

# Infecciones respiratorias agudas en niños menores de 5 años hospitalizados

## Estudio etiológico prospectivo

Dra. María Hortal de Peluffo <sup>(1)</sup> y col.

### RESUMEN

Como parte de un programa prospectivo de estudio de Infecciones Respiratorias Agudas en niños hospitalizados, se estudió a 449 enfermos mayores de un mes y menores de 5 años, internados en servicios pediátricos de Montevideo entre mayo de 1983 y agosto de 1985.

Se investigó la etiología viral en aspirados nasofaríngeos por inmunofluorescencia y por aislamiento en cultivos celulares. También se determinó la frecuencia de colonización por bacterias potencialmente patógenas de las vías respiratorias altas de los niños, tratándose de emplear técnicas que permitan distinguir los agentes etiológicos aislados de los integrantes de la flora.

El diagnóstico de infecciones virales alcanzó 41,4% (67 neumopatías agudas y 119 bronquiolitis). La información se analizó según sexo y edad de los pacientes y se reconocieron diferentes patrones epidemiológicos para los virus RS, adenovirus, influenza A y B, parainfluenza 1, 2 y 3.

De 69 de los pacientes de los que se aislaron bacterias (sobre todo *S. pneumoniae*, *Hemophilus*, o ambos) un 28,5% correspondió a casos de bronquiolitis y 26,5% a neumopatías agudas.

### PALABRAS CLAVE:

Infecciones del tracto respiratorio  
Virus Respiratorio Sincicial  
Bronquiolitis viral  
Pneumonías  
Infección pneumococcica  
Infección a hemophilus

Dr. José C. Russi<sup>2</sup>, Lic. Juan R. Arbiza<sup>3</sup>, Dra. E. Alondra Martorell<sup>3</sup>, Br. Héctor Chiparelli<sup>3</sup>, Dra. Elena Cánepa<sup>3</sup>, Dr. Alvaro Cánepa<sup>3</sup>, Dr. Alvaro Illarramendi<sup>3</sup>, Dra. Gabriela Algorta<sup>4</sup>, Br. Catalina Pirez<sup>5</sup>, Dra. Cristina Mogdasy<sup>6</sup>, Dra. Mercedes Repetto<sup>7</sup>, Dra. Araceli Rodríguez<sup>7</sup>, Dra. Neda Nuñez<sup>7</sup>, Dra. María Julia Muñoz<sup>7</sup>

### INTRODUCCION

En 1979 la OMS (1) decidió promover los estudios sobre las infecciones respiratorias agudas (IRA), porque conjuntamente con las diarreas constituyen los problemas más importantes de Salud Pública que afectan a la población infantil.

A nivel mundial la mortalidad infantil por IRA registra tasas elevadas, con marcadas diferencias entre los países desarrollados y aquellos en desarrollo (2). Así por ejemplo en algunos países latinoamericanos, el riesgo de morir por esta causa en el primer año de vida puede llegar a ser hasta 30 veces mayor que en USA (3). Se calcula que en los países desarrollados muere el 2% de los niños que padecen neumonía, en tanto que en los países con escasos recursos, la letalidad oscila entre 10 y 20%.

(\*) Trabajo realizado en el Dpto. de Laboratorios de Salud Pública, M.S.P. y en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Pediatría, Facultad de Medicina, subvencionado por la Oficina Sanitaria Panamericana desde mayo de 1984, y distinguido con el Primer Premio de la Asociación Médica del Uruguay (Premio Glaxo de Pediatría)

(1) Prof. Agd. de Bacteriología y Virología, Prof. Adj. Laboratorio de Bacteriología de la Clínica Pediátrica "A", y Jefe de la Unidad de Microbiología, Dpto. de Laboratorios de Salud Pública, M.S.P.

(2) Jefe del Laboratorio de Virología, Dpto. Laboratorios de Salud Pública.

(3) Asistentes Dpto. de Laboratorios de Salud Pública.

(4) Asistente Lab. Bacteriología Hospital Pereira Rossell y Asistente Dpto. Bacteriología y Virología.

(5) Ayudante de Clase Dpto. Bacteriología y Virología.

(6) Jefe de Microbiología Soc. Española 1a. de Socorros Mutuos.

(7) Colaboradoras del plan de investigación O.P.S.

En un estudio realizado por la OPS sobre la mortalidad infantil por influenza y neumonía en América Latina en menores de 5 años, se compara las defunciones en la década del 60 con las del 70 (4); se percibe un descenso de la mortalidad entre un decenio y otro, pero persisten en 1977 tasas de 1.419 (por 100.000) en Guatemala y de 1.718 en Perú. En el Uruguay, en la misma fecha, la tasa de mortalidad por iguales causas en menores de un año es de 241 por 100.000 nacidos vivos, y para menores de 5 años es de 67.8.

Aunque la tasa de mortalidad infantil en el país es de 37.6 para mil nacidos vivos en 1980, y que la mortalidad específica es baja, no debe olvidarse que esas cifras quedan diluidas al relacionárseles con la población general, pero que si se analiza la información, se nota que existen grupos especiales de riesgo en donde se concentran las muertes infantiles.

En un estudio realizado por la División Estadística del Ministerio de Salud Pública (MSP), se evidenció las diferencias en decesos registrados entre los niños de la población general y la de los usuarios del MSP. Algo similar ocurre con las internaciones: el número proporcional de internaciones y su severidad evaluada por el número de días de estadía en el hospital es mucho mayor en los servicios del MSP que en una mutualista, lo que indica que deben existir factores de riesgo socio-económico-culturales y ambientales que es preciso determinar y corregir.

Los datos de morbilidad en muchos países son imprecisos o inexistentes. Las fuentes de información son en general los servicios de salud; su análisis permite establecer tendencias, pero la información está desvirtuada en parte por no emplearse criterios uniformes en la designación de los cuadros clínicos.

Una de las mejores fuentes de información son los egresos hospitalarios. Así por ejemplo, los egresos por IRA durante 20 años (1960-80) en un hospital pediátrico de Montevideo, indican que tanto en el grupo de menores de un año como en el grupo de 1 a 4 años las IRA van en aumento (5).

En este último grupo, en la década del 60, las IRA superaron en frecuencia a las diarreas infecciosas. Por tratarse de población hospitalaria es posible que esta información y el ascenso consignado sufra la influencia de diferentes variables que es difícil medir.

El tema IRA integra la nómina de actividades inmediatas y prioritarias que se ha fijado el MSP para cumplir en 1985-86. Es imperioso abatir la mortalidad; para ello es menester recabar datos confiables sobre la incidencia de las IRA, sus etiologías y factores predisponentes, estableciendo las edades de mayor riesgo y los grupos de población más expuestos.

En el Uruguay se presume que la epidemiología de las infecciones respiratorias y sus etiologías, tienen

los mismos patrones y agentes que los reconocidos en otros países. La mayoría de los estudios prospectivos a nivel hospitalario y en comunidad proviene de países anglosajones, o de países extremadamente subdesarrollados; en ambos casos la situación es radicalmente diferente a la nuestra. Por lo tanto se necesita disponer de información nacional para tomar decisiones, para planificar acciones de salud tanto en los aspectos preventivos como asistenciales.

En la década del 60, algunos de los autores iniciaron el estudio etiológico de las IRA en Uruguay, sobre todo realizando encuestas o diagnósticos serológicos (6-7). Esa primera etapa quedó trunca en los años 70. Este trabajo prospectivo en niños hospitalizados viene a continuar y a ampliar los estudios iniciados entonces, atendiendo a la necesidad de lograr un conocimiento global de lo que sucede con las IRA en el país.

La información presentada debe completarse y habrá de complementarse en el futuro con estudios prospectivos a nivel comunitario.

En conocimiento del interés por el tema y de la información lograda al respecto con recursos propios en 1983 (8), la Oficina Sanitaria Panamericana ha brindado apoyo financiero a este programa a partir de mayo de 1984.

Además del objetivo de recabar información sobre la relación clínico-etiológica de las IRA en niños hospitalizados menores de 5 años, el trabajo tiene otros objetivos complementarios. Estos son de tanta importancia como el principal, ya que propenden al desarrollo de recursos materiales y humanos aptos para seguir este tipo de estudios, brindando apoyo a intervenciones futuras y a la evaluación de su eficacia (9).

## **MATERIAL Y METODO**

### **Población estudiada**

Entre mayo de 1983 y marzo de 1984 ingresaron al estudio 194 niños mayores de un mes y menores de 5 años, que fueron internados en la Clínica Pediátrica "A" del Hospital Pereira Rossell por IRA intratorácica. En todos los casos, al ingreso se registró el diagnóstico clínico y se obtuvo un aspirado nasofaríngeo para estudio virológico.

Desde el 2 de mayo de 1984 al 31 de agosto de 1985 se incorporó al estudio, esta vez subvencionado por la OPS, 255 pacientes dentro del mismo rango de edades que el grupo anterior, los que fueron internados en las Clínicas Pediátricas "A" y "C" del mismo hospital y en la Sociedad Española Primera de Socorros Mutuos. Los días previos de evolución de la enfermedad, que primeramente se habían fijado en 7

días, se extendieron a 10. De ninguno de los dos grupos se excluyó a los pacientes que hubiesen recibido antibioticoterapia previa a la internación. En el grupo captado desde mayo de 1984, se registró la historia clínica completa en una ficha especialmente diseñada, antecedentes familiares y ambientales; se procedió a tomar muestras con el fin de efectuar simultáneamente el estudio etiológico para virus y bacterias.

En el cuadro I se aprecia la distribución por edades de la población de niños estudiada y los controles sanos que fueron captados durante el mismo lapso, en el momento de su ingreso al servicio de cirugía del mismo Hospital.

Los aspirados nasofaríngeos (ANF), y los exudados faríngeos de los pacientes y de los controles sanos fueron procesados simultáneamente y con la misma metodología.

**CUADRO I**  
Población estudiada  
Distribución por edades

EDAD (meses)	TOTAL
1 - 2	59
3 - 4	77
5 - 6	71
7 - 8	54
9 - 10	40
11 - 12	32
13 - 24	65
>25	29
Total	427

#### Recolección de muestras para microbiología (10)

El ANF se obtuvo con una sonda de alimentación nasogástrica, conectada a un tubo colector al que se le aplicó succión con un aspirador. La sonda se introdujo por cada una de las narinas hasta el cavum y se aspiró unos pocos segundos. Una vez extraída la muestra, la tubuladura fue lavada con medio de transporte especial para virología (PBS con 0,5% de gelatina). Un isopo estéril fue sumergido entonces en el tubo con la muestra (Fig. 1), retirándose enseguida e insertándose en un tubo con medio de transporte para bacteriología (Stuart). La muestra destinada a virología se transportó refrigerada, en tanto que la de bacteriología se conservó a temperatura ambiente.

En un número limitado de casos se hizo además exudado faríngeo. A los niños con neumopatía aguda, además del ANF, antes de empezar la terapia anti-

biótica, se les extrajo sangre (2-5 ml) para hacer un hemocultivo (frascos pediátricos con TSB con 5% de sangre). También se recogió orina para investigación de antigenuria; esta fue centrifugada y se guardó congelada hasta el momento de su procesamiento. Se hizo lo mismo con el suero del período agudo de la enfermedad, y con el del período de convalecencia. Únicamente en 12 casos se consiguió la segunda muestra de suero, ya que los pacientes no fueron traídos para su control en policlínica, o concurrieron a otro servicio.

#### Estudios bacteriológicos (11)

A partir del tubo para virología (a), se tomó material para confeccionar un frotis con tinción de Gram, el que permite hacer un control de calidad de la muestra mediante la relación leucocitos células planas (12), y para una muy primaria orientación diagnóstica en base a las morfologías bacterianas predominantes (13).

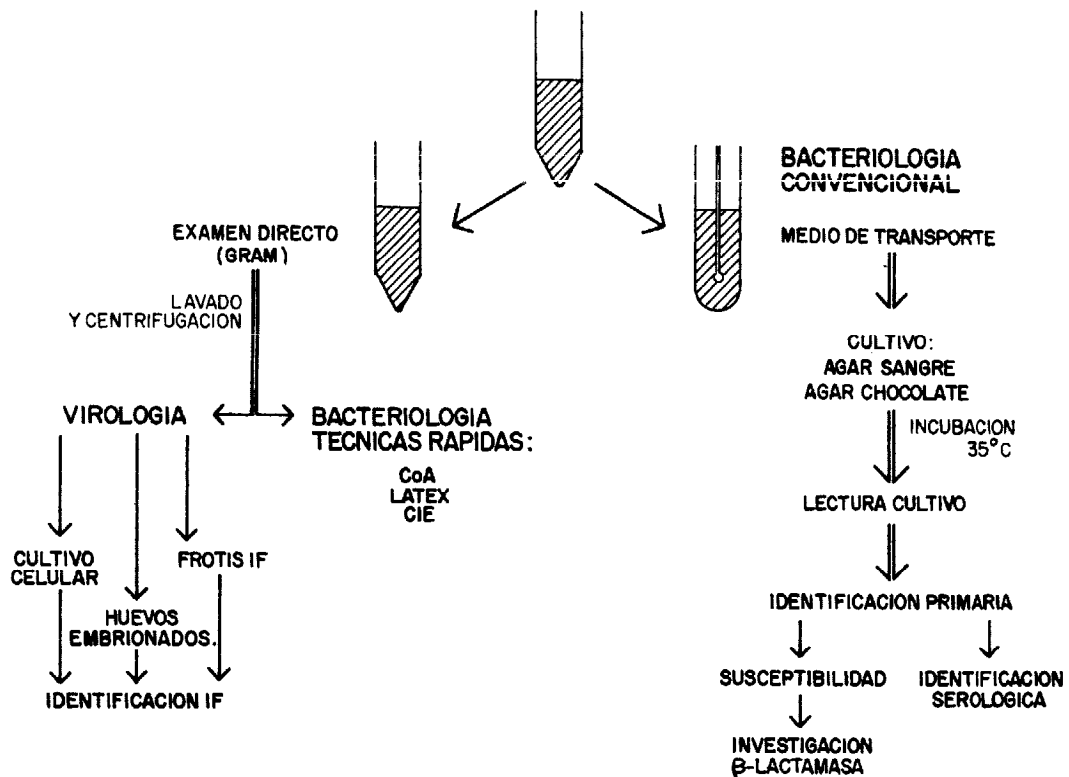
La muestra del hisopo (14) se cultivó en agar con sangre ovina y en agar chocolate enriquecido; los cultivos se incubaron 24-48 hs. a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub>. La siembra se realizó en cuadrantes (15) de manera que la lectura del crecimiento bacteriano se realizó con criterio semicuantitativo (16), según el cual solo se toman en cuenta y se identifican los potenciales patógenos que desarrollan en las áreas 3 y 4 con un número de colonias igual o mayor de 5. Los agentes tenidos primariamente en cuenta son: *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*.

La identificación de *S. pneumoniae* se hizo por inhibición del crecimiento por la optoquina (área de inhibición > de 14 mm, con discos de 6 mm e incubación a 37°C en atmósfera con CO<sub>2</sub>) y la prueba de susceptibilidad a las penicilinas se realizó con discos de 1 µg de oxacilina (halo de inhibición de 20 mm o más con discos de 16 mm).

El reconocimiento de *Hemophilus* se hizo fundamentalmente por la presencia de satelitismo en agar sangre, aspecto colonial en agar chocolate y morfología microscópica observada en frotis de las colonias, teñidos con Gram. Todos los ANF, calentados un minuto a 100°C, se probaron por coagulación para pesquisar antígeno polisacárido correspondiente a *H. influenzae* tipo b, así como las cepas aisladas de las neumopatías (17).

*S. aureus* se identificó por la morfología colonial y prueba de la coagulasa en lámina, y en casos negativos en tubo.

Se registró los potenciales patógenos aislados de las áreas 3 y 4 de los cultivos semicuantitativos de ANF; del mismo modo se anotó el resultado de los exudados faríngeos. Los resultados de los hemocultivos se consignaron negativos aquellos sin desarrollo a los 7



**FIGURA 1**  
Secuencia de estudios microbiológicos

días de incubación; contaminados aquellos en los que desarrolló un contaminante obvio como micrococcus, bacillus, P. Acnes; en caso de crecimiento de *S. viridans*, o *S. epidermidis*, se informó probable contaminante, resultado ininterpretable.

### Estudios virológicos (18)

Al llegar al laboratorio, el tubo (a) con el ANF en medio de transporte se centrifugó y el sobrenadante se dividió en 2 alícuotas que se trataron con antibióticos (penicilina y estreptomycin). Una de las alícuotas se guardó congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , en tanto que la otra se utilizó para inocular cultivos celulares (Hep-2, LLC-MK 2, MDCK) y huevos de gallina embrionados por vía intraamniótica. El sedimento remanente de la centrifugación inicial, rico en células del ANF, (19) se pipeteó suavemente para disgregar el mucus contenido en la muestra y se lavó con PBS, repitiéndose la centrifugación; con el sedimento resuspendido en un pequeño volumen de PBS, se confeccionó frotis (una gota de suspensión en cada uno de los seis hoyos de láminas especiales para fluorescencia, 2 frotis por material), que se secaron al aire y se fijaron con acetona en frío durante 5 minutos. Excepcionalmente se les coloreó enseguida; en general se les

guardó congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su tinción dentro del mes de preparados. Los duplicados fueron guardados hasta 18 meses.

**Investigación de antígenos virales:** En todos los casos se empleó técnica de inmunofluorescencia indirecta; con reactivos comerciales de la firma Wellcome de lotes previamente sometidos a control de calidad en un Centro de Referencia y distribuidos por la OMS (19).

Se dispuso de sueros monoespecíficos, anti-influenza A, anti-RSV\*, y anti-parainfluenza 3, preparados en bovino y el correspondiente conjugado antibovino; también se usaron inmunoglobulinas anti-influenza B, anti-parainfluenza 1 y anti-adenovirus, extraídas de yema de huevo (28), con las que se usó un conjugado anti-IgG de pollo. Para tinción de contraste se empleó azul de Evans al 0,01%.

La lectura de los preparados montados en glicerol tamponado (pH 7.6), se hizo en microscopio Will, con epiiluminación, provisto de una lámpara de vapor de mercurio (OSRAM-50), filtros que trabajan

(\*) RSV: virus respiratorio sincicial

en la banda del azul, con objetivo de 40 aumentos en seco.

Se consideraron positivas aquellas láminas en que se evidenció células con fluorescencia: que reaccionaban con uno solo de los sueros monoespecíficos; además, la distribución y características de los antígenos intracelulares eran compatibles con la modalidad de replicación del virus identificado (ej. en RSV, granulaciones intracitoplasmáticas de tamaño variable, influenza, granulaciones intracitoplasmáticas e intranucleares, etc.)(21).

Periódicamente se envió a Suecia duplicados de los frotis para corroborar los resultados.

**Aislamiento viral (22):** Se utilizaron tres líneas celulares: Hep-2, LLC-MK2 y MDCK. Se empleó para su crecimiento medio mínimo esencial de Eagle con sales de Hanks y 10% de suero fetal de bovino; para mantenimiento se usó el mismo medio con sales de Earle y con suero fetal al 2% para las Hep-2, y sin suero para las otras 2 líneas pero con un agregado de un microgramo/ml de tripsina cristalina; cada material clínico fue inoculado en 2 tubos de cada una de las líneas celulares a razón de 0,1 ml por tubo.

En las células Hep-2 los respiropatógenos de interés que se aislaron en estas células son RSV y adenovirus; ambos virus producen modificaciones en la monocapa celular (acción citopática = ACP), para cuya visualización los tubos fueron observados diariamente al microscopio. En los casos que apareció ACP en las células, se les lavó y confeccionó un frotis para proceder a la identificación de los antígenos virales por fluorescencia con los antisueros específicos.

Las células LLC-MK2 mantenidas en medio con tripsina son sensibles a los virus parainfluenza; la presencia de estos virus se puso de manifiesto por hemadsorción con glóbulos rojos de cobayo a los 3 y 7 días de inoculados los cultivos (23).

Las células MDCK son sobre todo aptas para el aislamiento de los virus gripales; la presencia viral pudo reconocerse por ACP, pero rutinariamente se empleó como indicador más fiel la hemaglutinación que revela la presencia de virus y/o sus hemaglutininas en el medio de cultivo. Frente a una hemaglutinación positiva se procedió, como en el caso anterior, a confeccionar frotis con las células y se identificó el virus por inmunofluorescencia.

También para el aislamiento del virus gripal se empleó como bioestrato los huevos embrionados de gallina, los que se inocularon por vía amniótica y se incubaron a 33°C. La presencia del virus gripal se investigó por hemaglutinación en el líquido amniótico o alantoideo cosechados a las 72 horas posteriores a la inoculación. La identificación de las cepas aisladas se hizo primariamente por inhibición de la hemaglutinación con antisueros de referencia o por

inmunofluorescencia sobre frotis confeccionados con las células descamadas de la membrana alantoidea.

Los tiempos de observación de los cultivos variaron entre un mínimo de 7 días y un máximo de 10. En cultivos celulares no se realizaron pasajes ciegos, de modo que al finalizar el periodo de observación, de no mediar indicios de replicación viral según uno de los indicadores antes aludidos, los cultivos fueron descartados y el material se informó **Negativo**. Únicamente en los cultivos en huevos se hizo un segundo pasaje.

## RESULTADOS

### Virología

De los pacientes captados, se estudió un total de 449 muestras de ANF; se evidenció la presencia de un agente viral en 186 casos (41.4%), los que se discriminan en 49.6% de positivos en las bronquiolitis y 32.1% de positivos en las neumopatías agudas.

En el **cuadro II** se aprecia los resultados obtenidos por inmunofluorescencia y/o por cultivos celulares a partir del ANF, para los 7 virus investigados, a la vez que se les discrimina por el cuadro clínico al que se asocian. Tanto en las neumopatías como en las bronquiolitis la máxima frecuencia correspondió al virus respiratorio sincicial (RS); adenovirus e influenza A figuran en segundo y tercer término respectivamente, y también se les encontró asociados a ambos síndromes. Influenza B y para-influenza 1 y 2 no tuvieron asociados a ningún caso de bronquiolitis.

Todos los materiales consignados fueron procesados

**CUADRO II**  
**Agentes virales asociados a neumopatías agudas y bronquiolitis**  
**1983-1985\***

	NA■	B□	Total
IA	15/ 7,2	9/ 3,8	24/ 5,3
IB	2/ 1	0	2/ 0,4
RS	28/13,4	94/39,2	122/27,2
P1	2/ 1	0	2/ 0,4
P2	1/ 0,5	0	1/ 0,2
P3	5/24	5/ 2,1	10/ 2,2
Ad	14/ 6,7	11/ 4,6	25/ 5,6
Total positivos	67/32,1	119/49,6	186/41,4
Total negativos	142/67,9	121/50,4	263/58,6

\* Diagnósticos realizados por aislamiento en cultivos celulares y huevos embrionados y/o investigación de antígenos virales por inmunofluorescencia.

por inmunofluorescencia; se anotó el resultado de los cultivos celulares únicamente cuando se completó el periodo de observación estipulado para cada línea. Existió pérdida de pasajes por contaminación accidental de los cultivos, contaminación bacteriana de la muestra no controlable por el tratamiento con antibióticos, o por deterioro precoz de las células de cultivo.

La evaluación de la inmunofluorescencia versus los cultivos celulares para el diagnóstico del virus RS se aprecia en el cuadro III. De acuerdo con este cuadro el rendimiento de la fluorescencia es ostensiblemente mayor que el de los cultivos celulares. Una comparación similar entre la inmunofluorescencia para diagnosticar el virus de influenza A, versus el cultivo en células y en huevos (cuadro IV), muestra la superioridad de la suma de los dos sistemas biológicos (huevos y cultivos celulares) en cuanto a sensibilidad y la elevada especificidad de la inmunofluorescencia.

En el cuadro V se presentan los resultados distribuidos por la edad de los pacientes e identificación viral. El virus RS predominó francamente en los primeros meses de la vida, siendo la media para las bronquiolitis en el primer año de 5.6, y para las neumopatías agudas 5.1; pero también se registró casos en mayores de un año. La infección por adenovirus predominó igualmente en los primeros meses de la vida tanto en bronquiolitis como en neumopatías agudas. Las bronquiolitis en las que se diagnosticó influenza A se distribuyeron indistintamente en los menores de un año, pero las neumopatías agudas predominaron en los niños de un año y más, aunque

también se les encontró desde la edad de 3 meses.

Si se considera una submuestra de los pacientes estudiados, extraída de un periodo de tiempo determinado, y se analizan aquellos en que se identificó al virus RS, relacionando proceso, edad y sexo (cuadro VI) se ve que hubo el doble de bronquiolitis en los varones; esa diferencia fue más acentuada en los menores de 6 meses con bronquiolitis por virus RS. Las neumopatías se distribuyeron homogéneamente en ambos sexos en los menores de un año.

La distribución mensual de los casos estudiados se consigna en el gráfico 1; se observa además la distribución mensual de cada uno de los agentes y sus perfiles epidemiológicos.

El virus RS dio picos epidémicos de hasta 5 meses de duración en los inviernos. El virus de la influenza A en 1983 precedió y acompañó a la actividad del virus RS, en tanto que en 1984 y 1985 actuaron simultáneamente en el otoño, desapareciendo luego el virus gripal para reaparecer a fin del invierno. En 1985 se demostró que la circulación de virus gripales: a una cepa H3 N2 similar a A/Philippines/2/82 y otra cepa distinta de virus gripal, H1 N1, análoga a A/Chile/1/83.

Los adenovirus en 1983 y 1984 tuvieron mayor actividad a fines del invierno y primavera; en lo que va de 1985 aún no se manifestó la circulación de este virus.

**CUADRO III**  
Inmunofluorescencia en células de aspirado nasofaríngeo y aislamiento en cultivos celulares

		AISLAMIENTO CULTIVOS CELULARES		
ANF		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
INMUNOFLUORESCENCIA	P O S I T I V O	13	23	36
	N E G A T I V O	2	65	67
	TOTAL	15	88	103

**CUADRO IV**  
Inmunofluorescencia en células de aspirado nasofaríngeo y aislamiento en cultivos celulares

		AISLAMIENTO VIRAL *			
		ANF	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
INMUNOFLUORESCENCIA	POSITIVO		2	3	5
	NEGATIVO		2	34	36
	TOTAL		4	37	41

\* Realizado en células MDCK y en huevos embrionados

**CUADRO V**  
Distribución por edad de los pacientes, cuadro clínico e identificación de virus

MESES		1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	13-24	≥25	TOTAL
B	RS	17	19	14	13	9	3	3	—	78
	IA	1	1	1	1	1	—	1	—	6
	Adeno	3	1	3	—	1	—	1	—	10
	Para 1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Para 3	1	2	—	—	—	1	—	—	4
	Total Positivo	22	23	18	14	11	5	5	—	98
Total Negativo		17	33	28	15	14	7	11	—	125
N.A.	RS	6	2	8	1	1	2	4	2	26
	IA	—	2	—	3	—	2	5	2	14
	IB	—	—	—	—	1	—	1	—	2
	Adeno	1	3	3	1	1	1	1	1	12
	Para 1	—	—	—	1	—	—	—	—	1
	Para 2	—	—	—	—	—	—	1	—	1
Total Positivo		7	7	11	6	4	5	15	5	60
Total Negativo		13	14	14	19	11	15	34	24	144

En el gráfico 2 se aprecia la distribución de los casos de IRA captados durante todo el periodo que abarcó el estudio (3 inviernos) y también la variación estacional de las bronquiolitis y de las neumopatías agudas. Al pie del mismo gráfico se registra el porcentaje de casos positivos para el virus RS (bronquiolitis y neumopatías) también distribuidos por mes, lo que permite establecer la correlación existente entre esta etiología y la variación estacional de la totalidad de

los casos de IRA. Se nota correspondencia en los periodos de máxima actividad de RS, pero hay periodos, sobre todo en verano, en que aumentan las neumopatías sin que exista una etiología viral reconocida. Los picos epidémicos del virus RS alcanzaron niveles máximos en junio de 1985; en 1983 la actividad epidémica fue también considerable, llegando al máximo porcentaje recién en agosto; en 1984 la actividad fue de menor intensidad.

**CUADRO VI**  
RSV: Neumopatías Agudas y Bronquiolitis  
Relación Edad/Sexo/Etiología

		BRONQ.			NA		
Edad (meses)		RSV			RSV		
		—	+	%	—	+	%
M	< 6	27	12	44.4	19	3	15.8
	≥ 6	27	11	40.7	35	4	11.4
Total		54	23	42.6	54	7	12.9
F	< 6	10	0	0	12	2	16.6
	≥ 6	15	5	33.3	29	3	10.3
Total		25	5	20.0	41	5	12.2

Doce sueros pareados procesados por fijación de complemento y por inhibición de la hemaglutinación no arrojaron ningún resultado positivo.

En tres ocasiones se enviaron duplicados de frotis de inmunofluorescencia a un centro de referencia (Bacterioliska Institut, Estocolmo, Suecia) para control de calidad. Hubo un 90% de concordancia en los 20 preparados remitidos, atribuyéndose las diferencias a falsos negativos por deterioro de los antígenos víricos durante el transporte.

#### Bacteriología

Los resultados de los cultivos semicuantitativos permitieron establecer que un 55% de los pacientes tenían en su nasofaringe un potencial patógeno bacteriano. En el cuadro VII se muestra la frecuencia de los diferentes agentes, su relación con el cuadro clínico y la presencia concomitante del virus. En el 36% de los casos se estableció una buena correspon-

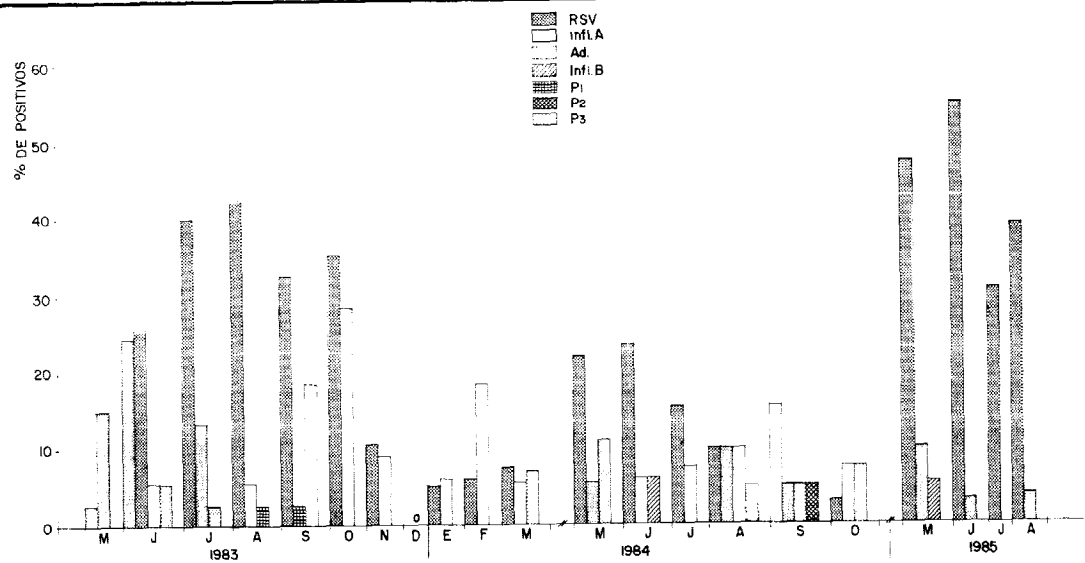


GRAFICO 1  
Distribución mensual de Respivirus asociados a  
neumopatías agudas y bronquiolitis.

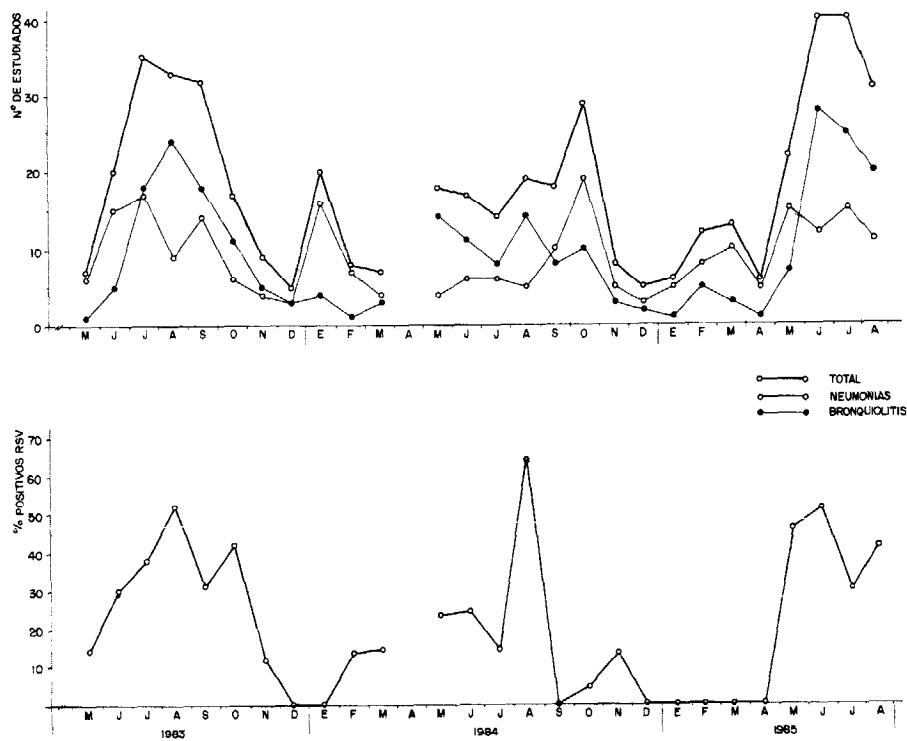


GRAFICO 2  
Virus RS. Neumopatías y bronquiolitis.  
Variación estacional.



**CUADRO VII**  
Presencia de Bacterias\* y virus en ANF

	Bronquiolitis	Neumonías
RSV + Bacterias	51,2%	21,4%
Otros V. + Bacterias	20%	22%
Solo Bacterias	24,3%	41,6%

\* *S. pneumoniae*, *Hemophilus*, o ambos.

**CUADRO VIII**  
Resultados de cultivos semi-cuantitativos en pacientes y controles

1984	Pacientes		Controles	
	T/+	%	T/+	%
Mayo	20/5	25	5/0	—
Junio	17/5	29/4	5/2	40
Julio	14/6	42/8	9/4	44,4
Agosto	20/2	10	4/1	25
Setiembre	19/4	21	5/2	40
Octubre	20/4	20	8/4	50
Noviembre	8/3	37,5	5/1	20

**CUADRO IX**  
Cultivos semicuantitativos de ANF  
Potenciales patógenos bacterianos en áreas 3 y 4

	<i>S. pneum.</i>	<i>Hemoph.</i>
Pacientes * n = 66	4 (61%)	7 (10.6%)
Controles n = 32	4 (12.5%)	4 (12.5%)

\* 1/3 tratado con ATB?

dencia entre la morfología predominante al examen directo y el ulterior desarrollo en los cultivos semi-cuantitativos.

Durante 1984 se estudió a los pacientes versus controles sanos reclutados durante el mismo periodo (cuadro VIII); los cultivos no revelaron diferencias entre los patógenos hallados en pacientes y controles (cuadro IX). Los mismos 66 pacientes y 32 controles sirvieron para comparar los resultados del ANF y del exudado faríngeo. En el cuadro X se ve que en el exudado faríngeo la densidad de desarrollo es mucho

mayor y que existe razonable correlación solo para *Hemophilus*. A todas las cepas de *S. Pneumoniae* aisladas del ANF se les estudió la sensibilidad a la oxacilina: todas las cepas ensayadas se mostraron sensibles al antibiótico.

De los 98 hemocultivos realizados, ninguno fue positivo. Dieciseis estaban contaminados; en 7 se aisló un probable contaminante (*S. epidermidis*) y 75 fueron negativos.

De 25 orinas correspondientes a neumopatías, según un screening realizado con latex sensibilizado para *H. influenzae* tipo b, 3 muestras resultaron positivas.

## DISCUSION

Por primera vez en el Uruguay se emprendió un estudio prospectivo en niños hospitalizados, investigando la frecuencia relativa de los diferentes agentes virales, y simultáneamente reconociendo la presencia de los patógenos bacterianos potenciales en las vías respiratorias altas de los pacientes con IRA intratorácica, comparados con controles sanos.

Los trabajos realizados sobre el tema en la década del 60 (24), brindaron información respecto a la prevalencia de anticuerpos para diferentes respiropatógenos en niños, y analizaron la asociación entre diferentes virus y casos seleccionados de IRA, pero no se planificó un seguimiento que permitiese establecer patrones de comportamiento de todos los virus en el tiempo.

Como se señalara previamente, uno de los principales objetivos de los programas de estudio de las IRA, promovidos por los organismos internacionales para la salud, es la reducción de la morbilidad infantil por esas causas. Para planificar acciones tendientes al control de las IRA, es preciso conocer la frecuencia de los agentes, virales y bacterianos, y sobre todo la etiología de las neumopatías agudas. Dentro de este grupo resulta crucial aclarar la causa de las muertes: tratando de establecer si ellas son causadas por una infección bacteriana primaria o si son debidas a una complicación de la patología viral (25).

Los porcentajes de diagnósticos virológicos documentados en el presente trabajo se inscriben dentro del rango establecido en otros países (26), así como su vinculación con los diferentes síndromes.

La frecuencia del virus RS, que supera por lejos a los demás, surgió evidente en este estudio, confirmando así los resultados de estudios similares (27); también la circulación del virus RS se correlaciona con un aumento muy notorio de los casos de bronquiolitis (28).

**CUADRO X**  
**Comparación de resultados de cultivos semicuantitativos de ANF y de exudado faringeo**

Paciente n = 66	ANF					EX. F				
	Flora Total	S. pneu.	Hemoph.	Gm-b	S aur.	Flora Total	S pneu.	Hemoph.	Gm-b	S aur.
Crecimiento solo en área 1	14	3	1	—	1	6	1	—	—	—
“ “ “ “ 2	18	1	—	2	—	16	1	—	2	—
“ “ “ “ 3	3	1	1	—	—	8	—	—	1	—
“ “ “ “ 4	17	3	6	—	—	32	—	6	—	1
Sin desarrollo	14	—	—	—	—	4	—	—	—	—
Controles: n = 32										
Crecimiento solo en área 1	15	2	—	1	1	—	—	—	—	—
“ “ “ “ 2	3	—	—	—	—	2	—	—	—	—
“ “ “ “ 3	2	3	—	—	—	4	—	—	—	—
“ “ “ “ 4	7	1	4	—	—	24	—	—	2	—
Sin desarrollo	5	—	—	—	—	2	—	—	—	—

Los adenovirus siguen en frecuencia al virus RS. Es preciso profundizar más en el estudio de esta etiología: los serotipos más frecuentes, descritos por muchos autores, producen cuadros respiratorios benignos, pero otros tipos, de menor frecuencia, son responsables de secuelas y tienen considerable letalidad (29).

Se dice que los niños son una población “centinela” para los virus gripales, pues son muy receptivos, por lo que resultan apropiados para la vigilancia epidemiológica de la influenza, aunque en la mayoría de los casos estos virus producen cuadros indiferenciables de los causados por otros agentes. Algunos autores han observado un aumento del número de consultas por convulsiones febriles cuando circula el virus gripal en una comunidad (30).

Se reconoció un número de casos de parainfluenza. El hecho tiene varias explicaciones posibles, no excluyentes entre sí. Son virus de menor frecuencia, sobre todo el 1 y el 2. Para la técnica de inmunofluorescencia no se dispuso de suero anti-influenza 2, de modo que este virus se investigó solamente en cultivos celulares, aislándose una única vez durante el periodo considerado. Este virus, así como parainfluenza 1, produce sobre todo cuadros de crup, entidad clínica que cuando se interna, va a servicios de otorrinolaringología, no cubiertos por este trabajo. Parainfluenza 3 también causa crup, pero se le encuentra involucrado en bronquiolitis y neumopatías agudas mucho más frecuentemente que los otros virus del grupo (31), lo que coincide con las observa-

ciones documentadas en este trabajo.

La dificultad en lograr segundas muestras de suero limitó mucho la posibilidad de pesquisar seroconversiones, lo que podría haber incrementado el porcentaje de diagnósticos positivos. Sin embargo, tanto la fijación de complemento como la inhibición de la hemaglutinación son técnicas serológicas cuyo rendimiento es bajo cuando se les usa para estudiar la respuesta de lactantes tiernos, pues muchas veces su reactividad inmunológica es pobre por interferencia de anticuerpos maternos o por propia inmadurez inmunológica.

**La distribución por edades** de los niños en relación con los virus encontrados cae dentro de los límites esperados. El virus RS se encontró sobre todo en los lactantes; la media de edades oscila entre los 5 y 6 meses según los síndromes considerados, lo que coincide con lo observado por Kim y col. en un estudio realizado en el Hospital de Niños de Washington DC (32).

El predominio del sexo masculino en las bronquiolitis ha sido señalado, y también se ve que ocurre en los casos en que se diagnostica virus RS, de manera que no puede concluirse si se debe a una mayor reactividad de los varones en general, independiente de la infección o si se la vincula también a ella.

Reviste particular interés el análisis de los patrones epidemiológicos perfilados en los 28 meses de seguimiento realizado en este trabajo.

El patrón epidemiológico adoptado por el virus RS se asemeja al observado por Ostavik y col. en Oslo en los inviernos de 1979-81. Sin embargo, la actividad de los virus influenza de los mismos años en Noruega difiere de los documentados en 1983-85 en Uruguay. La alternancia de los brotes epidémicos del virus RS durante el trienio estudiado no debe tomarse como un antecedente, ya que la periodicidad de la actividad del virus no es previsible (33).

Resulta llamativa la ausencia de diagnósticos de adenovirus en los meses corridos de 1985. Este hecho no parece atribuible a fallas en el diagnóstico, ya que se están usando concomitantemente dos técnicas que tendrían que relevarlo (inmunofluorescencia y cultivos celulares); tampoco clínicamente se ha sospechado esta etiología.

La distribución en el tiempo de los virus parainfluenza ha caído dentro de lo esperado. Parainfluenza 3 se manifestó con una epidemia de escasa intensidad.

Es imperioso mejorar los recursos de diagnóstico bacteriológico.

De acuerdo con la información surgida de cultivos realizados en diferentes países a partir de materiales obtenidos por punciones pulmonares en casos de neumonías adquiridas en la comunidad, se sabe que los agentes más frecuentes en los grupos de edad considerados son *S. pneumoniae* y *H. influenzae* (34). A pesar de la certeza que proporcionan los resultados procurados a partir de este tipo de muestras, estas no son admisibles más que en casos muy especiales. Entonces se plantea la limitación que presentan las muestras obtenidas por métodos no invasivos, como los utilizados en este estudio, los que fatalmente deben de extraerse de áreas donde existe flora propia del árbol respiratorio superior y que está integrada, a menudo, por varios de los potenciales patógenos.

El Comité de Expertos en Enfermedades Respiratorias de la OMS, en 1981 admitió que no existe ninguna muestra ideal para el estudio etiológico de las neumopatías del niño menor de 5 años, apta para usarse en la práctica diaria, y que las más aconsejables podrían ser el isopo tosido y el ANF.

Ante estas opciones se prefirió el ANF porque es la muestra recomendada por Gardner y col. (35) para estudios virológicos. Diversas muestras son adecuadas para el aislamiento viral, pero el ANF ofrece ventajas para la inmunofluorescencia, ya que su riqueza celular posibilita la confección de los frotis necesarios para investigar antígenos de varios virus (6 en este caso). Washington II (36) en su manual de laboratorio de la Clínica Mayo indica el ANF para el estudio bacteriológico de neumonías en niños pequeños.

Kalin y col. (36) proponen cultivos semicuantitati-

vos para mejorar el diagnóstico bacteriológico de la expectoración, logrando una lectura más objetiva de la densidad del crecimiento bacteriano. La Sociedad de Microbiólogos Americanos (ASM), propone un criterio similar (37). El mismo criterio ha sido aplicado para el procesamiento de otros materiales que provienen del árbol respiratorio, el cual ha sido adoptado en este trabajo. Sin embargo, para valorar los resultados obtenidos aplicando el referido criterio, hubiese sido necesario contar con la confirmación de la etiología del proceso cotejando con el resultado del hemocultivo, lo que no fue posible por ser estos negativos. En su defecto, un riguroso análisis de la correlación entre la presencia de patógenos potenciales en cantidades significativas y del aspecto clínico-radiológico del caso podría proporcionar una razonable aproximación (38).

Otra opción es la ofrecida por la investigación de antígenos polisacáridos de *S. pneumoniae* y de *H. influenzae* tipo b, en el suero y en la orina de los pacientes con neumopatías agudas. Ambas posibilidades serán exploradas en un estudio complementario del presente que está en desarrollo.

En el cuadro IX se vio que los pacientes y los correspondientes controles sanos tenían porcentajes similares de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* o de ambos. Estos datos pueden estar desvirtuados por el hecho de que los pacientes con neumopatías agudas muy frecuentemente reciben antibióticoterapia previa a su ingreso al hospital. Este escollo no solo dificulta la comparación planteada, por resultar difícil la depuración de los datos, sino que interfiere con cualquier tipo de metodología diagnóstica, aún aquella basada en la búsqueda de antígenos bacterianos, ya que al entretenerse la multiplicación estos disminuyen en cantidad y se hacen más difícilmente detectables.

Resulta curiosa la forma de asociarse bacterias y virus en las bronquiolitis y neumopatías; también en este caso el menor número de bacterias asociadas a los virus en las neumonías podría deberse a terapias previas.

La etiología bacteriana de las IRA estudiadas sigue sin aclararse. A lo sumo se puede hablar de colonización por patógenos bacterianos potenciales, documentando los hallazgos. Por ahora ninguna de las técnicas bacteriológicas y de inmunodiagnóstico en uso corriente permiten reconocer el agente etiológico entre los componentes de la flora normal de las vías respiratorias superiores.

Será necesario determinar cuáles son los métodos no invasivos más eficaces para la obtención de materiales para exámenes bacteriológicos, así como realizar un monitoreo continuo de los agentes de IRA y de su susceptibilidad a las drogas antimicrobianas.

Para lograr los resultados objeto de esta discusión ha sido necesario incrementar los recursos materiales de

laboratorio y entrenar personal en técnicas de virología y bacteriología (39). En virología la experiencia lograda con inmunofluorescencia deja como saldo favorable para el futuro la disponibilidad de una técnica ágil y fiel, particularmente ajustada para el diagnóstico rápido de las infecciones por virus RS. Para la vigilancia de la influenza, donde es preciso recuperar las cepas y para diagnosticar otras virosis, inclusive algunas no reconocidas aún, es conveniente proseguir con las técnicas convencionales conjuntamente con las rápidas.

En el futuro el pronto reconocimiento de los respiravirus será fundamental para la utilización de drogas antivirales actualmente en desarrollo.

## CONCLUSIONES

Del estudio realizado surge claramente la importancia de la etiología viral en las infecciones respiratorias agudas intratorácicas de los niños hospitalizados. En el primer año de vida, son frecuentes las bronquiolitis y neumopatías agudas, siendo el virus RS el agente predominante en esos cuadros clínicos.

Los restantes respiravirus investigados no alcanzan, en su conjunto, a tener la jerarquía del virus RS. Las técnicas de diagnóstico de este, están perfectamente ajustadas y, según la experiencia adquirida, es posible proponer el uso de técnicas rápidas para su identificación; la inmunofluorescencia, empleada por personas adecuadamente entrenadas, usando reactivos de calidad certificada, permiten sustituir a las técnicas tradicionales que requieren el aislamiento viral. No obstante, cabe señalar la conveniencia de disponer de una segunda técnica para el diagnóstico de esta infección: técnicas inmunoenzimáticas parecen ser las más adecuadas.

Se recordará que la serología no es una técnica de primera elección para el diagnóstico de las infecciones del lactante, tanto por RS como por otros respiravirus.

Persiste como un problema no resuelto el diagnóstico de las neumonías agudas bacterianas. El empleo de métodos invasivos (punción pulmonar) solo puede plantearse muy excepcionalmente, de modo tal que es preciso interpretar los hallazgos obtenidos a

partir de muestras de vías respiratorias altas, apoyados en la recuperación del agente por hemocultivo o por cultivo de exudado pleural. Lamentablemente, los porcentajes de resultados positivos de estos cultivos son sumamente bajos, y en nuestro caso inexistentes, ya que la antibióterapia previa a la internación reduce más aún las posibilidades.

Como posible solución de este problema crucial se plantea la investigación de antígenos específicos correspondientes a los agentes más frecuentemente involucrados en las neumopatías agudas: *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. Sus polisacáridos se encuentran en diferentes fluidos orgánicos (orina, suero, exudado pleural) y pueden ser investigados por diferentes técnicas que se hallan aún en evaluación.

Es preciso continuar y ampliar los estudios etiológicos, en general, y en particular los de las neumopatías agudas de verano.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Margaret Pereira del Laboratorio Central de Salud Pública de Londres, por facilitarnos los reactivos con que iniciamos el trabajo.

A la Dra. Mónica Grandien del Laboratorio Nacional de Bacteriología de Estocolmo, también por contribuir con reactivos y realizar controles de calidad de nuestros preparados.

Al Dr. Julio César Malosetti, por su generosa colaboración en cultivos celulares.

Al Q.F. Pallas del Laboratorio Galien, por sus aportes en materiales para la preparación de los medios para los cultivos celulares.

Al Sr. Roque Cámara, por su eficiente colaboración técnica.

---

### Correspondencia:

Dra. Hortal  
8 de Octubre 2720  
Montevideo - Uruguay

---

## Résumé

*Pour un programme prospectif d'étude des Infections Respiratoires Aigues chez des enfants hospitalisés, on a étudié 449 malades âgés de plus d'un mois et de moins de 5 ans, installés aux services pédiatriques de Montevideo entre mai 1983 et août 1985.*

*On a analysé l'étiologie virale des aspirés nasopharyngiens par immunofluorescence et par isolement dans des cultures cellulaires. On a tout de même déterminé la fréquence de colonisation par des bactéries pathogènes des voies respiratoires hautes des enfants, tout en essayant d'employer des techniques qui permettent de distinguer les agents étiologiques, isolés des intégrants de la flore.*

*Le diagnostic des infections virales a atteint 41,4% (67 pneumopathies aigues et 119 bronchiolites). L'analyse a tenu compte du sexe et de l'âge des patients et on y a reconnu de différents modèles épidémiologiques par les virus RS, adénovirus, influenza A et B, parainfluenza 1, 2 et 3.*

*De 69 patients, dont on a isolé des bactéries (surtout *S. pneumoniae*, *Hemophilus*, ou toutes les deux), 28,5% correspondait à des bronchiolites et 26,5% à des pneumopathies aigues.*

## Summary

*As part of a prospective program involving the study of acute respiratory infections in hospitalized children, a survey was carried out of 449 patients older than one month and younger than 5 year, hospitalized at pediatric departments of Montevideo, between May 1983 and August 1985.*

*An investigation was performed of the viral etiology of aspirates by immunofluorescence and by isolation of cell cultures. Also determined was the rate of colonization by bacteria potentially pathogenic of the upper respiratory passages of children, an attempt being made at using techniques enabling the distinction of isolated etiologic agents from flora components.*

*The diagnosis of viral infections involved a 41.4% rate (67 pneumopathies and 119 bronchiolitis). This information was analyzed according to the patients' sex and age, there being established different epidemiologic patterns for viruses RS, adenovirus, influenza A and B, and para influenza 1, 2 and 3.*

*Of the 69 patients from whom bacteria were recovered (particularly *S. pneumoniae*, *Hemophilus*, or both), 28,5% corresponded to cases of bronchiolitis and 26,5% to acute pneumopathies.*

## Bibliografía

- HITZE, KL: Who's global programme on acute respiratory infections. WHO/TB/79.108.
- Organización Panamericana de la Salud: Infecciones Respiratorias en las Américas. Bol. Epidemiol., 1980; 1: 1.
- PIO, A; LEOWAKI, J; LUELMO, F: Importancia epidemiológica del problema de las infecciones respiratorias agudas de la infancia en países en desarrollo en Bases para el Control de las Infecciones Respiratorias Agudas en Niños. Guatemala: OPS/OMS, 1984; 1-21.
- PIO, A; LEOWAKI, J; LUELMO, F: Programa de la Organización Mundial de la Salud de infecciones respiratorias en la infancia. Bol. Of. Sanit. Panam., 1984; 96: 283.
- HORTAL, M; RUOCCO, G; RUSSI, VC: Studies of children's respiratory infections in Uruguay. Pediatr. Res., 1983; 17: 1043.
- BAUZA, CA et al: Patrones de penetración de virus respiratorios y otros agentes infecciosos no bacterianos en niños de Montevideo, datos acumulativos, trienio 1964-66. Arch. Pediatr. Uruguay, 1969; 40: 282.
- HORTAL, M; RUSSI, J; CAMPIONE, J; PELUFFO, G; SOMMA, RE; TOSI, H: Estudio clínico-virológico de infecciones respiratorias agudas en niños hospitalizados en el Instituto de Clínica Pediátrica y Puericultura Dr. Luis Morquio en 1968. Arch. Pediatr. Uruguay, 1970; 41: 272.
- HORTAL, M; ARBIZA, JR; MARTORELL, A; RUSSI, JC; MOGDASY, C; MUÑOZ, MJ: Antígenos virales en células de aspirados nasofaríngeos de niños hospitalizados por infecciones respiratorias agudas (en prensa).
- World Health Organization: Global Medicine-Term Programme. Acute respiratory infections. TRI/ARI (MTP/83.1), 1983.
- MILLER, DL: Acute respiratory infections: Methods of surveillance and control in Europe.
- LENNETTE, EH; BALOWS, A; HANSLER, W; SHADOMY, JH: Manual of Clinical Microbiology, 4th ed.

Washington: ASM, 1985.

12. **GECKLER, RW; GREMILLON, DH; McALLISTER, CK; ELLENBOGEN, C:** Microscopic and bacteriological comparison of paired sputa and transtracheal aspirates. *J. Clin. Microbiol.*, 1977; 6: 396.
13. **HEINEMAS, HS; CHAWLA, JK; VENDELL, MI:** Misinformation from sputum without microscopic examination. *J. Clin. Microbiol.*, 1977; 6: 518.
14. **World Health Organization:** Guidelines for selection of essential bacteriological culture media and diagnostic reagents. *Lab/84,1*, 1984.
15. **KALIN, M; LINDBERG, AA:** Diagnosis of pneumococcal pneumonia: comparison between microscopic examination of expectorate, antigen detection and cultural procedures. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1983; 15: 63.
16. **BARLETT, JG; FINEGOLD, SA:** Bacteriology of expectorate, sputum with quantitative culture and wash technique compared to transtracheal aspirates. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1978; 117: 1019.
17. **CAREY, RB:** Rapid diagnosis of bacterial meningitis by antigen detection. *Clin. Microbiol. News letters*, 1983; 5: 117.
18. **LENNETTE, EH; SMIDT, NS:** Diagnostic procedures for viral, Rickettsial and Chlamydial infections. 5th. Washington: APHA, 1979.
19. **McINTOSH; PIERIK, L:** Immunofluorescence in Viral Diagnosis. In: *The direct detection of microorganisms in clinical samples*. New York: Academic Press, 1983; 57-81.
20. **GARDNER, PS; KAYE, S:** Egg globulins in rapid viral diagnosis. *J. Virol. Methods*, 1982; 4: 257.
21. **McINTOSH, K:** Fluorescent antibodies for rapid diagnosis of respiratory virus. *Ed. PAGRUD*, 1984; 9: 1.
22. **KRUSE, PF; PATTERSON, MK ed:** Tissue Culture: Methods and applications. New York: Academic Press 1973.
23. **FRANK, AL; COUCH, RB; GRIFFIC, CA; BAXTER, BD:** Comparison of different tissue cultures for isolation and quantitation of influenza and parainfluenza viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 1979; 10: 32.
24. **BAUZA, CA; SOTO, J; SOMMA, RE; TOSI, H; RUSSI, JC:** Virosis respiratorias en la infancia. *Pediatr. Panam.*, 1973; 2: 393.
25. **Organización Panamericana de la Salud:** Infecciones Respiratorias en las Américas. *Bol. Epidemiol.*, 1980; 1: 1.
26. **CLYDE, WA; DENNY, FW ed:** Proceedings of a Conference on Acute Respiratory Diseases among children of the world. *Pediatr. Res.*, 1983; 17: 1023-1076.
27. **KRUGMAN, S; KATZ, SL:** Infections diseases of children. St. Louis, C.V. Mosby, 1981.
28. **Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud:** Acute Respiratory Infections of Children. Ref.: RD 21/1, 1983.
29. **GLEZEN, WP et al:** Influenza in childhood. *Pediatr. Res.*, 1983; 17: 1029.
30. **World Health Organization:** Viral Respiratory Disease. Report of a WHO Scientific Group. Geneva, 1980. (Technical Report Series, 642).
31. **KIM, HW et al:** Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington D.C. *Am. J. Epidemiol.*, 1973; 98: 216.
32. **OSTAVIK, I et al:** Viral diagnosis using rapid immunofluorescence technique and epidemiological implications of acute respiratory infections among children in different European Countries. *Bull. WHO*, 1984; 62: 307.
33. **GARCIA DE OLARTE, D; TRUJILLO, H; URIBE, A P:** Lung puncture-aspiration as a bacteriologic diagnostic procedures in acute pneumonias of infant and children. *Clin. Pediatr.*, 1971; 10: 346.
34. **GRARDNER, PS; Mc QUILLIN, V:** Rapid virus diagnosis. 2nd ed. London, Butterworths, 1974.
35. **WASHINGTON II, J:** Manual for Laboratory Techniques, Mayo Clinic, 1983.
36. **KALIN, M; LINDBERG, AA; TUNEVALL, G:** Etiological diagnosis bacterial pneumonia by Gram Stain and quantitative culture of expectorates. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1983; 15: 153.
37. **BARTLETT, JG; BREWER, NS; RYAN, KJ; WASHINGTON, J II:** Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections. *Cumitech 7*, ASM, 1979.
38. **WAHIGREN, H; ERIKSSON, M; MORTENSSON, W; FORSGREN M; MELEN, B:** Isolation of pathogenic bacteria for nasopharynx of children with respiratory syncytial virus infection. Predictive value of chest roentgen examination and laboratory tests. *Scand. J. Inf. Dis.*, 1984; 16: 139.
39. **World Health Organization:** Guidelines for research on acute respiratory infections from WHO meeting. *Bull. WHO*, 1982; 60: 521.