus type 3. *Virology.* 2009 Mar 1;385(1):169–82.
  40. Palermo LM, Porotto M, Yokoyama CC, Palmer SG, Mungall BA, Greengard O, et al. Human parainfluenza virus infection of the airway epithelium: viral hemagglutinin-neuraminidase regulates fusion protein activation and modulates infectivity. *J Virol.* 2009 Jul;83(13):6900–8.
  41. Goodbourn S, Randall RE. The Regulation of Type I Interferon Production by Paramyxoviruses. *J Interf Cytokine Res.* 2009 Sep;29(9):539–48.
  42. Goodbourn S, Randall RE, Didcock L. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol.* 2000 Oct 1;81(10):2341–64.
  43. Horvath CM. Weapons of STAT destruction. Interferon evasion by paramyxovirus V proteins. *Eur J Biochem.* 2004 Dec;271(23–24):4621–8.
  44. Schomacker H, Hebner RM, Boonyaratankornkit J, Surman S, Amaro-Carambot E, Collins PL, et al. The C proteins of human parainfluenza virus type 1 block IFN signaling



- by binding and retaining Stat1 in perinuclear aggregates at the late endosome. *PLoS One*. 2012;7(2):e28382.
45. Caignard G, Komarova A V., Bouraï M, Mourez T, Jacob Y, Jones LM, et al. Differential Regulation of Type I Interferon and Epidermal Growth Factor Pathways by a Human Respirovirus Virulence Factor. Basler CF, editor. *PLoS Pathog*. 2009 Sep 18;5(9):e1000587.
  46. Schaap-Nutt A, D'Angelo C, Amaro-Carambot E, Nolan SM, Davis S, Wise S-M, et al. Recombinant human parainfluenza virus type 2 with mutations in V that permit cellular interferon signaling are not attenuated in non-human primates. *Virology*. 2010 Oct 10;406(1):65–79.
  47. Nishio M, Tsurudome M, Ito M, Ito Y. Human parainfluenza virus type 4 is incapable of evading the interferon-induced antiviral effect. *J Virol*. 2005 Dec;79(23):14756–68.
  48. Crowe JE. Influence of maternal antibodies on neonatal immunization against respiratory viruses. *Clin Infect Dis*. 2001 Nov 15;33(10):1720–7.
  49. Glezen WP, Frank AL, Taber LH, Kasel JA. Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children. *J Infect Dis*. 1984 Dec;150(6):851–7.
  50. Takamura S, Roberts AD, Jelley-Gibbs DM, Wittmer ST, Kohlmeier JE, Woodland DL. The route of priming influences the ability of respiratory virus-specific memory CD8+ T cells to be activated by residual antigen. *J Exp Med*. 2010 Jun 7;207(6):1153–60.
  51. Hou S, Doherty PC, Zijlstra M, Jaenisch R, Katz JM. Delayed clearance of Sendai virus in mice lacking class I MHC-restricted CD8+ T cells. *J Immunol*. 1992 Aug 15;149(4):1319–25.
  52. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*. 2001 Feb 22;409(6823):1055–60.
  53. Choudhary S, De BP, Banerjee AK. Specific phosphorylated forms of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase associate with human parainfluenza virus type 3 and inhibit viral transcription in vitro. *J Virol*. 2000 Apr;74(8):3634–41.
  54. Gao J, De BP, Han Y, Choudhary S, Ransohoff R, Banerjee AK. Human parainfluenza virus type 3 inhibits gamma interferon-induced major histocompatibility complex class II expression directly and by inducing alpha/beta interferon. *J Virol*. 2001 Feb

- 1;75(3):1124–31.
55. Einarsson O, Geba GP, Zhu Z, Landry M, Elias JA. Interleukin-11: stimulation in vivo and in vitro by respiratory viruses and induction of airways hyperresponsiveness. *J Clin Invest.* 1996 Feb 15;97(4):915–24.
  56. Boonyaratanakornkit JB, Bartlett EJ, Amaro-Carambot E, Collins PL, Murphy BR, Schmidt AC. The C proteins of human parainfluenza virus type 1 (HPIV1) control the transcription of a broad array of cellular genes that would otherwise respond to HPIV1 infection. *J Virol.* 2009 Feb;83(4):1892–910.
  57. El Feghaly RE, McGann L, Bonville CA, Branigan PJ, Suryadevera M, Rosenberg HF, et al. Local production of inflammatory mediators during childhood parainfluenza virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2010 Apr;29(4):e26-31.
  58. Eberle KC, McGill JL, Reinhardt TA, Sacco RE. Parainfluenza Virus 3 Blocks Antiviral Mediators Downstream of the Interferon Lambda Receptor by Modulating Stat1 Phosphorylation. *J Virol.* 2016 Mar;90(6):2948–58.
  59. Welliver RC, Wong DT, Sun M, McCarthy N. Parainfluenza virus bronchiolitis. Epidemiology and pathogenesis. *Am J Dis Child.* 1986 Jan;140(1):34–40.
  60. van Asten L, van den Wijngaard C, van Pelt W, van de Kasstelee J, Meijer A, van der Hoek W, et al. Mortality attributable to 9 common infections: significant effect of influenza A, respiratory syncytial virus, influenza B, norovirus, and parainfluenza in elderly persons. *J Infect Dis.* 2012 Sep 1;206(5):628–39.
  61. Liu W-K, Liu Q, Chen D-H, Liang H-X, Chen X-K, Huang W-B, et al. Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. *BMC Infect Dis.* 2013;13:28.
  62. R. M. Chanock , R. H. Parrott , K. M. Johnson , A. Z. Kapikian and JAB. Myxoviruses: Parainfluenza. *ATS Journals.* 1963;88:152–66.
  63. Berman S. Epidemiology of Acute Respiratory Infections in Children of Developing Countries. *Clin Infect Dis .* 1991 May 1;13(Supplement 6):S454–62.
  64. Ansari SA, Springthorpe VS, Sattar SA, Rivard S, Rahman M. Potential role of hands in the spread of respiratory viral infections: studies with human parainfluenza virus 3 and rhinovirus 14. *J Clin Microbiol.* 1991 Oct;29(10):2115–9.
  65. Hsieh Y-J, Chin H, Chiu N-C, Huang F-Y. Hospitalized Pediatric Parainfluenza Virus

- Infections in a Medical Center. *J Microbiol Immunol Infect.* 2010;43(5):360–5.
66. Madhi SA, Klugman KP, Vaccine Trialist Group. A role for *Streptococcus pneumoniae* in virus-associated pneumonia. *Nat Med.* 2004 Aug;10(8):811–3.
  67. Bachrach VRG, Schwarz E, Bachrach LR. Breastfeeding and the Risk of Hospitalization for Respiratory Disease in Infancy. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2003 Mar 1;157(3):237.
  68. Weinberg GA. Parainfluenza viruses: an underappreciated cause of pediatric respiratory morbidity. *Pediatr Infect Dis J.* 2006 May [cited 2016 Oct 8];25(5):447–8.
  69. Fry AM, Curns AT, Harbour K, Hutwagner L, Holman RC, Anderson LJ. Seasonal trends of human parainfluenza viral infections: United States, 1990-2004. *Clin Infect Dis.* 2006 Oct 15;43(8):1016–22.
  70. Slavin KA, Passaro DJ, Hacker JK, Hendry RM, Kohl S. Parainfluenza virus type 4: case report and review of the literature. *Pediatr Infect Dis J.* 2000 Sep;19(9):893–6.
  71. Frost HM, Robinson CC, Dominguez SR. Epidemiology and clinical presentation of parainfluenza type 4 in children: a 3-year comparative study to parainfluenza types 1-3. *J Infect Dis.* 2014 Mar 1;209(5):695–702.
  72. Vachon M-L, Dionne N, Leblanc É, Moisan D, Bergeron MG, Boivin G. Human Parainfluenza Type 4 Infections, Canada.
  73. Chew FT, Doraisingam S, Ling AE, Kumarasinghe G, Lee BW. Seasonal trends of viral respiratory tract infections in the tropics. *Epidemiol Infect.* 1998 Aug;121(1):121–8.
  74. Walker TA, Khurana S, Tilden SJ. Viral respiratory infections. *Pediatr Clin North Am.* 1994 Dec;41(6):1365–81.
  75. Rubin EE, Quennec P, McDonald JC. Infections due to parainfluenza virus type 4 in children. *Clin Infect Dis.* 1993 Dec;17(6):998–1002.
  76. Vesa S, Kleemola M, Blomqvist S, Takala A, Kilpi T, Hovi T. Epidemiology of documented viral respiratory infections and acute otitis media in a cohort of children followed from two to twenty-four months of age. *Pediatr Infect Dis J.* 2001 Jun;20(6):574–81.
  77. Maeng SH, Yoo HS, Choi S-H, Yoo KH, Kim Y-J, Sung KW, et al. Impact of parainfluenza virus infection in pediatric cancer patients. *Pediatr Blood Cancer.* 2012 Oct;59(4):708–10.
  78. García-García ML, Calvo C, Pozo F, Pérez-Breña P, Quevedo S, Bracamonte T, et al.

- Human bocavirus detection in nasopharyngeal aspirates of children without clinical symptoms of respiratory infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 Apr;27(4):358–60.
79. Porter DD, Prince GA, Hemming VG, Porter HG. Pathogenesis of human parainfluenza virus 3 infection in two species of cotton rats: *Sigmodon hispidus* develops bronchiolitis, while *Sigmodon fulviventer* develops interstitial pneumonia. *J Virol.* 1991 Jan;65(1):103–11.
80. Calvo C, García-García ML, Ambrona P, Rico M, Pozo F, Del Mar Molinero M, et al. The burden of infections by parainfluenza virus in hospitalized children in Spain. *Pediatr Infect Dis J.* 2011 Sep;30(9):792–4.
81. García García ML, Aguilar Ruiz J, Echeverría Mayo JE, Calvo Rey C, Pinto Fuentes I, Ordobás Gabin M, et al. [Parainfluenza virus type 4 infections]. *An españoles Pediatr.* 2002 Aug;57(2):116–20.
82. ML. Arroba Basanta. Laringitis aguda (Crup). *An pediatría [Internet].* 2003 Jun;1(N S1):55–61.
83. Somani R, Evans MF. Role of glucocorticoids in treating croup. *Can Fam Physician.* 2001 Apr;47:733–5.
84. Henrickson KJ, Hoover S, Kehl KS, Hua W. National disease burden of respiratory viruses detected in children by polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J.* 2004 Jan;23(1 Suppl):S11-8.
85. Peltola V, Heikkinen T, Ruuskanen O. Clinical courses of croup caused by influenza and parainfluenza viruses. *Pediatr Infect Dis J.* 2002 Jan;21(1):76–8.
86. Blanquer J, Sanz F. Neumonía adquirida en la comunidad. *Arch Bronconeumol.* 2010.
87. Falsey AR. Current management of parainfluenza pneumonitis in immunocompromised patients: a review. *Infect Drug Resist.* 2012;5:121–7.
88. F. Álvez González JMSL. Faringoamigdalitis aguda.. p. 25–36.
89. Marom T, Nokso-Koivisto J, Chonmaitree T. Viral-bacterial interactions in acute otitis media. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2012 Dec;12(6):551–8.
90. Ruuskanen O, Arola M, Heikkinen T, Ziegler T. Viruses in acute otitis media: increasing evidence for clinical significance. *Pediatr Infect Dis J.* 1991 Jun;10(6):425–7.
91. Román G, Phillips CA, Poser CM. Parainfluenza virus type 3: isolation from CSF of a

- patient with Guillain-Barré syndrome. *JAMA*. 1978 Oct 6;240(15):1613–5.
92. Lehrich JR, Arnason BG, Fuller TC, Wray SH. Parainfluenza, histocompatibility, and multiple sclerosis. Association of parainfluenza antibodies and histocompatibility types in MS and optic neuritis. *Arch Neurol*. 1974 Apr;30(4):327–9.
93. Vreede RW, Schellekens H, Zuijderwijk M. Isolation of parainfluenza virus type 3 from cerebrospinal fluid. *J Infect Dis*. 1992 Jun;165(6):1166.
94. Arisoy ES, Demmler GJ, Thakar S, Doerr C. Meningitis due to parainfluenza virus type 3: report of two cases and review. *Clin Infect Dis*. 1993 Dec;17(6):995–7.
95. Bitnun A, Ford-Jones EL, Petric M, MacGregor D, Heurter H, Nelson S, et al. Acute childhood encephalitis and *Mycoplasma pneumoniae*. *Clin Infect Dis*. 2001 Jun 15;32(12):1674–84.
96. Olivares F, Salinas M, Soto A, Dabanch J, Fica A. Severe acute disseminated encephalomyelitis associated with parainfluenza 3 infection: Case report. *Rev Chilena Infectol*. 2015 Aug;32(4):476–81.
97. Seidman DS, Nass D, Mendelson E, Shehtman I, Mashiach S, Achiron R. Prenatal ultrasonographic diagnosis of fetal hydrocephalus due to infection with parainfluenza virus type 3. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1996 Jan ;7(1):52–4.
98. Downham MA, McQuillin J, Gardner PS. Diagnosis and clinical significance of parainfluenza virus infections in children. *Arch Dis Child*. 1974 Jan;49(1):8–15.
99. Richardson L, Brite J, Del Castillo M, Childers T, Sheahan A, Huang Y-T, et al. Comparison of respiratory virus shedding by conventional and molecular testing methods in patients with haematological malignancy. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Apr;22(4):380.e1-7.
100. Cohen AL, Sahr PK, Treurnicht F, Walaza S, Groome MJ, Kahn K, et al. Parainfluenza Virus Infection Among Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected and HIV-Uninfected Children and Adults Hospitalized for Severe Acute Respiratory Illness in South Africa, 2009-2014. *Open forum Infect Dis*. 2015 Dec;2(4):ofv139.
101. Karp D, Willis J, Wilfert CM. Parainfluenza virus II and the immunocompromised host. *Am J Dis Child*. 1974 Apr;127(4):592–3.
102. Weintrub PS, Sullender WM, Lombard C, Link MP, Arvin A. Giant cell pneumonia caused by parainfluenza type 3 in a patient with acute myelomonocytic leukemia. *Arch Pathol*

- Lab Med. 1987 Jun;111(6):569–70.
103. Wendt CH, Weisdorf DJ, Jordan MC, Balfour HH, Hertz MI. Parainfluenza Virus Respiratory Infection after Bone Marrow Transplantation. *N Engl J Med.* 1992 Apr 2 ;326(14):921–6.
  104. McSherry GD. Human immunodeficiency-virus-related pulmonary infections in children. *Semin Respir Infect.* 1996 Sep;11(3):173–83.
  105. Lewis VA, Champlin R, Englund J, Couch R, Goodrich JM, Rolston K, et al. Respiratory disease due to parainfluenza virus in adult bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 1996 Nov;23(5):1033–7.
  106. Whimbey E, Englund JA, Couch RB. Community respiratory virus infections in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med.* 1997 Mar 17;102(3A):10-8-6.
  107. Luján-Zilbermann J, Benaim E, Tong X, Srivastava DK, Patrick CC, DeVincenzo JP. Respiratory virus infections in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2001 Oct 1;33(7):962–8.
  108. Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. Parainfluenza virus infections after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, response to antiviral therapy, and effect on transplant outcome. *Blood.* 2001 Aug 1;98(3):573–8.
  109. Srinivasan A, Wang C, Yang J, Inaba H, Shenep JL, Leung WH, et al. Parainfluenza virus infections in children with hematologic malignancies. *Pediatr Infect Dis J.* 2011 Oct;30(10):855–9.
  110. Vilchez RA, McCurry K, Dauber J, Iacono A, Keenan R, Zeevi A, et al. The Epidemiology of Parainfluenza Virus Infection in Lung Transplant Recipients. *Clin Infect Dis.* 2001 Dec 15;33(12):2004–8.
  111. Srinivasan A, Wang C, Yang J, Shenep JL, Leung WH, Hayden RT. Symptomatic Parainfluenza Virus Infections in Children Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(10):1520–7.
  112. Maziarz RT, Sridharan P, Slater S, Meyers G, Post M, Erdman DD, et al. Control of an Outbreak of Human Parainfluenza Virus 3 in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 Feb;16(2):192–8.
  113. Piralla A, Percivalle E, Di Cesare-Merlone A, Locatelli F, Gerna G. Multicenter nosocomial outbreak of parainfluenza virus type 3 infection in a pediatric oncohematology

- unit: a phylogenetic study. *Haematologica*. 2009;94(6).
114. Campbell AP, Chien JW, Kuypers J, Englund JA, Wald A, Guthrie KA, et al. Respiratory virus pneumonia after hematopoietic cell transplantation (HCT): associations between viral load in bronchoalveolar lavage samples, viral RNA detection in serum samples, and clinical outcomes of HCT. *J Infect Dis*. 2010 May 1;201(9):1404–13.
  115. Hotez PJ, Goldstein B, Ziegler J, Doveikis SA, Pasternack MS. Adult respiratory distress syndrome associated with parainfluenza virus type 1 in children. *Pediatr Infect Dis J*. 1990 Oct;9(10):750–2.
  116. Perämäki E, Salmi I, Kava T, Romppanen T, Hakkarainen T. Unilateral bronchiolitis obliterans organizing pneumonia and bronchoalveolar lavage neutrophilia in a patient with parainfluenza 3 virus infection. *Respir Med*. 1991 Mar ;85(2):159–61.
  117. Zollar LM, Mufson MA. Acute parotitis associated with parainfluenza 3 virus infection. *Am J Dis Child*. 1970 Feb;119(2):147–8.
  118. MacDonald NE, Wolfish N, McLaine P, Phipps P, Rossier E. Role of respiratory viruses in exacerbations of primary nephrotic syndrome. *J Pediatr*. 1986 Mar;108(3):378–82.
  119. Wilks D, Burns SM. Myopericarditis associated with parainfluenza virus type 3 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998 May;17(5):363–5.
  120. Visseren FL, Bouwman JJ, Bouter KP, Diepersloot RJ, de Groot PH, Erkelens DW. Procoagulant activity of endothelial cells after infection with respiratory viruses. *Thromb Haemost*. 2000 Aug;84(2):319–24.
  121. Kim H-K, Oh S-H, Yun KA, Sung H, Kim M-N. Comparison of Anyplex II RV16 with the xTAG respiratory viral panel and Seeplex RV15 for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol*. 2013 Apr;51(4):1137–41.
  122. Weinberg GA, Erdman DD, Edwards KM, Hall CB, Walker FJ, Griffin MR, et al. Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. *J Infect Dis*. 2004 Feb 15;189(4):706–10.
  123. 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*. 2011;6(6):e21610.
  124. Hammitt LL, Kazungu S, Welch S, Bett A, Onyango CO, Gunson RN, et al. Added value

- of an oropharyngeal swab in detection of viruses in children hospitalized with lower respiratory tract infection. *J Clin Microbiol.* 2011 Jun;49(6):2318–20.
125. Debyle C, Bulkow L, Miernyk K, Chikoyak L, Hummel KB, Hennessy T, et al. Comparison of nasopharyngeal flocculated swabs and nasopharyngeal wash collection methods for respiratory virus detection in hospitalized children using real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 2012 Oct;185(1):89–93.
126. Shimokata K, Ito Y, Nishiyama Y, Kimura Y. Influence of Trypsin on the Infectivity and Biological Properties of Parainfluenza Type 2 (Croup-associated) Virus in Vero Cells. *J Gen Virol.* 1980 Jun 1;48(2):407–10.
127. Henrickson KJ, Kuhn SM, Savatski LL, Sedmak J. Recovery of human parainfluenza virus types one and two. *J Virol Methods.* 1994 Feb;46(2):189–205.
128. Puthavathana P, Wasi C, Kositanont U, Suwanjutha S, Chantarojanasiri T, Kantakamalakul W, et al. A hospital-based study of acute viral infections of the respiratory tract in Thai children, with emphasis on laboratory diagnosis. *Rev Infect Dis.*;12 Suppl 8:S988-94.
129. Ivaska L, Niemelä J, Heikkinen T, Vuorinen T, Peltola V. Identification of respiratory viruses with a novel point-of-care multianalyte antigen detection test in children with acute respiratory tract infection. *J Clin Virol.* 2013 Jun;57(2):136–40.
130. Terlizzi ME, Massimiliano B, Francesca S, Sinesi F, Rosangela V, Stefano G, et al. Quantitative RT real time PCR and indirect immunofluorescence for the detection of human parainfluenza virus 1, 2, 3. *J Virol Methods.* 2009 Sep;160(1–2):172–7.
131. Rabalais GP, Stout GG, Ladd KL, Cost KM. Rapid diagnosis of respiratory viral infections by using a shell vial assay and monoclonal antibody pool. *J Clin Microbiol.* 1992 Jun;30(6):1505–8.
132. Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, Carroll KC. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J Clin Microbiol.* 2004 Jan;42(1):79–82.
133. Puppe W, Weigl JAI, Aron G, Gröndahl B, Schmitt H-J, Niesters HGM, et al. Evaluation of a multiplex reverse transcriptase PCR ELISA for the detection of nine respiratory tract pathogens. *J Clin Virol.* 2004 Jun;30(2):165–74.
134. Selvaraju SB, Selvarangan R. Evaluation of xTAG Respiratory Viral Panel FAST and xTAG Human Parainfluenza Virus Analyte-Specific Reagents for detection of human



- parainfluenza viruses in respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 Mar;72(3):278–81.
135. Echevarría JE, Erdman DD, Meissner HC, Anderson L. Rapid molecular epidemiologic studies of human parainfluenza viruses based on direct sequencing of amplified DNA from a multiplex RT-PCR assay. *J Virol Methods*. 2000 Jul;88(1):105–9.
136. Freymuth F, Vabret A, Galateau-Salle F, Ferey J, Eugene G, Petitjean J, et al. Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenzavirus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization. *Clin Diagn Virol*. 1997 May;8(1):31–40.
137. Barenfanger J, Drake C, Leon N, Mueller T, Troutt T. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. *J Clin Microbiol*. 2000 Aug;38(8):2824–8.
138. Hindiyeh M, Hillyard DR, Carroll KC. Evaluation of the Prodesse Hexaplex Multiplex PCR Assay for Direct Detection of Seven Respiratory Viruses in Clinical Specimens. *Am J Clin Pathol*. 2001 Aug 1;116(2):218–24.
139. Liolios L, Jenney A, Spelman D, Kotsimbos T, Catton M, Wesselingh S. Comparison of a multiplex reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay with conventional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens. *J Clin Microbiol*. 2001 Aug;39(8):2779–83.
140. Rosychuk RJ, Klassen TP, Metes D, Voaklander DC, Senthilselvan A, Rowe BH. Croup presentations to emergency departments in Alberta, Canada: A large population-based study. *Pediatr Pulmonol*. 2010 Jan;45(1):83–91.
141. Bjornson CL, Johnson DW. Croup. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2008 Jan 26;371(9609):329–39.
142. Waghmare A, Wagner T, Andrews R, Smith S, Kuypers J, Boeckh M, et al. Successful Treatment of Parainfluenza Virus Respiratory Tract Infection With DAS181 in 4 Immunocompromised Children. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2015 Jun;4(2):114–8.
143. Russell KF, Liang Y, O’Gorman K, Johnson DW, Klassen TP. Glucocorticoids for croup. In: Klassen TP, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2011. p. CD001955.
144. Çetinkaya F, Tüfekçi BS, Kutluk G. A comparison of nebulized budesonide, and

- intramuscular, and oral dexamethasone for treatment of croup. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2004 Apr;68(4):453–6.
145. Bjornson C, Russell K, Vandermeer B, Klassen TP, Johnson DW. Nebulized epinephrine for croup in children. In: Bjornson C, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. CD006619.
146. Chakrabarti S, Collingham KE, Holder K, Oyaide S, Pillay D, Milligan DW. Parainfluenza virus type 3 infections in hematopoietic stem cell transplant recipients: response to ribavirin therapy. *Clin Infect Dis.* 2000 Dec;31(6):1516–8.
147. Nichols WG, Gooley T, Boeckh M. Community-acquired respiratory syncytial virus and parainfluenza virus infections after hematopoietic stem cell transplantation: the Fred Hutchinson Cancer Research Center experience. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2001;7 Suppl:11S–15S.
148. Hayden FG. Advances in antivirals for non-influenza respiratory virus infections. *Influenza Other Respi Viruses.* 2013 Nov;7 Suppl 3:36–43.
149. Dhakal B, D'Souza A, Pasquini M, Saber W, Fenske TS, Moss RB, et al. DAS181 Treatment of Severe Parainfluenza Virus 3 Pneumonia in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients Requiring Mechanical Ventilation. *Case Rep Med.* 2016;2016:8503275.
150. Guzmán-Suarez BB, Buckley MW, Gilmore ET, Vocca E, Moss R, Marty FM, et al. Clinical potential of DAS181 for treatment of parainfluenza-3 infections in transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2012 Aug;14(4):427–33.
151. Murrell MT, Porotto M, Greengard O, Poltoratskaia N, Moscona A. A single amino acid alteration in the human parainfluenza virus type 3 hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein confers resistance to the inhibitory effects of zanamivir on receptor binding and neuraminidase activity. *J Virol.* 2001 Jul 15;75(14):6310–20.
152. Saladino R, Crestini C, Palamara AT, Danti MC, Manetti F, Corelli F, et al. Synthesis, biological evaluation, and pharmacophore generation of uracil, 4(3H)-pyrimidinone, and uridine derivatives as potent and selective inhibitors of parainfluenza 1 (Sendai) virus. *J Med Chem.* 2001 Dec 20;44(26):4554–62.
153. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, Health Care Infection Control Practices Advisory Committee. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *Am J Infect Control.* 2007 Dec;35(10):S65–

- 164.
154. Burke CW, Li M, Hurwitz JL, Vogel P, Russell CJ. Relationships among dissemination of primary parainfluenza virus infection in the respiratory tract, mucosal and peripheral immune responses, and protection from reinfection: a noninvasive bioluminescence-imaging study. *J Virol*. 2015 Apr;89(7):3568–83.
155. Karron RA, Belshe RB, Wright PF, Thumar B, Burns B, Newman F, et al. A live human parainfluenza type 3 virus vaccine is attenuated and immunogenic in young infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2003 May;22(5):394–405.
156. Karron RA, Thumar B, Schappell E, Surman S, Murphy BR, Collins PL, et al. Evaluation of two chimeric bovine-human parainfluenza virus type 3 vaccines in infants and young children. *Vaccine*. 2012 Jun 6;30(26):3975–81.
157. Zemlin M, Hoersch G, Zemlin C, Pohl-Schickinger A, Hummel M, Berek C, et al. The postnatal maturation of the immunoglobulin heavy chain IgG repertoire in human preterm neonates is slower than in term neonates. *J Immunol*. 2007 Jan 15;178(2):1180–8.
158. Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, Melendi GA, Hernandez JZ, Batalle JP, et al. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat Med*. 2009 Jan;15(1):34–41.
159. Fulginiti VA, Eller JJ, Sieber OF, Joyner JW, Minamitani M, Meiklejohn G. Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine. *Am J Epidemiol*. 1969 Apr;89(4):435–48.
160. Murphy BR, Graham BS, Prince GA, Walsh EE, Chanock RM, Karzon DT, et al. Serum and nasal-wash immunoglobulin G and A antibody response of infants and children to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins following primary infection. *J Clin Microbiol*. 1986 Jun;23(6):1009–14.
161. Schmidt AC. Progress in respiratory virus vaccine development. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011 Aug;32(4):527–40.
162. Bartlett EJ, Castaño A, Surman SR, Collins PL, Skiadopoulos MH, Murphy BR. Attenuation and efficacy of human parainfluenza virus type 1 (HPIV1) vaccine candidates containing stabilized mutations in the P/C and L genes. *Virol J*. 2007 Jul 2;4:67.
163. Bernstein DI, Falloon J, Yi T. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2a

- study of the safety and immunogenicity of a live, attenuated human parainfluenza virus type 3 vaccine in healthy infants. *Vaccine*. 2011 Sep 16;29(40):7042–8.
164. Murphy BR, Hall SL, Kulkarni AB, Crowe JE, Collins PL, Connors M, et al. An update on approaches to the development of respiratory syncytial virus (RSV) and parainfluenza virus type 3 (PIV3) vaccines. *Virus Res*. 1994 Apr;32(1):13–36.
165. Durbin AP, Wyatt LS, Siew J, Moss B, Murphy BR. The immunogenicity and efficacy of intranasally or parenterally administered replication-deficient vaccinia-parainfluenza virus type 3 recombinants in rhesus monkeys. *Vaccine*. 1998 Aug;16(13):1324–30.
166. Lee MS, Greenberg DP, Yeh SH, Yogev R, Reisinger KS, Ward JI, et al. Antibody responses to bovine parainfluenza virus type 3 (PIV3) vaccination and human PIV3 infection in young infants. *J Infect Dis*. 2001 Oct 1;184(7):909–13.
167. Greenberg DP, Walker RE, Lee M-S, Reisinger KS, Ward JI, Yogev R, et al. A bovine parainfluenza virus type 3 vaccine is safe and immunogenic in early infancy. *J Infect Dis*. 2005 Apr 1;191(7):1116–22.
168. Crowe JE. Current approaches to the development of vaccines against disease caused by respiratory syncytial virus (RSV) and parainfluenza virus (PIV). A meeting report of the WHO Programme for Vaccine Development. *Vaccine* . 1995 Mar;13(4):415–21.
169. Karron RA, Makhene M, Gay K, Wilson MH, Clements ML, Murphy BR. Evaluation of a live attenuated bovine parainfluenza type 3 vaccine in two- to six-month-old infants. *Pediatr Infect Dis J*. 1996 Aug;15(8):650–4.
170. Karron RA, San Mateo J, Thumar B, Schaap-Nutt A, Buchholz UJ, Schmidt AC, et al. Evaluation of a Live-Attenuated Human Parainfluenza Type 1 Vaccine in Adults and Children. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2015 Dec;4(4):e143-6.
171. Haller AA, Miller T, Mitiku M, Coelingh K. Expression of the surface glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by bovine parainfluenza virus type 3, a novel attenuated virus vaccine vector. *J Virol*. 2000 Dec;74(24):11626–35.
172. Schmidt AC, McAuliffe JM, Murphy BR, Collins PL. Recombinant Bovine/Human Parainfluenza Virus Type 3 (B/HPIV3) Expressing the Respiratory Syncytial Virus (RSV) G and F Proteins Can Be Used To Achieve Simultaneous Mucosal Immunization against RSV and HPIV3. *J Virol*. 2001 May 15;75(10):4594–603.
173. Gomez M, Mufson MA, Dubovsky F, Knightly C, Zeng W, Losonsky G. Phase-i study

- medi-534, of a live, attenuated intranasal vaccine against respiratory syncytial virus and parainfluenza-3 virus in seropositive children. *Pediatr Infect Dis J.* 2009 Jul;28(7):655–8.
174. Belshe RB, Newman FK, Tsai TF, Karron RA, Reisinger K, Robertson D, et al. Phase 2 evaluation of parainfluenza type 3 cold passage mutant 45 live attenuated vaccine in healthy children 6-18 months old. *J Infect Dis.* 2004 Feb 1;189(3):462–70.
175. Belshe RB, Newman FK, Anderson EL, Wright PF, Karron RA, Tollefson S, et al. Evaluation of combined live, attenuated respiratory syncytial virus and parainfluenza 3 virus vaccines in infants and young children. *J Infect Dis.* 2004 Dec 15;190(12):2096–103.
176. Madhi SA, Cutland C, Zhu Y, Hackell JG, Newman F, Blackburn N, et al. Transmissibility, infectivity and immunogenicity of a live human parainfluenza type 3 virus vaccine (HPIV3cp45) among susceptible infants and toddlers. *Vaccine.* 2006 Mar 20;24(13):2432–9.
177. Englund JA, Karron RA, Cunningham CK, LaRussa P, Melvin A, Yogeve R, et al. Safety and infectivity of two doses of live-attenuated recombinant cold-passaged human parainfluenza type 3 virus vaccine rHPIV3cp45 in HPIV3-seronegative young children. *Vaccine.* 2013 Nov 19;31(48):5706–12.
178. Karron RA, Casey R, Thumar B, Surman S, Murphy BR, Collins PL, et al. The cDNA-derived Investigational Human Parainfluenza Virus Type 3 Vaccine rcp45 Is Well Tolerated, Infectious, and Immunogenic in Infants and Young Children. *Pediatr Infect Dis J.* 2011 Oct;30(10):e186–91.
179. Slobod KS, Shenep JL, Luján-Zilbermann J, Allison K, Brown B, Scroggs RA, et al. Safety and immunogenicity of intranasal murine parainfluenza virus type 1 (Sendai virus) in healthy human adults. *Vaccine.* 2004;22(23):3182–6.
180. Adderson E, Branum K, Sealy RE, Jones BG, Surman SL, Penkert R, et al. Safety and Immunogenicity of an Intranasal Sendai Virus-Based Human Parainfluenza Virus Type 1 Vaccine in 3- to 6-Year-Old Children. Plotkin SA, editor. *Clin Vaccine Immunol.* 2015 Mar;22(3):298–303.
181. Mackow N, Amaro-Carambot E, Liang B, Surman S, Lingemann M, Yang L, et al. Attenuated Human Parainfluenza Virus Type 1 (HPIV1) Expressing the Fusion Glycoprotein of Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) as a Bivalent HPIV1/RSV Vaccine. *J Virol.* 2015 Oct;89(20):10319–32.

182. Nolan SM, Skiadopoulos MH, Bradley K, Kim OS, Bier S, Amaro-Carambot E, et al. Recombinant human parainfluenza virus type 2 vaccine candidates containing a 3' genomic promoter mutation and L polymerase mutations are attenuated and protective in non-human primates. *Vaccine*. 2007;25(34):6409–22.
183. Jones B, Zhan X, Mishin V, Slobod KS, Surman S, Russell CJ, et al. Human PIV-2 recombinant Sendai virus (rSeV) elicits durable immunity and combines with two additional rSeVs to protect against hPIV-1, hPIV-2, hPIV-3, and RSV. *Vaccine*. 2009 Mar 13;27(12):1848–57.
184. Denny FW. The clinical impact of human respiratory virus infections. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Oct;152(4 Pt 2):S4-12.
185. Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet (London, England)*. 2010 Jun 5;375(9730):1969–87.
186. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009 Sep 12;374(9693):893–902.
187. Watt JP, Wolfson LJ, O'Brien KL, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet (London, England)*. 2009 Sep 12 ;374(9693):903–11.
188. Steffens A, Finelli L, Whitaker B, Fowlkes A. Population-based Surveillance for Medically Attended Human Parainfluenza Viruses From the Influenza Incidence Surveillance Project, 2010-2014. *Pediatr Infect Dis J*. 2016 Jul;35(7):717–22.
189. Swamy MA, Malhotra B, Reddy PVJ, Kumar N, Tiwari JK, Gupta ML. Distribution and Trends of Human Parainfluenza Viruses in Hospitalised Children. *Indian J Pediatr*. 2016 Oct 13;83(10):1109–13.
190. Nair H, Simões EAF, Rudan I, Gessner BD, Azziz-Baumgartner E, Zhang JSF, et al. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *Lancet (London, England)*. 2013 Apr 20;381(9875):1380–90.
191. Ran Kim M, Ran Lee H, Man Lee G. Epidemiology of Acute Viral Respiratory Tract Infections in Korean Children. *J Infect*. 2000 Sep;41(2):152–8.

192. Abedi GR, Prill MM, Langley GE, Wikswa ME, Weinberg GA, Curns AT, et al. Estimates of Parainfluenza Virus-Associated Hospitalizations and Cost Among Children Aged Less Than 5 Years in the United States, 1998–2010. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2016 Mar;5(1):7–13.
193. Tuffaha A, Gern JE, Lemanske RF. The role of respiratory viruses in acute and chronic asthma. *Clin Chest Med.* 2000 Jun;21(2):289–300.
194. Marx A, Török TJ, Holman RC, Clarke MJ, Anderson LJ. Pediatric hospitalizations for croup (laryngotracheobronchitis): biennial increases associated with human parainfluenza virus 1 epidemics. *J Infect Dis.* 1997 Dec;176(6):1423–7.
195. Coiras MT, Aguilar JC, García ML, Casas I, Pérez-Breña P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol.* 2004 Mar;72(3):484–95.
196. Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol.* 1998 Oct;36(10):2990–5.
197. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt H-R, Becker S, et al. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N Engl J Med.* 2003 May 15;348(20):1967–76.
198. Vabret A, Mourez T, Dina J, van der Hoek L, Gouarin S, Petitjean J, et al. Human coronavirus NL63, France. *Emerg Infect Dis.* 2005 Aug;11(8):1225–9.
199. Atsushi Kaida, Nobuhiro Iritani, Hideyuki Kubo, Masashi Shiomi, Urara Kohdera TM. Seasonal distribution and phylogenetic analysis of human metapneumovirus among children in Osaka City, Japan. *J Clin Virol.* 2006 Apr 1;35(4):394–9.
200. Steininger C, Aberle SW, Popow-Kraupp T. Early Detection of Acute Rhinovirus Infections by a Rapid Reverse Transcription-PCR Assay. *J Clin Microbiol.* 2001 Jan 1;39(1):129–33.
201. Xu W, McDonough MC, Erdman DD. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2000 Nov;38(11):4114–20.
202. Fouchier RA, Bestebroer TM, Herfst S, Van Der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol.* 2000 Nov;38(11):4096–101.

203. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 6;102(36):12891–6.
204. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human Bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2006 May;12(5):848–50.
205. Bonner AB, Monroe KW, Talley LI, Klasner AE, Kimberlin DW. Impact of the rapid diagnosis of influenza on physician decision-making and patient management in the pediatric emergency department: results of a randomized, prospective, controlled trial. *Pediatrics*. 2003 Aug;112(2):363–7.
206. Doan Q, Enarson P, Kisson N, Klassen TP, Johnson DW. Rapid viral diagnosis for acute febrile respiratory illness in children in the Emergency Department. In: Doan Q, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2012.
207. Huijskens EG, Biesmans RC, Buiting AG, Obihara CC, Rossen JW. Diagnostic value of respiratory virus detection in symptomatic children using real-time PCR.
208. Gill PJ, Richardson SE, Ostrow O, Friedman JN. Testing for Respiratory Viruses in Children. *JAMA Pediatr*. 2017 Aug 1;171(8):798.
209. Wishaupt JO, Van Der Ploeg T, De Groot R, Versteegh FGA, Hartwig NG. Single-and multiple viral respiratory infections in children: disease and management cannot be related to a specific pathogen. *BMC Infect Dis*. 2017;17.
210. Calvo C, García-García ML, Pozo F, Carballo D, Martínez-Monteserín E, Casas I. Infections and coinfections by respiratory human bocavirus during eight seasons in hospitalized children. *J Med Virol*. 2016 Dec;88(12):2052–8.
211. Legg JP, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Frequency of detection of picornaviruses and seven other respiratory pathogens in infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 Jul;24(7):611–6.
212. Pecchini R, Berezin EN, Souza MC, de Andrade Vaz-de-Lima L, Sato N, Salgado M, et al. Parainfluenza virus as a cause of acute respiratory infection in hospitalized children. *Brazilian J Infect Dis*. 2015 Jul;19(4):358–62.
213. Lu Y, Wang S, Zhang L, Xu C, Bian C, Wang Z, et al. Clinical Study Epidemiology of Human Respiratory Viruses in Children with Acute Respiratory Tract Infections in Jinan,



- China. *Clin Dev Immunol*. 2013;8.
214. Liu T, Li Z, Zhang S, Song S, Julong W, Lin Y, et al. Viral Etiology of acute respiratory tract infections in hospitalized children and adults in Shandong Province, China. *Virol J*. 2015 Dec 14;12(1):168.
215. Lukšić I, Kearns PK, Scott F, Rudan I, Campbell H, Nair H. Viral etiology of hospitalized acute lower respiratory infections in children under 5 years of age -- a systematic review and meta-analysis. *Croat Med J*. 2013 Apr;54(2):122–34.
216. Cantais A, Mory O, Pillet S, Verhoeven PO, Bonneau J, Patural H, et al. Epidemiology and microbiological investigations of community-acquired pneumonia in children admitted at the emergency department of a university hospital. *J Clin Virol*. 2014 Aug ;60(4):402–7.
217. Harada Y, Kinoshita F, Yoshida LM, Minh LN, Suzuki M, Morimoto K, et al. Does Respiratory Virus Coinfection Increases the Clinical Severity of Acute Respiratory Infection Among Children Infected With Respiratory Syncytial Virus? *Pediatr Infect Dis J*. 2013 May;32(5):441–5.
218. TRAN DN, TRINH QD, PHAM NTK, VU MP, HA MT, NGUYEN TQN, et al. Clinical and epidemiological characteristics of acute respiratory virus infections in Vietnamese children. *Epidemiol Infect*. 2016 Feb 6;144(3):527–36.
219. Tecu C, Mihai ME, Alexandrescu VI, Orășeanu D, Zapucioiu C, Ivanciuc AE, et al. Single and multipathogen viral infections in hospitalized children with acute respiratory infections. *Roum Arch Microbiol Immunol*;72(4):242–9.
220. Asner SA, Rose W, Petrich A, Richardson S, Tran DJ. Is virus coinfection a predictor of severity in children with viral respiratory infections? *Clin Microbiol Infect*. 2015 Mar;21(3):264.e1-264.e6.
221. Calvo C, García-García ML, Blanco C, Vázquez MC, Frías ME, Pérez-Breña P, et al. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. *J Clin Virol*. 2008 Jul;42(3):268–72.
222. Martin ET, Kuypers J, Wald A, Englund JA. Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children. *Influenza Other Respi Viruses*. 2012 Jan;6(1):71–7.
223. Bharaj P, Sullender WM, Kabra SK, Mani K, Cherian J, Tyagi V, et al. Respiratory viral

- infections detected by multiplex PCR among pediatric patients with lower respiratory tract infections seen at an urban hospital in Delhi from 2005 to 2007. *Virology*. 2009;6(6).
224. Kumar P, Medigeshi GR, Mishra VS, Islam M, Randev S, Mukherjee A, et al. Etiology of Acute Respiratory Infections in Infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2017 Jan;36(1):25–30.
225. Essa S, Owayed A, Altawalah H, Khadadah M, Behbehani N, Al-Nakib W. Mixed Viral Infections Circulating in Hospitalized Patients with Respiratory Tract Infections in Kuwait. *Adv Virol*. 2015 Apr 23;2015.
226. Sentilhes A-C, Choumlivong K, Celhay O, Sisouk T, Phonekeo D, Vongphrachanh P, et al. Respiratory virus infections in hospitalized children and adults in Lao PDR. *Influenza Other Respi Viruses*. 2013 Nov;7(6):1070–8.
227. Wu Z, Li Y, Gu J, Zheng H, Tong Y, Wu Q. Detection of viruses and atypical bacteria associated with acute respiratory infection of children in Hubei, China. *Respirology*. 2014 Feb ;19(2):218–24.
228. 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 Mar;14(1):38–45.
229. Bassant Meligy, Amal Sayed, Dalia Kadry Ismail, Dina Kamal, Walaa Abdel-Latif DME. Detection of viral acute lower respiratory tract infection in hospitalized infants using real-time PCR. *Egypt Pediatr Assoc Gaz*. 2016 Mar 1;64(1):13–9.
230. Chen Z-R, Mize M, Wang Y-Q, Yan Y-D, Zhu C-H, Wang Y, et al. Clinical and epidemiological profiles of lower respiratory tract infection in hospitalized children due to human bocavirus in a subtropical area of China. *J Med Virol*. 2014 Dec 1;86(12):2154–62.
231. Calvo C, García-García ML, Pozo F, Carvajal O, Pérez-Breña P, Casas I. Clinical Characteristics of Human Bocavirus Infections Compared With Other Respiratory Viruses in Spanish Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Aug;27(8):677–80.
232. Essa S, Al-Tawalah H, Alshamali S, Al-Nakib W. The potential influence of human parainfluenza viruses detected during hospitalization among critically ill patients in Kuwait, 2013–2015.
233. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016 Aug 22;16(10):626–38.

234. Ruggieri A, Anticoli S, D'Ambrosio A, Giordani L, Viora M. The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination. doi.org.;52(2):198–204.
235. Ren L, Gonzalez R, Xie Z, Xiong Z, Liu C, Xiang Z, et al. Human parainfluenza virus type 4 infection in Chinese children with lower respiratory tract infections: A comparison study. *J Clin Virol*. 2011 Jul;51(3):209–12.
236. ZHAO H, HARRIS RJ, ELLIS J, DONATI M, PEBODY RG. Epidemiology of parainfluenza infection in England and Wales, 1998–2013: any evidence of change? *Epidemiol Infect* 2017 Apr 18;145(6):1210–20.
237. Iwane MK, Edwards KM, Szilagyi PG, Walker FJ, Griffin MR, Weinberg GA, et al. Population-Based Surveillance for Hospitalizations Associated With Respiratory Syncytial Virus, Influenza Virus, and Parainfluenza Viruses Among Young Children. *Pediatrics*. 2004;113(6). 238. Hall CB. Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus. *N Engl J Med* [Internet]. 2001 Jun 21 [cited 2017 Nov 7];344(25):1917–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11419430>
239. Carballal G, Videla CM, Espinosa MA, Savy V, Uez O, Sequeira MD, et al. Multicentered study of viral acute lower respiratory infections in children from four cities of Argentina, 1993-1994. *J Med Virol*. 2001 Jun 1;64(2):167–74.
240. Cilla G, Oñate E, Perez-Yarza EG, Montes M, Vicente D, Perez-Trallero E. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: High rate of viral coinfection. *J Med Virol*. 2008 Oct 1;80(10):1843–9.
241. Pisacane A, Graziano L, Zona G, Granata G, Dolezalova H, Cafiero M, et al. Breast feeding and acute lower respiratory infection. *Acta Paediatr*. 1994 Jul;83(7):714–8.
242. Ball TM, Wright AL. Health care costs of formula-feeding in the first year of life. *Pediatrics*. 1999 Apr;103(4 Pt 2):870–6.
243. Oddy WH, Sly PD, De Klerk NH, Landau LI, Kendall GE, Holt PG, et al. Breast feeding and respiratory morbidity in infancy: a birth cohort study. *Arch Dis Child*. 2003;88:224–8.
244. Paricio Talayero JM. Papel protector de la lactancia materna en las infecciones de la infancia: análisis crítico de la metodología de estudio. *Evid Pediatr* . 2007;(3: 61).
245. Quigley MA, Kelly YJ, Sacker A. Breastfeeding and hospitalization for diarrheal and respiratory infection in the United Kingdom Millennium Cohort Study. *Pediatrics*. 2007 Apr 1;119(4):e837-42.

246. Liwright A, Olberg CJ, Martinez FD, Jørgensen W, Mfaussig L. Breast feeding and lower respiratory tract illness in the first year of life.
247. Patel R, Oken E, Bogdanovich N, Matush L, Sevkovskaya Z, Chalmers B, et al. Cohort profile: The promotion of breastfeeding intervention trial (PROBIT). *Int J Epidemiol*. 2014 Jun;43(3):679–90.
248. Quach C, Shah R, Rubin LG. Burden of Healthcare-Associated Viral Respiratory Infections in Children's Hospitals. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2016 Dec 30;piw072.
249. Dunn GL, Tapson H, Davis J, Gobin M. Outbreak of Piv-3 in a Neonatal Intensive Care Unit in England. *Pediatr Infect Dis J*. 2017 Mar;36(3):344–5.
250. Teo WY, Rajadurai VS, Sriram B. Morbidity of parainfluenza 3 outbreak in preterm infants in a neonatal unit. *Ann Acad Med Singapore*. 2010 Nov;39(11):837–6.
251. Simmonds A, Munoz J, Montecalvo M, Clones B, LaGamma E. Outbreak of Parainfluenza Virus Type 3 in a Neonatal Intensive Care Unit. *Am J Perinatol*. 2009 May 11;26(5):361–4.
252. Berrueco R, Antón A, Rives S, Català A, Toll T, Ruiz A, et al. Multiplex real-time PCR for prompt diagnosis of an outbreak of human parainfluenza 3 virus in children with acute leukemia. *Infection*. 2013 Dec 3;41(6):1171–5.
253. Helanterä I, Anttila V-J, Loginov R, Lempinen M. Parainfluenza 3 Infections Early After Kidney or Simultaneous Pancreas-Kidney Transplantation. *Am J Transplant*. 2017 Mar 1;17(3):809–12.
254. Greninger AL, Zerr DM, Qin X, Adler AL, Sampoleo R, Kuypers JM, et al. Rapid Metagenomic Next-Generation Sequencing during an Investigation of Hospital-Acquired Human Parainfluenza Virus 3 Infections. McAdam AJ, editor. *J Clin Microbiol*. 2017 Jan;55(1):177–82.
255. Arana A. Epidemiología de la infección por totavirus en Gipuzkoa (1995-2015). Carga de la enfermedad y genotipos circulantes. Universidad del País Vasco (UPV-EHU), San Sebastián, Enero de 2017.
256. Rihkanen H, Rönkkö E, Nieminen T, Komsu K-L, Rätty R, Saxen H, et al. Respiratory Viruses in Laryngeal Croup of Young Children. *J Pediatr*. 2008 May;152(5):661–5.
257. Miller EK, Gebretsadik T, Carroll KN, Dupont WD, Mohamed YA, Morin L-L, et al. Viral Etiologies of Infant Bronchiolitis, Croup and Upper Respiratory Illness During 4

- Consecutive Years. *Pediatr Infect Dis J*. 2013 Sep;32(9):950–5.
258. Sung; JY, Lee HJ, Eun BW, Kim SH, Lee SY, Lee JY, et al. Role of human coronavirus NL63 in hospitalized children with croup. *Pediatr Infect Dis J*. 2010 Sep;29(9):789–93.
259. Wang F, Zhao L-Q, Zhu R-N, Deng J, Sun Y, Ding Y-X, et al. Parainfluenza Virus Types 1, 2, and 3 in Pediatric Patients with Acute Respiratory Infections in Beijing During 2004 to 2012. *Chin Med J (Engl)*. 2015 Oct 20;128(20):2726–30.
260. Chonmaitree T, Revai K, Grady JJ, Clos A, Patel JA, Nair S, et al. Viral Upper Respiratory Tract Infection and Otitis Media Complication in Young Children. *Clin Infect Dis*. 2008 Mar 15;46(6):815–23.
261. Fabbiani M, Terrosi C, Martorelli B, Valentini M, Bernini L, Cellesi C, et al. Epidemiological and clinical study of viral respiratory tract infections in children from Italy. *J Med Virol*. 2009 Apr;81(4):750–6.
262. Nenna R, Evangelisti M, Frassanito A, Scagnolari C, Pierangeli A, Antonelli G, et al. Respiratory syncytial virus bronchiolitis, weather conditions and air pollution in an Italian urban area: An observational study. *Environ Res*. 2017 Oct;158:188–93.
263. Duarte De Souza AP, Alves De Azeredo Leitão L, Luisi F, Souza RG, Coutinho SE, Ramos Da Silva J, et al. Lack of association between viral load and severity of acute bronchiolitis in infants.
264. Gökçe Ş, Kurugöl Z, Koturoğlu G, Çiçek C, Aslan A. Etiology, Seasonality, and Clinical Features of Viral Respiratory Tract Infections in Children Hospitalized With Acute Bronchiolitis: A Single-Center Study. *Glob Pediatr Heal*. 2017 Jan 22;4:2333794X1771437.
265. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA*. 1999 Oct 20;282(15):1440–6.
266. Regamey N, Kaiser L, Roiha HL, Deffernez C, Kuehni CE, Latzin P, et al. Viral Aetiology of Acute Respiratory Infections With Cough in Infancy. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Jan;PAP(2):100–5.
267. Feng L, Lai S, Li F, Ye X, Li S, Ren X, et al. [Viral etiologies of hospitalized pneumonia patients aged less than five years in six provinces, 2009-2012]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2014 Jun;35(6):646–9. 4

268. Nasreen S, Luby SP, Brooks WA, Homaira N, Mamun A AI, Bhuiyan MU, et al. Population-Based Incidence of Severe Acute Respiratory Virus Infections among Children Aged <math>\leq 5</math> Years in Rural Bangladesh, June–October 2010. Schulz TF, editor. *PLoS One*. 2014 Feb 25;9(2):e89978.
269. Kusel MMH, de Klerk NH, Holt PG, Keadze T, Johnston SL, Sly PD. Role of Respiratory Viruses in Acute Upper and Lower Respiratory Tract Illness in the First Year of Life. *Pediatr Infect Dis J*. 2006 Aug;25(8):680–6.
270. Souza LS de F, Ramos EAG, Carvalho FM, Guedes VMCR, Souza LS, Rocha CM, et al. Viral respiratory infections in young children attending day care in urban Northeast Brazil. *Pediatr Pulmonol*. 2003 Mar 1;35(3):184–91.
271. Schroeder AR, Mansbach JM, Stevenson M, Macias CG, Fisher ES, Barcega B, et al. Apnea in children hospitalized with bronchiolitis. *Pediatrics* . 2013 Nov;132(5):e1194-201.
272. Staat MA, Henrickson K, Elhefni H, Groothuis J, Makari D. Prevalence of RSV-Associated Lower Respiratory Infection and Apnea in Infants Presenting to the Emergency Department. *Pediatr Infect Dis J*. 2013 Feb];1.
273. Chung B, Wong V. Relationship between five common viruses and febrile seizure in children. *Arch Dis Child*. 2007 Jul;92(7):589–93.
274. Belshe RB, Van Voris LP, Mufson Belshe MA. Impact of viral respiratory diseases on infants and young children in a rural and urban area of southern west virginia. *Am Jounhal or Epidbmiology*;117(4).
275. Lee M-S, Walker RE, Mendelman PM. Medical burden of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3 infection among US children. Implications for design of vaccine trials. *Hum Vaccin*;1(1):6–11.
276. Cilla G, Oñate E, Perez-yarza EG, Montes M, Vicente D, Perez-trallero E. Hospitalization rates for human metapneumovirus infection among 0- to 3-year-olds in Gipuzkoa (Basque Country), Spain. *Epidemiol Infect*. 2009 Jan 18;137(1):66.
277. Oñate Vergara E. Características clínicas y epidemiológicas de los niños hospitalizados por infección por virus influenza durante la pandemia del año 2009 en Gipuzkoa. Comparación con la época prepandémica y postpandémica (2004-2012) en Gipuzkoa. Universidad del País Vasco (UPV-EHU), San Sebastián, Julio de 2013.
278. Torres JP, De la Maza V, Kors L, Villarroel M, Piemonte P, Izquierdo G, et al. Respiratory

- Viral Infections and Coinfections in Children With Cancer, Fever and Neutropenia. *Pediatr Infect Dis J.* 2016 Sep;35(9):949–54.
279. Benites ECA, Cabrini DP, Silva ACB, Silva JC, Catalan DT, Berezin EN, et al. Acute respiratory viral infections in pediatric cancer patients undergoing chemotherapy. *J Pediatr (Rio J).* 2014 Jul;90(4):370–6.
280. Branche A, Falsey A. Parainfluenza Virus Infection. *Semin Respir Crit Care Med.* 2016 Aug 3;37(4):538–54.
281. Tang JW, Lam TT, Zaraket H, Lipkin WI, Drews SJ, Hatchette TF, et al. Global epidemiology of non-influenza RNA respiratory viruses: data gaps and a growing need for surveillance. *Lancet Infect Dis.* 2017 Oct;17(10):e320–6.
282. Mao N, Ji Y, Xie Z, Wang H, Wang H, An J, et al. Human Parainfluenza Virus-Associated Respiratory Tract Infection among Children and Genetic Analysis of HPIV-3 Strains in Beijing, China. *China PLoS ONE.* 2012;7(8).
283. Wang JH, Kwon HJ, Jang YJ. Detection of Parainfluenza Virus 3 in Turbinate Epithelial Cells of Postviral Olfactory Dysfunction Patients. *Laryngoscope.* 2007 Aug 1;117(8):1445–9.
284. Stankova J, Carret A-S, Moore D, McCusker C, Mitchell D, Davis M, et al. Long-term therapy with aerosolized ribavirin for parainfluenza 3 virus respiratory tract infection in an infant with severe combined immunodeficiency. *Pediatr Transplant.* 2007 Mar 1;11(2):209–13.
285. Drews AL, Atmar RL, Glezen WP, Baxter BD, Piedra PA, Greenberg SB. Dual respiratory virus infections. *Clin Infect Dis.* 1997 Dec;25(6):1421–9.
286. Franz A, Adams O, Willems R, Bonzel L, Neuhausen N, Schweizer-Krantz S, et al. Correlation of viral load of respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. *J Clin Virol.* 2010 Aug;48(4):239–45.
287. Esposito S, Molteni CG, Daleno C, Valzano A, Tagliabue C, Galeone C, et al. Collection by trained pediatricians or parents of mid-turbinate nasal flocked swabs for the detection of influenza viruses in childhood. *Virol J.* 2010 Apr 30;7:85.
288. Wang Y, Ji W, Chen Z, Yan Y, Shao X, Xu J. Comparison of severe pneumonia caused by Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in hospitalized children.

- Indian J Pathol Microbiol. 2014;57(3):413.
289. Martínez P, Cordero J, Valverde C, Unanue N, Dalmazzo R, Piemonte P, et al. Co-infección viral respiratoria en niños hospitalizados por infección respiratoria aguda y su impacto en la gravedad clínica. *Rev Chil infectología*. 2012 Apr;29(2):169–74.
290. Brand HK, de Groot R, Galama JMD, Brouwer ML, Teuwen K, Hermans PWM, et al. Infection with multiple viruses is not associated with increased disease severity in children with bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol*. 2012 Apr;47(4):393–400.
291. Lim FJ, de Klerk N, Blyth CC, Fathima P, Moore HC. Systematic review and meta-analysis of respiratory viral coinfections in children. *Respirology*. 2016 May 1;21(4):648–55.
292. Horton KC, Dueger EL, Kandeel A, Abdallat M, El-Kholy A, Al-Awaidey S, et al. Viral etiology, seasonality and severity of hospitalized patients with severe acute respiratory infections in the Eastern Mediterranean Region, 2007–2014. Schanzer DL, editor. *PLoS One*. 2017 Jul 13;12(7):e0180954.
293. Godoy C, Peremiquel-Trillas P, Andrés C, Gimferrer L, Uriona SM, Codina MG, et al. A molecular epidemiological study of human parainfluenza virus type 3 at a tertiary university hospital during 2013–2015 in Catalonia, Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;86:153–9.
294. Cebey-López M, Herberg J, Pardo-Seco J, Gómez-Carballa A, Martínón-Torres N, Salas A, et al. Viral Co-Infections in Pediatric Patients Hospitalized with Lower Tract Acute Respiratory Infections. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136526.
295. Maria Luz García-García; Ersilia González-Carrasco; Sergio Quevedo; Cristina Muñoz; Veronica Sánchez-Escudero; Francisco Pozo; Inmaculada Casas; Cristina Calvo. Clinical and Virological Characteristics of Early and Moderate Preterm Infants Readmitted With Viral Respiratory Infections. *Pediatr Infect Dis J*. 2015 Jul 1;34(7):693–9.
296. García-García ML, Calvo C, Pozo F, Villadangos PA, Pérez-Breña P, Casas I. Spectrum of Respiratory Viruses in Children With Community-acquired Pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*. 2012 Aug;31(8):808–13.
297. Artiles-Campelo F, Pérez-González M del C, Caballero-Hidalgo A, Pena-López MJ. [Etiology of acute viral respiratory tract infections in children from Gran Canaria, the Canary Islands (Spain)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006 Nov;24(9):556–61.



298. Mendoza Sánchez MC, Ruiz-Contreras J, Vivanco JL, Fernández-Carrión F, Baro Fernández M, Ramos JT, et al. Respiratory virus infections in children with cancer or HIV infection. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006 Mar;28(3):154–9.
299. Aguilar JC, Mar \*, Pé Rez-Bre AP, Mar AL, Garc A, Cruz N, et al. 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;38(3):1191–5.



## **10. ANEXOS**



## ANEXO I: Informe del Comité Ético de Investigación Clínica

Donostia Ospitalea  
Hospital Donostia

## INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D. José Ignacio Emparanza Knörr, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Área Sanitaria de Gipuzkoa,

## CERTIFICA:

Que este Comité, de acuerdo a la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, Principios éticos de la declaración de Helsinki y resto de principios éticos aplicables, ha evaluado el Estudio Observacional titulado: *"Análisis de la infección producida por virus para influenza en pediatría"*. Código de Protocolo: NEH-VIP--2016-01

Versión del Protocolo: 1 de 1 de Diciembre de 2016

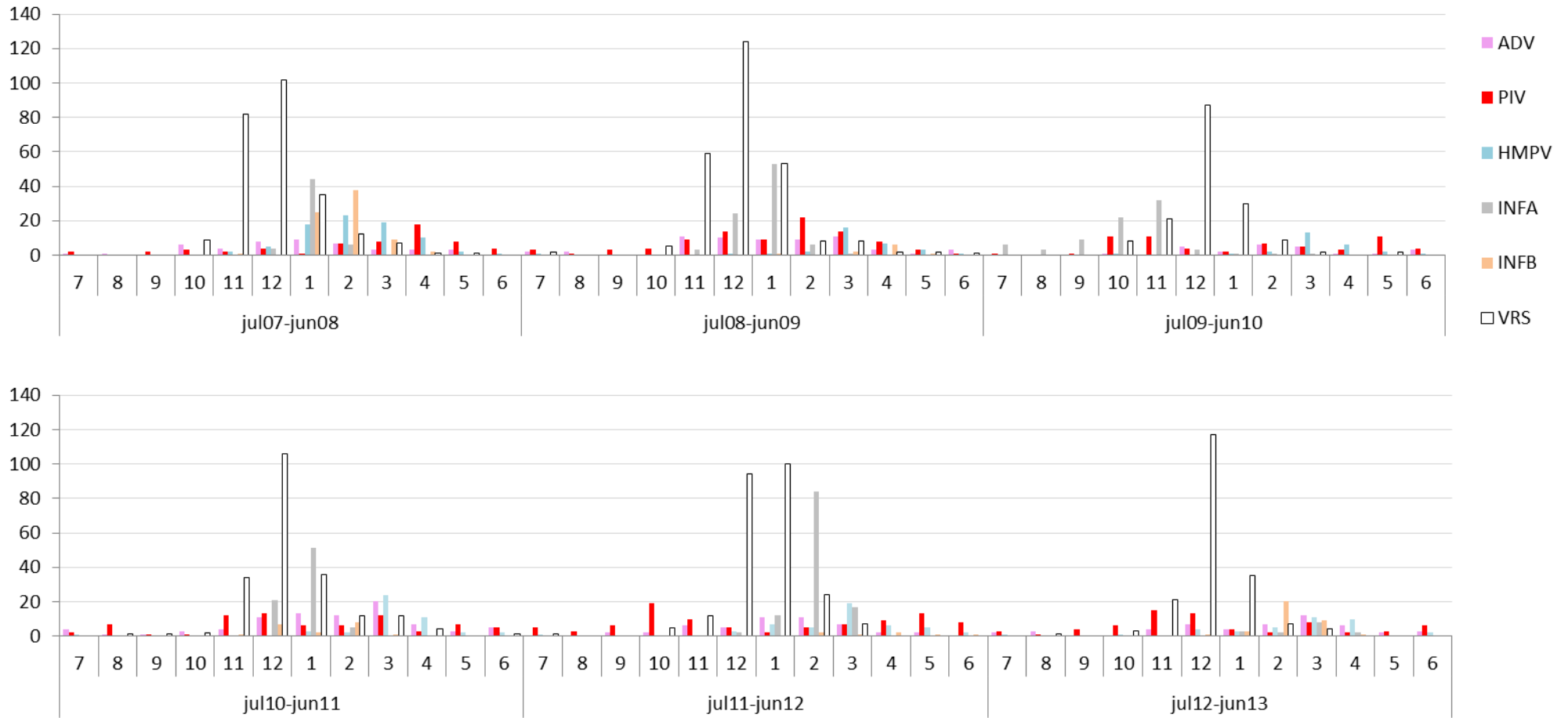
Y que este Comité reunido el día 13/12/2016 (recogido en acta 10/2016) ha decidido emitir **Informe Favorable** a que dicho estudio sea realizado por el siguiente investigador:

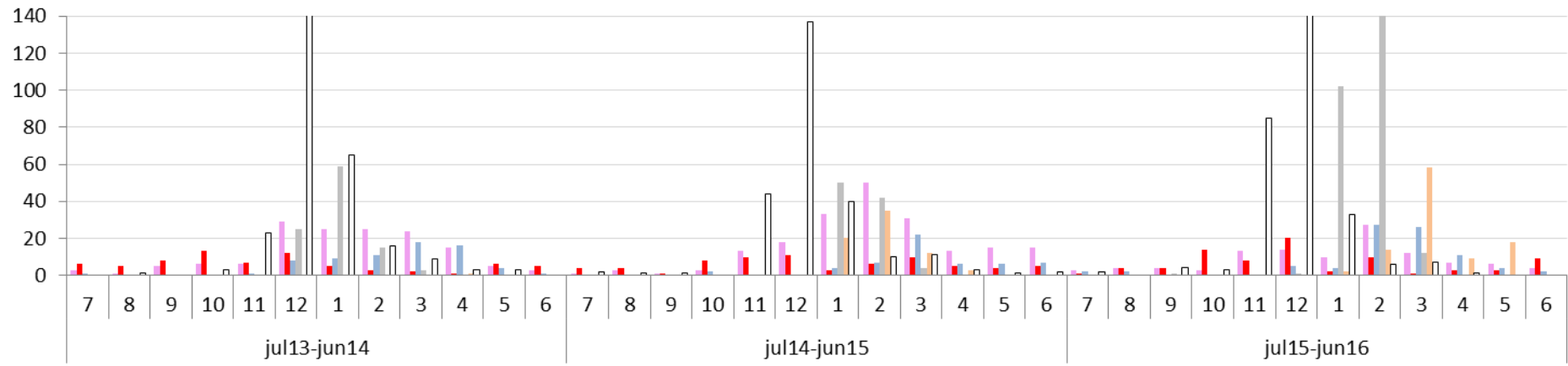
Nerea Echeverria Hernando – Pediatría - Hospital Universitario Donostia

Lo que firmo en San Sebastián, a 13 de Diciembre de 2016

Fdo.: Jose Ignacio Emparanza

**ANEXO II. Circulación de los diferentes virus respiratorios detectados durante el periodo estudiado (número de episodios).**





**ANEXO III (A). Distribución de los diferentes virus respiratorios por temporadas durante el periodo estudiado.**

	Rh o EV		VRS		INF A		ADV		BoV		VPIH		CoV		HMPV		INF B		Negativo		Nº de episodios
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
<b>Jul07-Jun08</b>	414	38,7	249	23,2	54	5	45	4,2	89	8,3	59	5,5	29	2,7	80	7,5	75	7	285	26,6	1071
<b>Jul08-Jun09</b>	480	45,9	264	25,2	87	8,3	61	5,8	56	5,4	91	8,7	51	4,9	32	3,1	10	1	206	19,7	1046
<b>Jul09-Jun10</b>	338	38,7	159	18,2	78	8,9	24	2,7	38	4,4	60	6,9	26	3	26	3	0	0	272	31,2	873
<b>Jul10-Jun11</b>	607	47,3	209	16,3	77	6	86	6,7	75	5,8	75	5,8	63	4,9	45	3,5	19	1,5	330	25,7	1283
<b>Jul11-Jun12</b>	530	43,2	243	19,8	115	9,4	48	3,9	81	6,6	92	7,5	76	6,2	48	3,9	7	0,6	309	25,2	1228
<b>Jul12-Jun13</b>	371	38,5	188	19,3	15	1,5	50	5,1	38	3,9	67	6,9	47	4,8	37	3,8	34	3,5	318	32,6	975
<b>Jun13-Jul14</b>	436	39	278	24,9	102	9,1	147	13,2	90	8	73	6,5	68	6,1	69	6,2	1	0,1	275	24,7	1115
<b>Jul14-Jun15</b>	423	31,8	252	18,9	96	7,2	196	14,7	109	8,2	71	5,3	84	6,3	54	4,1	70	5,3	365	24,4	1332
<b>Jul15-Jun16</b>	466	28,6	322	19,7	284	17,4	107	6,6	101	6,2	79	4,8	96	5,9	83	5,1	101	6,2	342	21	1631
<b>Total</b>	4065	38,5	2164	20,5	908	8,6	764	7,2	677	6,4	667	6,3	540	5,1	474	4,5	317	3	2702	25,6	10554



**ANEXO III (B). Distribución de los diferentes virus respiratorios excluyendo las detecciones múltiples por temporadas durante el periodo estudiado.**

	Rh o EV		VRS		INF A		ADV		BoV		VPIH		CoV		HMPV		INF B		Negativo		Nº de episodios
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
<b>Jul07-Jun08</b>	193	18	124	11,6	34	3,2	16	1,5	20	1,9	29	2,7	13	1,2	41	3,8	48	4,5	285	26,6	1071
<b>Jul08-Jun09</b>	280	26,8	153	14,6	51	4,9	20	1,9	11	1,1	36	3,4	15	1,4	20	1,9	4	0,4	206	19,7	1046
<b>Jul09-Jun10</b>	228	26,1	98	11,2	70	8	8	0,9	6	0,7	30	3,4	13	1,5	17	1,9	0	0	272	31,2	873
<b>Jul10-Jun11</b>	413	32,2	108	8,4	53	4,1	31	2,4	13	1	31	2,4	18	1,4	25	1,9	13	1	330	25,7	1283
<b>Jul11-Jun12</b>	318	25,9	130	10,6	78	6,3	8	0,7	10	0,8	54	4,4	23	1,9	23	1,9	5	0,4	309	25,2	1228
<b>Jul12-Jun13</b>	241	24,8	128	13,1	12	1,2	12	1,2	6	0,6	33	3,4	10	1	23	2,4	30	3,1	318	32,6	975
<b>Jun13-Jul14</b>	223	20	131	11,7	61	5,5	23	2	8	0,7	30	2,7	14	1,3	35	3,1	0	0	275	24,7	1115
<b>Jul14-Jun15</b>	228	17,1	157	11,8	63	4,7	48	3,6	13	1	39	2,9	28	2	28	2	56	4,2	365	24,4	1332
<b>Jul15-Jun16</b>	297	18,2	182	11,2	230	14,1	32	2	20	1,2	30	1,8	43	2,6	55	3,4	96	5,9	342	21	1631
<b>Total</b>	2421	23	1211	11,5	652	6,2	198	1,9	107	1	312	3	177	1,7	267	2,5	252	2,4	2702	25,6	10554

## ANEXO IV. Distribución mensual de los virus respiratorios detectados durante el periodo estudiado.

	Rh o EV		VRS		INF A		ADV		BoV		VPIH		CoV		HMPV		INF B		Negativo		Nº de episodios
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
<b>Enero</b>	490	29,4	427	25,6	375	22,5	116	7	142	8,5	34	2	138	8,3	50	3	53	3,2	329	19,7	1667
<b>Febrero</b>	442	29,1	104	6,9	329	21,7	154	10,2	161	10,6	68	4,5	138	9,1	84	5,5	117	7,7	368	24,3	1517
<b>Marzo</b>	448	37,7	67	5,6	46	3,9	125	10,5	93	7,8	67	5,6	70	5,9	168	14,1	92	7,7	315	26,5	1189
<b>Abril</b>	274	44,2	14	2,3	2	0,3	57	9,2	36	5,8	52	8,4	24	3,9	83	13,4	24	3,9	194	31,3	620
<b>Mayo</b>	300	50,2	9	1,5	0	0	38	6,4	28	4,7	58	9,7	17	2,8	28	4,7	20	3,3	197	32,9	598
<b>Junio</b>	219	46,5	4	0,9	0	0	36	7,6	15	3,2	47	10	1	0,2	19	4	1	0,2	186	0,6	471
<b>Julio</b>	130	39,9	7	2,2	6	1,8	16	4,9	8	2,5	27	8,3	3	0,9	7	2,2	0	0	147	45,1	326
<b>Agosto</b>	67	32,1	4	1,9	3	1,4	15	7,2	7	3,4	25	12	2	1	2	1	0	0	107	51,2	209
<b>Septiembre</b>	283	62,2	6	1,3	10	2,2	13	2,9	10	2,2	30	6,6	0	0	0	0	0	0	142	31,2	455
<b>Octubre</b>	322	51,8	38	6,1	22	3,5	24	3,9	13	2,1	79	12,7	7	1,1	4	0,6	0	0	196	31,6	621
<b>Noviembre</b>	486	46	381	36,1	35	3,3	61	5,8	43	4,1	84	7,9	33	3,1	3	0,3	2	0,2	250	23,6	1057
<b>Diciembre</b>	605	33,2	1103	60,5	80	4,4	107	5,9	121	6,6	96	5,3	107	5,9	26	1,4	8	0,4	271	14,6	1824
<b>Total</b>	4066	38,5	2164	20,5	908	8,6	762	7,2	677	6,4	667	6,3	540	5,1	474	4,5	317	3	2702	25,6	10554

**ANEXO V. Distribución de los virus respiratorios detectados por trimestres durante el periodo de estudio.**

	ADV		VPIH		HMPV		INFA		INF B		VRS		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Jul-Sept07</b>	2	33,3	4	66,7	0	0	0	0	0	0	0	0	6	100
<b>Oct-Dic07</b>	18	7,8	9	3,9	7	3	4	1,7	1	0,4	193	83,2	232	100
<b>Ene-Mar08</b>	19	7	16	5,9	60	22,1	50	18,5	72	26,6	54	19,9	271	100
<b>Abril-Jun08</b>	6	11,3	30	56,6	13	24,5	0	0	2	3,8	2	3,8	53	100
<b>Jul-Sept08</b>	4	28,6	7	50	1	7,1	0	0	0	0	2	14,3	14	100
<b>Oct-Dic08</b>	21	8	27	10,2	1	0,4	27	10,2	0	0	188	71,2	264	100
<b>Ene-Mar09</b>	29	12,9	45	20	19	8,4	60	26,7	3	1,3	69	30,7	225	100
<b>Abril-Jun09</b>	7	16,6	12	28,6	11	26,2	0	0	7	16,7	5	11,9	42	100
<b>Jul-Sept09</b>	0	0	2	10	0	0	18	90	0	0	0	0	20	100
<b>Oct-Dic09</b>	6	2,9	26	12,6	1	0,5	57	27,7	0	0	116	56,3	206	100
<b>Ene-Mar10</b>	13	14,9	14	16,1	16	18,4	3	3,5	0	0	41	47,1	87	100
<b>Abril-Jun10</b>	5	14,7	18	52,9	9	26,5	0	0	0	0	2	5,9	34	100
<b>Jul-Sept10</b>	6	31,6	10	52,6	1	5,3	0	0	0	0	2	10,5	19	100
<b>Oct-Dic10</b>	18	8,4	26	12,1	0	0	21	9,8	8	3,7	142	66	215	100
<b>Ene-Mar11</b>	45	20	24	10,6	29	12,9	56	24,9	11	4,9	60	26,7	225	100
<b>Abril-Jun11</b>	15	30	15	30	15	30	0	0	0	0	5	10	50	100
<b>Jul-Sept11</b>	2	11,1	14	77,7	1	5,6	0	0	0	0	1	5,6	18	100

<b>Oct-Dic11</b>	13	8	34	20,9	3	1,8	2	1,2	0	0	111	68,1	163	100
<b>Ene-Mar12</b>	29	9	14	4,4	31	9,7	113	35,2	3	0,9	131	40,8	321	100
<b>Abril-Jun12</b>	4	7,8	30	58,9	13	25,5	0	0	4	7,8	0	0	51	100
<b>Jul-Sept12</b>	5	33,3	8	53,3	1	6,7	0	0	0	0	1	6,7	15	100
<b>Oct-Dic12</b>	11	5,7	34	17,7	5	2,6	0	0	1	0,5	141	73,5	192	100
<b>Ene-Mar13</b>	23	15,7	14	9,5	19	12,9	13	8,8	32	21,8	46	31,3	147	100
<b>Abril-Jun13</b>	11	29,7	11	29,7	12	32,5	2	5,4	1	2,7	0	0	37	100
<b>Jul-Sept13</b>	9	30	19	63,4	1	3,3	0	0	0	0	1	3,3	30	100
<b>Oct-Dic13</b>	41	14,2	32	11,1	9	3,1	25	8,7	0	0	181	62,9	288	100
<b>Ene-Mar14</b>	74	25,6	10	3,5	38	13,2	77	26,6	0	0	90	31,1	289	100
<b>Abril-Jun14</b>	23	36,6	12	19	21	33,3	0	0	1	1,6	6	9,5	63	100
<b>Jul-Sept14</b>	5	27,8	9	50	0	0	0	0	0	0	4	22,2	18	100
<b>Oct-Dic14</b>	34	13,8	29	11,8	2	0,8	0	0	0	0	181	73,6	246	100
<b>Ene-Mar15</b>	114	29,2	19	4,9	33	8,5	96	24,6	67	17,2	61	15,6	390	100
<b>Abril-Jun15</b>	43	50,6	14	16,5	19	22,3	0	0	3	3,5	6	7,1	85	100
<b>Jul-Sept15</b>	11	35,5	9	29	4	12,9	1	3,2	0	0	6	19,4	31	100
<b>Oct-Dic15</b>	30	8,7	42	12,1	5	1,4	1	0,3	0	0	269	77,5	347	100
<b>Ene-Mar16</b>	49	9,4	13	2,6	57	10,9	282	54,1	74	14,2	46	8,8	521	100
<b>Abril-Jun16</b>	17	22,1	15	19,5	17	22,1	0	0	27	35	1	1,3	77	100

## ANEXO VI. Distribución de los virus respiratorios detectados por edades durante el periodo estudiado.

	Rho EV		VRS		INF A		ADV		BoV		VPIH		CoV		HMPV		INF B		Negativo		Nº de episodios
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
<b>&lt;3mes</b>	1126	35,1	787	24,5	135	4,2	23	0,7	32	1	196	6,1	145	4,5	78	2,4	18	0,6	1114	34,7	3210
<b>3-6meses</b>	444	39,4	356	31,6	69	6,1	77	6,8	46	4,1	84	7,5	73	6,5	71	6,3	19	1,7	210	18,7	1126
<b>7-12meses</b>	767	46,3	442	26,7	105	6,3	257	15,5	225	13,6	134	8,1	125	7,5	131	7,9	32	1,9	196	11,8	1656
<b>12-24meses</b>	724	44,8	324	20	173	10,7	217	13,4	259	16	132	8,2	90	5,6	86	5,3	41	2,5	264	16,3	1617
<b>24-36meses</b>	383	42,7	155	17,3	109	12,2	96	10,7	77	8,6	60	6,7	58	6,5	44	4,9	33	3,7	178	19,9	896
<b>36-48meses</b>	158	35,5	41	9,2	84	18,9	34	7,6	21	4,7	18	4	11	2,5	22	4,9	27	6,1	107	24	445
<b>48-60meses</b>	122	32	24	6,3	64	16,8	22	5,8	11	2,9	12	3,1	10	2,6	13	3,4	43	11,3	108	28,3	381
<b>5-10años</b>	259	29,9	21	2,4	106	12,3	28	3,2	6	0,7	26	3,	19	2,2	26	3	83	9,6	352	40,7	865
<b>10-14años</b>	65	21	7	2,3	61	19,7	7	2,3	0	0	4	1,3	8	2,6	3	1	20	6,5	152	49	310
<b>No se conoce</b>	18	37,5	7	14,6	2	4,2	1	2,1	0	0	1	2,1	1	2,1	0	0	1	2,1	21	43,8	48
<b>Total</b>	4066	38,5	2164	20,5	908	8,6	762	7,2	677	6,4	667	6,3	540	5,1	474	4,5	31	3	2702	25,6	10554

## ANEXO VII. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA COHORTE INFECCIÓN RESPIRATORIA POR VPIH.

**Anexo VII (A).**- Distribución de los serotipos de VPIH del grupo infección respiratoria y excluyendo las detecciones virales múltiples.

VPIH-infección respiratoria	Casos (%)	Excluyendo detecciones múltiples. Casos (%)
Serotipo 1	76 (13,8)	36 (13,8)
Serotipo 2	52 (9,4)	28 (10,7)
Serotipo 3	303 (55)	153 (58,6)
Serotipo 4	114 (20,7)	43 (16,5)
Múltiples serotipos VPIH	6 (1,1)	1 (0,4)
Total	551 (100)	261 (100)

**Anexo VII (B).**- Distribución anual de VPIH del grupo infección respiratoria.

Temporadas	Casos	Porcentaje
2007-2008	50	9,1
2008-2009	76	13,8
2009-2010	49	8,9
2010-2011	55	10,0
2011-2012	72	13,1
2012-2013	61	11,1
2013-2014	62	11,2
2014-2015	56	10,1
2015-2016	70	12,7
Total	551	100

**Anexo VII (C).**- Distribución estacional de VPIH del grupo infección respiratoria.

<b>Estacionalidad</b>	<b>Casos</b>	<b>Porcentaje</b>
Primavera	129	23,4
Verano	69	12,5
Otoño	203	36,9
Inviernos	150	27,2
Total	551	100

**Anexo VII (D).**- Distribución mensual de VPIH en el grupo de infección respiratoria.

<b>Mes</b>	<b>Casos</b>	<b>Porcentaje</b>
Enero	30	5,4
Febrero	62	11,3
Marzo	54	9,8
Abril	44	8
Mayo	43	7,8
Junio	38	6,9
Julio	21	3,8
Agosto	18	3,3
Septiembre	26	4,7
Octubre	64	11,6
Noviembre	74	13,4
Diciembre	77	14





