

OTROS

Mención de honor del Premio Nacional de Ciencia 2014 otorgada por el Congreso Nacional

“Innovación diagnóstica aplicada a casos de infecciones respiratorias agudas graves en niños menores de 5 años hospitalizados revela alta incidencia de co-infecciones virales, diversidad genética y elevada portación de *Streptococcus pneumoniae* con serotipos no cubiertos con la vacuna PCV-10”

Honorable Mention of the 2014 Science National Prize awarded by the National Congress

“Diagnostic innovation applied to cases of severe acute respiratory infection in hospitalized children under the age reveals high incidence of viral co-infections, genetic diversity and high carrying of *Streptococcus pneumoniae* with serotypes not covered by PCV-10 vaccine”

En el 2.010, el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) inició una nueva línea de investigación en el área de enfermedades respiratorias. Esta iniciativa surgió como una necesidad sentida en el país en lo referente a la detección y caracterización molecular de agentes infecciosos causales de enfermedades respiratorias agudas (IRAs) debido a la expansión del número de patógenos circulantes en el mundo. La alianza estratégica científico-técnica, de docentes investigadores del IICS y médicos especializados del Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñu (HGP) del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, ha permitido que en tan solo 5 años se obtengan resultados muy relevantes para la salud pública del país y la región. A nivel internacional, apoyaron la transferencia tecnológica investigadores del Laboratorio de Patógenos Emergentes de la Fundación Merieux a través del programa GABRIEL Network, Francia.

Las IRAs son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, con 3,5 millones de muertes anualmente. Las IRAs representan el 20% de todas las muertes de niños en el mundo, con 90% de estas muertes debido a neumonía. Los factores de riesgo de las IRAs severas incluyen desnutrición, bajo peso al nacer, fumar, no amamantamiento, bajo estatus socio-económico, superpoblación, inmunodeficiencia e infección por HIV, y consecuentemente, la morbilidad y mortalidad más grande asociada con IRAs ocurre en países en vías de desarrollo como nuestro país. Las etiologías virales responsables de las IRAs no son frecuentemente estudiadas, particularmente en niños hospitalizados en países tropicales con limitaciones de recursos.

En Paraguay, como parte de la vigilancia de los virus respiratorios, las muestras de pacientes son analizadas usando el ensayo de inmunofluorescencia indirecta o directa, con capacidad de detectar cinco virus respiratorios comunes (Virus Respiratorio Sincitial, Influenzas A y B, Parainfluenza y Adenovirus). Por tal motivo, la vigilancia epidemiológica del país hasta el 2.013 citaba anualmente la circulación de tan solo estos 5 virus.

Por lo expuesto, y ante la posibilidad actual de realizar ensayos moleculares que detectan e identifican en forma simultánea varios virus y bacterias en un pequeño volumen de muestra biológica, hemos aplicado las técnicas “PCR-múltiple”, secuenciación de ácidos nucleicos, análisis filogenéticos y bioinformática en corto plazo. Esto fue posible gracias a la capacidad instalada en el laboratorio de biología molecular del IICS desde el 1.992, y al equipo médico del HGP.

La población enfocada incluyó niños menores de 5 años de edad residentes en el Departamento Central del Paraguay.

El trabajo apuntó a dos grandes objetivos:

- 1) Determinar la frecuencia de virus patógenos no descritos hasta la fecha en el país, co-infecciones virales y bacterias colonizantes en aspirados nasofaríngeos (ANFs) en los niños hospitalizados por IRAs.
- 2) Determinar frecuencia y serotipos prevalentes de portación nasofaríngea de *Streptococcus pneumoniae* en niños sanos.

Los virus más comúnmente identificados fueron rinovirus (30%), parainfluenza (25.0%), coronavirus (23.7%), y virus respiratorio sincitial (RSV) (18.4%) en casos de bronquiolitis. Infecciones por RSV en co-infección con adenovirus, rinovirus, o coronavirus fueron más severas considerando la duración de hospitalización (5-15 días). Por secuenciación, se detectaron las especies y genotipos de Adenovirus, Rinovirus y Metapneumovirus no descritos hasta la fecha en el país. Además, describimos por primera vez en Paraguay la circulación de virus respiratorios no comunes, en infecciones únicas o co-infecciones con otros virus respiratorios tales como Coronavirus, Bocavirus, Metapneumovirus y Enterovirus; y demostramos elevada portación de *Streptococcus pneumoniae* en niños internados con bronquiolitis, lo cual debe ser considerado un riesgo incrementado para la neumonía bacteriana. Estos resultados fueron publicados en el 2.013 bajo el título: **"High Incidence of Viral Co-infections and Atypical Bacterial Detection in Acute Respiratory Infections among Hospitalized Children in the Central Department of Paraguay, 2010-2011"** en la revista Journal of Infection.

Adenovirus. En Paraguay, desconocíamos la dinámica de genotipos de adenovirus implicados en niños con IRA; en primer lugar detectamos este virus en 18% de los niños hospitalizados, y en segundo lugar encontramos la circulación de tres especies (B, C, y D), y un total de 5 genotipos diferentes. Además, nuestros resultados permitieron postular la circulación de cepas con genomas recombinantes de adenovirus, que potencialmente podrían ser más patogénicas y transmitirse con mayor facilidad en la población (actualmente estamos caracterizando a estas cepas recombinantes). Este trabajo fue publicado en el 2.011 bajo el título **"Genetic diversity of human adenovirus in hospitalized children with severe acute lower respiratory infections in Paraguay"** en la revista Journal of Clinical Virology.

Rinovirus. En nuestro país se desconocía la frecuencia de infección por rinovirus en niños con IRA y se subestimaba esta infección, nosotros detectamos 39% de rinovirus en los niños menores de 1 año con bronquiolitis hospitalizados. Por otra parte, encontramos alta diversidad de genotipos de rinovirus circulante: 14 genotipos diferentes en 16 niños y siendo éste el primer reporte sobre diversidad de genotipos de rinovirus en Sudamérica. Se ha puesto en evidencia la necesidad de desarrollar estudios epidemiológicos y clínicos de infección o co-infección viral por rinovirus en nuestro país. Los resultados fueron publicados en el 2.013 bajo el título: **"Phylogeny-based Classification of Human Rhinoviruses detected in Hospitalized Children with Acute Lower Respiratory Infection in Paraguay, 2010-2011"** en la revista Journal of Medical Virology.

En relación al segundo objetivo, en enero de 2.012 se incorporó la vacuna conjugada 10-valente (PCV10) al Calendario Nacional de Vacunación de Paraguay. Esta vacuna incluye los serotipos: 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19F y 23F. Cabe destacar que en el país no existían datos de portación de *S. pneumoniae* y serotipos en niños sanos previos a la inmunización con la vacuna PCV10. Por lo expuesto, se consideró conveniente complementar nuestro estudio en niños con IRA hospitalizados y en niños sanos (que asisten para control o vacunación) empleando técnicas moleculares que permitan determinar la frecuencia de colonización y serotipos prevalentes de *S. pneumoniae* que colonizan la nasofaringe en la población susceptible de beneficiarse con esta vacuna, sin necesidad de un aislamiento previo. Se estudiaron 106 niños, 82% menores de 2 años. Los serotipos más frecuentes fueron el 6AB (25%), 7C (11,4%), 9V (9%), 16F (9%), 20 (6,8%), 34 (6,8%). En 30/44 niños (68%) fueron detectados serotipos no cubiertos con

la vacuna PCV-10. Estos resultados fueron presentados en el 2013 bajo el título: **“Frecuencia de portación de *Streptococcus pneumoniae* y serotipos prevalentes antes de la introducción de la vacuna conjugada 10-valente (PCV-10) en niños menores de 5 años de edad”**, en el IX Congreso Paraguayo de Infectología.

Este trabajo multicéntrico iniciado en el 2010 nos ha permitido demostrar por vez primera en el país la detección cuali-cuantitativa de múltiples agentes microbiológicos en las IRAs, aportando mayor información a nivel regional y mundial sobre la necesidad de un mejor entendimiento de la portación y su relación con el patógeno que causa la enfermedad. A nivel salud pública, la información otorgada sirve para mejorar las estrategias preventivas y terapéuticas (y priorizar los esfuerzos de diagnóstico), quedando claro que es esencial un mejor entendimiento del espectro completo de la colonización bacteriana y de los virus respiratorios causantes de las IRAs en pacientes hospitalizados. Es necesario considerar que la vigilancia de los agentes causales de IRAs puede llevar a una mayor comprensión local de la enfermedad, ayudar a evaluar el impacto de las intervenciones en salud, y proveer información sobre prioridades de tratamiento y estrategias de prevención. La vigilancia puede también ayudar en la identificación de grupos de alto riesgo, en la descripción de distribución de síndromes, y en la identificación de los agentes virales predominantes que causan enfermedad. La detección cuantitativa de agentes múltiples en especímenes nasofaríngeos es un acercamiento ideal para un mejor entendimiento de la portación y su relación con los patógenos causantes de la enfermedad.

AUTORES

IICS-Universidad Nacional de Asunción, Dpto. Biología Molecular y Biotecnología

- **Graciela RUSSOMANDO, PhD.** Investigador Coordinador. Jefe Dpto.
- **Emilio E. ESPINOLA, MSc.** Biólogo. Area Virología Molecular
- **Rosa M. GUILLEN, PhD.** Bioquímica. Area Bacteriología Molecular
- **Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñu (MSPyBS)**
- **Dra. Wilma BASUALDO,** Coordinador Clínico. Médico Pediatra-Infectólogo. Jefe del Dpto. de Epidemiología.
- **Dra Viviana PAVLICICH,** Médico Pediatra. Jefe de Servicio de Urgencias.
- **Dra Carolina AQUINO,** Bioquímica. Jefe de Laboratorio.

CENTRO COLABORADOR DEL PROYECTO

- **Laboratoire des Pathogènes Emergents (LPE)-GABRIEL Network-Fondation Mérieux.**
- **Gláucia PARANHOS-BACCALÀ, PhD; Jean-Noel TELLES, PhD; Melina MESSAOUDI; Florence KOMURIAN-PRADEL, PhD; Dr. Valentina SANCHEZ PICOT**