

BROTE EPIDEMICO DE INFECCIONES POR VIRUS PARAINFLUENZA TIPO 3 (*)

MARIA BELTRAN DUBON
(Barcelona)

INTRODUCCION

Una de las principales causas de mortalidad y morbilidad, especialmente en determinados grupos de edad, la constituyen los procesos respiratorios agudos, los cuales, si bien son generalmente benignos en los adultos y jóvenes, son potencialmente graves en los niños y en los ancianos, edades en que se registran elevadas tasas de mortalidad a consecuencia de dichas afecciones.

En la edad infantil las estadísticas europeas muestran que las infecciones respiratorias agudas significan la 2.^a causa de mortalidad en los menores de un año, superadas tan sólo por la prematuridad y, en algunos casos, por las malformaciones congénitas. En España, más concretamente en Barcelona, las estadísticas de mortalidad infantil correspondiente al año 1966 aportaron exactamente los mismos datos.

En edades avanzadas, las afecciones respiratorias agudas actúan como desencadenante de la mayoría de procesos que se registran como causas de muerte en las estadísticas, como la insuficiencia cardíaca, el cor pulmonale, y la bronquitis crónica. Así en 1965 se registraron en Inglaterra 14.000 defunciones por infecciones respiratorias agudas y sus complicaciones, el 75 % de las cuales se produjeron en individuos de más de 60 años. Por lo que a nuestro país respecta, en 1966 el 63 % de todas las defunciones ocasionadas por afecciones respiratorias agudas registradas en Barcelona, afectó igualmente el grupo de más de 60 años de edad.

La morbilidad de estas infecciones es asimismo muy elevada, ya que cada individuo puede sufrir de 2 a 5 afecciones anuales, benignas en su mayoría, pero cuya reiteración puede dar lugar a la aparición de procesos crónicos bronquiales, pulmonares o cir-

(*) Memoria galardonada con el "Premio Salvá y Campillo" de la Real Academia de Medicina de Barcelona. Lema "Perfundet omnia luce". Concurso del año 1970.

culatorios, así como a complicaciones bacterianas.

Las infecciones respiratorias agudas se caracterizan por una evolución rápida, una duración corta, y en cuanto a la etiología, por estar producidas por microorganismos muy diversos. Las investigaciones desarrolladas en los últimos 20 años han permitido demostrar que, a diferencia de lo que ocurre en las infecciones respiratorias crónicas, en las infecciones agudas las bacterias juegan un papel muy poco importante, considerándose que sólo del 2 al 5 % de las infecciones están originadas por bacterias patógenas. Esto es particularmente cierto en los niños, pero en los adultos, aunque el porcentaje de infecciones de etiología bacteriana es mayor, también la mayoría de casos reconocen una etiología no bacteriana.

Las bacterias son responsables de las amigdalitis agudas y de algunas neumonías, especialmente en los adultos, pero en otros cuadros clínicos su papel es secundario, actuando como gérmenes de sobreinfección merced a las alteraciones de la mucosa respiratoria ocasionadas por las infecciones víricas o, en ocasiones, al estado anérgico provocado por algunas de ellas, en especial la gripe. De ellas las que con mayor frecuencia ocasionan estos cuadros son estreptococo, estafilococo, hemofilus influenza, neumococo, Klebsiella, etc.

Admitido que la mayoría de procesos respiratorios agudos están producidos por microorganismos no bacterianos, es necesario señalar que los

virus responsables de los mismos, y denominados por ello virus respiratorios, son muy variados y pertenecen a diversos géneros. Son virus genuinamente respiratorios los mixovirus, los adenovirus y los rinovirus, pero también manifiestan esta acción patógena virus de multiplicación preferente en el tubo digestivo como son algunos serotipos de virus Coxsackie y virus ECHO (enterovirus respiratorios) y los reovirus. Además pueden producir también infecciones respiratorias agudas microorganismos del género Chlamidia o Bedsonia (Bedsonia ornithosis, responsable de la ornitosis de las aves psitácidas, y que en el hombre puede ocasionar neumonías graves), Rickettsia (R. burnetti, agente de la fiebre Q, de manifestaciones predominantemente respiratorias) y Mycoplasma, como el llamado agente de Eaton (M. pneumoniae) considerado hasta 1962 como un virus, responsable del cuadro de la neumonía atípica primaria.

En la actualidad, en gran número de países se efectúan investigaciones en los Centros de Virología para determinar la frecuencia con que estos virus intervienen en la producción de las infecciones respiratorias agudas, como punto de partida para poder intentar una acción preventiva eficaz, principalmente mediante la vacunación, que conduzca a una disminución en la frecuencia de las mismas y, como consecuencia, a la reducción de las tasas de mortalidad en la primera infancia y en edades avanzadas.

Para ello es fundamental tener un conocimiento preciso de los virus que

difunden en cada zona determinada y su frecuencia y distribución relativas según la edad de los afectados y la situación meteorológica.

Dado que en nuestro país son muy escasos los estudios de este tipo realizados, hemos creído de extraordinario interés estudiar la etiología de las infecciones respiratorias agudas en la población infantil de Barcelona.

Durante los meses de diciembre de 1968 y enero de 1969, tuvimos ocasión de estudiar un brote epidémico de procesos respiratorios agudos en una comunidad infantil cerrada de nuestra ciudad. Mediante inoculación de cultivos celulares pudimos aislar tres cepas de Mixovirus parainfluenza tipo 3, hecho que creemos no ha sido publicado aún en nuestro país.

El estudio virológico, aislamiento y serología del mencionado brote es el objeto de la presente comunicación.

MÉTODOS GENERALES DE DIAGNOSTICO

El diagnóstico de las infecciones víricas puede realizarse directamente, mediante el aislamiento del virus causal a partir de productos patológicos del enfermo, o indirectamente, a través de la demostración de la presencia de anticuerpos en el suero de los mismos.

Aislamiento de virus

En las virosis respiratorias el aislamiento tiene el máximo valor, y en

la mayoría de casos el hallazgo de un virus respiratorio es absolutamente diagnóstico porque no existen infecciones subclínicas ni portadores de mixovirus.

Se obtiene mediante la inoculación de los productos patológicos sobre cultivos celulares (en el caso del virus gripal también sobre huevo embrionado), la introducción de los cuales y su progresivo mejoramiento y simplificación han permitido el amplio desarrollo que la Virología alcanza en estos momentos.

Los cultivos de células animales pueden ser de dos tipos ya delimitados por Enders:

— Cultivos de tejidos o tisulares. En éstos se consigue multiplicación celular en fragmentos de tejidos finamente desmenuzados suspendidos en medios adecuados (método de Maitland), o en finos cortes de tejidos que se fijan a las paredes de tubos o frascos en contacto asimismo con medios idóneos (métodos de Harrison, Carrel, Gey, etc.).

— Cultivos celulares. Para conseguirlos se procede a disociar, mediante tratamiento con tripsina, tejidos humanos o animales obtenidos directamente o también tejidos ya desarrollados *in vitro*. Las células así separadas pueden desarrollarse, bien en suspensión, bien fijándose en la pared de frascos o tubos. La más utilizada es esta última modalidad, especialmente a base de la consecución de una capa monocelular, que es el procedimiento que nosotros utilizamos ordinariamente. Dentro de los cultivos celulares en

capa monocelular podemos distinguir los tres tipos siguientes:

1. Células primarias. — Se trata de células obtenidas mediante disociación con tripsina de diversos órganos animales, y que son capaces de desarrollarse bien *in vitro* durante un cierto tiempo, pero degeneran, si se intenta mantenerlas mediante tripsinaciones sucesivas, en el 2.º o 3.º pase. Algunas de estas células presentan una gran sensibilidad para determinados virus, de ahí la gran importancia que en virología se les ha dado. Las más comúnmente utilizadas y de mejores resultados son las de riñón de mono, utilizándose asimismo las amnióticas humanas, las células tiroideas y las células renales de embrión humano.

2. Células en línea continua. — Son células normales o tumorales adaptadas al cultivo *in vitro* y que pueden propagarse y mantenerse indefinidamente en el laboratorio. Para considerarlas como línea continua deben superar los treinta pases sucesivos realizados mediante tripsinación. Sin embargo, tras estos pases las células sufren alteraciones en su dotación cromosómica (las humanas, normalmente diploides se hacen heteroploides a partir del 5.º ó 6.º pase), a las que se acompañan alteraciones morfológicas, por lo que todas las células en cultivo artificial se parecen extraordinariamente cualquiera que sea su origen.

Las células en línea continua más utilizadas son las HeLa, KB, HEp-2, Detroit 6, Maben, etc., todas procedentes de tejidos neoplásicos, y las

Amnios-57, F.L., T1, RK 13, CIRC, etcétera, procedentes de tejidos normales.

3. Células fibroblásticas humanas de cariotipo diploide. — Cuando interesa comprobar la intervención de un rinovirus en el caso estudiado se utilizan células fibroblásticas, generalmente embrionarias, que adaptadas al cultivo celular mantienen su dotación cromosómica diploide durante un máximo de 50 pases. Las más utilizadas son las denominadas WI-38, de pulmón embrionario humano.

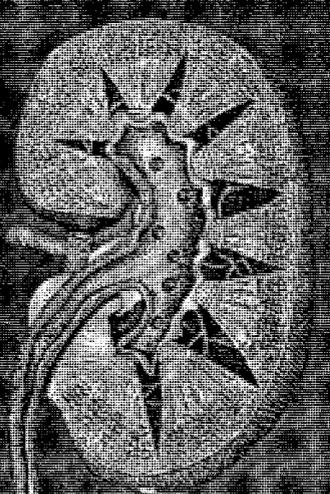
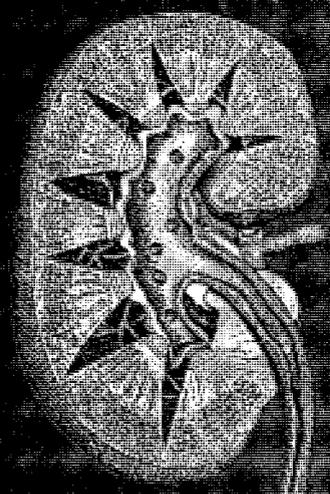
El desarrollo de virus en cualquiera de los cultivos celulares se manifiesta en términos generales por la manifestación de alguno de los fenómenos siguientes:

— Modificaciones en el metabolismo celular, que algunos virus estimulan y otros inhiben. En el primer caso el pH del medio desciende rápidamente, en tanto que en el segundo el medio no sólo no sufre la acidificación normal, sino que más bien tiende a alcalinizarse.

— Alteraciones en la estructura y morfología celulares y destrucción del tejido celular. Estos efectos citopáticos son, en ocasiones, característicos de cada virus y permiten la emisión de un diagnóstico.

— En el medio de cultivo se pueden detectar algunos componentes del virus, como aglutininas, antígenos fijadores del complemento, etc., que, aparte poner de manifiesto el crecimiento del mismo, permiten su identificación.

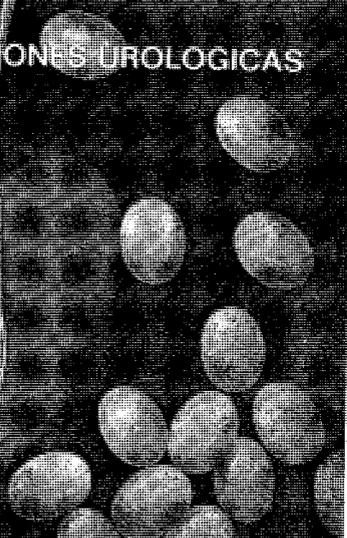
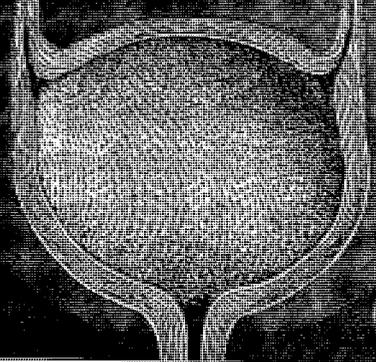
— Las células infectadas por de-

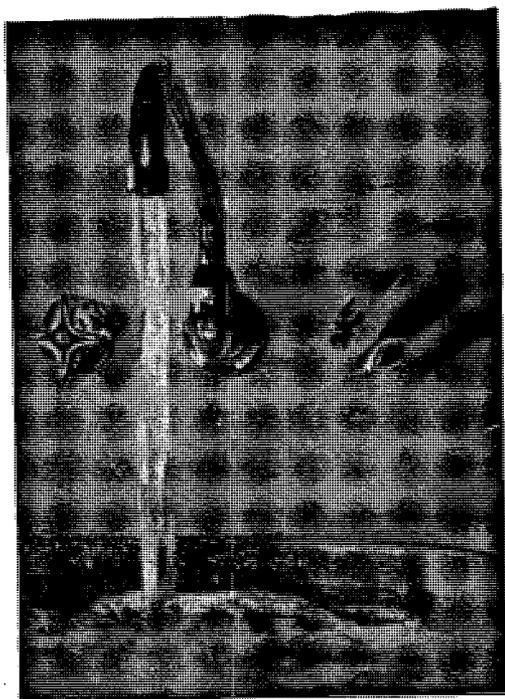


URO-HUBBER

grageas

TERAPEUTICA ESPECIFICA DE LAS INFECCIONES UROLOGICAS





**“La llave
reguladora
de la
diuresis”**

Seguril

FUROSEMIDA

Conocido internacionalmente como **LASIX**

El diurético de nueva clase



HOECHST IBERICA, S. A. - Barcelona

**ORAL
PARENTERAL**

terminados virus presentan la capacidad de adsorber, es decir, fijar a su superficie los hematíes de diversas especies animales.

— Se puede también demostrar la presencia de un virus comprobando su interferencia en el crecimiento de otro virus ya conocido.

Serología

Indirectamente, las infecciones víricas pueden diagnosticarse mediante la práctica de reacciones serológicas aun en ausencia de aislamiento de virus, siendo las más empleadas a este objeto, la reacción de fijación del complemento (RFC) en primer lugar, y las reacciones de inhibición de la hemaglutinación (RIH) y de seroneutralización.

Sin embargo dicho diagnóstico sólo puede emitirse si las muestras que se poseen o los resultados con ellas obtenidos responden a uno de los casos siguientes:

1.º Si se cuenta con dos sueros del enfermo, uno precoz, obtenido antes del 5.º día de la enfermedad, y otro tardío, obtenido entre el 10.º y el 20.º día de enfermedad. Un aumento de cuatro veces el título de anticuerpos entre la primera y la segunda muestra permite un diagnóstico de certeza.

2.º Si se dispone únicamente de dos sueros tardíos, una disminución de 4 veces en el título de anticuerpos es diagnóstica en determinadas condiciones, ya que puede traducir la evolución de una infección reciente.

3.º Caso de disponer de una sola muestra de suero, obtenida tardíamente, es decir, entre el 10.º y el 20.º día de la infección, si aparece un título de anticuerpos elevado se considera significativo, pero no siempre permite emitir un diagnóstico de certeza, salvo en determinadas reacciones o en ambientes epidémicos concretos, y para virus determinados.

En estos casos es especialmente útil la reacción de fijación del complemento, puesto que dada la rapidez con que desaparecen del suero de los enfermos los anticuerpos fijadores del complemento, los títulos de 1/64 son muy significativos y los títulos de 1/256 permiten ya establecer prácticamente el diagnóstico.²⁶ Aquí debe tenerse en cuenta asimismo el antígeno de que se trata, ya que no para todos tienen idéntica significación los títulos elevados, así podemos aducir el caso de la gripe, en que la aparición de títulos altos en la reacción de fijación del complemento es mucho más significativa que en las adenovirosis.

Cuando se estudian brotes epidémicos, especialmente, como en nuestro caso, en comunidades cerradas, refuerza la sospecha diagnóstica la aparición de títulos elevados en varios sueros tardíos únicos.

Reacción de fijación del complemento. — Es la más utilizada y la más ventajosa, a pesar de requerir una extremada vigilancia de todos los elementos que en ella intervienen, de todos los cuales deben establecerse controles. Asimismo los antígenos a utilizar deben ser muy sensibles y ca-

rentes de poder anticomplementario. En todos los casos deben utilizarse sueros de referencia positivos y negativos.

Las ventajas de la reacción de fijación del complemento pueden resumirse del modo siguiente:

— Es una reacción sencilla y económica.

— Los antígenos se conservan perfectamente durante largo tiempo y pueden ser preparados en el propio laboratorio, o en cualquier caso se consiguen con facilidad ya preparados por laboratorios especializados.

— De cara al diagnóstico, y dada la circunstancia a que anteriormente hemos hecho referencia, de la pronta desaparición de los anticuerpos fijadores del complemento, permite presumir una infección reciente el hallazgo en un solo suero de títulos de 1/64, salvo cuando estos títulos son frente a adenovirus o al grupo ornitosis-psitacosis-linfogranuloma.

— Permite realizar un diagnóstico de grupo mediante los antígenos solubles en los casos de infección por virus con distintos tipos antigénicos, evitando así la multiplicación de reacciones que significaría el tener que ensayar un antígeno para cada tipo.

Reacción de inhibición de la hemaglutinación. — Se trata de una reacción muy simple en apariencia, pero de interpretación muy delicada, ya que son grandes las posibilidades de error, por lo que deben controlarse escrupulosamente todas las circunstancias que puedan modificar los resultados, como pueden ser: presencia de inhibidores

inespecíficos, calidad de los hematíes, pH, temperatura, etc.

Esta reacción, como es lógico, solamente puede utilizarse para el estudio y diagnóstico de los virus con capacidad hemaglutinante.

Por lo demás, completa perfectamente a la reacción de fijación del complemento, puesto que permite identificaciones de tipo de virus por ser específica de cepa. Aquí debe advertirse la necesidad de emplear precisamente la cepa causal en la reacción, ya que en caso contrario los resultados obtenidos pueden ser falsos.

Reacción de seroneutralización. — Se trata de una reacción tipo-específica de gran utilidad para completar el diagnóstico y permitir la identificación del virus causal en las virosis producidas por virus con distintos tipos antigénicos y por ello empleada especialmente en el estudio de las adenovirosis; pero muy poco utilizable con fines exclusivamente diagnósticos de las virosis respiratorias, ya que los anticuerpos neutralizantes persisten durante largo tiempo en el suero de las personas infectadas, dificultando así la atribución de su presencia a un proceso actual o reciente. La complejidad de la reacción limita también consiguientemente su utilización.

LOS VIRUS RESPIRATORIOS

Al conjunto de virus capaces de producir afecciones inflamatorias de las vías respiratorias, aun cuando mi-

crobiológicamente no están relacionados, se ha dado en denominarles virus respiratorios.

El conocimiento de dichos virus es relativamente reciente, a pesar de que las infecciones respiratorias hayan sido desde antiguo objeto de estudio y a su esclarecimiento hayan tendido multitud de esfuerzos investigadores; y aun en el momento presente, pese a los indudables progresos registrados en este campo, premanece ignorada la etiología de un porcentaje elevado de procesos respiratorios agudos. En aproximadamente un 30 % de casos no se consigue el aislamiento o la demostración de anticuerpos frente a virus conocidos, lo que permite suponer que aún quedan abiertas amplias posibilidades, y que es posible el descubrimiento de nuevos virus que hasta este momento han escapado a todos los ensayos de aislamiento.

La historia del hallazgo de los virus respiratorios en principio no es sino la de los repetidos intentos de descubrir la etiología de la gripe, cuyas primeras investigaciones se remontan a la pandemia de 1889, durante la cual se aislaron distintos gérmenes en las vías respiratorias de los enfermos, que, sin embargo, poco aportaron al esclarecimiento del problema, ya que los estudios carecían de rigor bacteriológico. Fue en 1893 cuando Pfeiffer aisló un germen pequeño, gram negativo, en los esputos de los enfermos de gripe (*H. influenzae*), el cual fue aceptado como causante de dicho proceso, si bien durante la pandemia de 1918 se demostró que dicho germen

no cumplía con la mayoría de los postulados de Koch, descartándose a partir de aquí su papel etiológico en los procesos gripales. Algo semejante ocurrió con el *B. neumosintes* descubierto por OLITSKY y GATES.¹⁶ Por fin SELTER,²⁴ NICOLLE, LEBAILLY y YAMANOUCI, consiguieron por separado provocar la aparición de procesos gripales mediante la inoculación a voluntarios de un filtrado de esputos de enfermos exento de bacterias, experiencia que por efectuarse en ambiente epidémico no descartaba la posibilidad de la existencia de un contagio natural, pero que inició la etapa virológica y definitiva del estudio de la gripe.

En esta misma época KOLN¹² inició los estudios sobre la gripe porcina, observando cómo al lado de la epidemia humana, se desarrollaba en los cerdos una septicemia benigna que a veces se complicaba con neumonías graves. Más tarde SHOPE aisló en las complicaciones pulmonares de la gripe porcina un bacilo (*H. influenzae suis*) y observó cómo la inoculación de filtrados de las secreciones nasales producía la forma septicémica pura de la gripe, en tanto que la inoculación de dicho filtrado más el bacilo, producía la forma grave y complicada. De dicha experiencia pudo inferirse que la enfermedad específica producida por el virus era en realidad únicamente la sepsis benigna.

El conocimiento de los agentes realmente causantes de la infección gripal se inició en 1933, en que SMITH, ANDREWS y LAIDLAW²⁵ consiguieron reproducir la enfermedad en el hurón

mediante la instilación nasal de filtrados exentos de bacterias, trabajo que constituyó la base de todos los estudios posteriores. Estos autores demostraron asimismo que los hurones que habían contraído la enfermedad eran inmunes a la reinfección y que el suero de convaleciente era capaz de neutralizar el virus. El aislamiento del virus fue confirmado por FRANCIS en 1934, demostrándose además que realmente se producían anticuerpos específicos durante la enfermedad.

En el curso de una epidemia en 1940, FRANCIS y MAGILL, trabajando separadamente, aislaron una nueva cepa y demostraron que el suero de las personas que habían pasado esta epidemia no protegía contra los virus aislados anteriormente. Surgió entonces la necesidad de un acuerdo taxonómico, conviniéndose en calificar con el nombre de tipo B el virus aislado en 1940 por FRANCIS y MAGILL ⁶ y con el de tipo A el virus aislado en 1933.

En 1949 TAYLOR ²⁹ aisló un nuevo virus, distinto antigénicamente y que se denominó tipo C.

Más tarde se aisló en el Japón en un proceso neumónico en un recién nacido, un nuevo virus, también antigénicamente distinto de los anteriores, al que se dio el nombre de virus Sendai o tipo D. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que difería en algunas propiedades de los virus gripales, al igual que los virus aislados por CHANOCK ¹ en 1956, motivo por el cual se les designó con el nombre de virus parainfluenza. De éstos se han aislado hasta el presente cuatro serotipos.

Durante la Segunda Guerra Mundial los trabajos de la Comisión para el Estudio de las Enfermedades Respiratorias Agudas, permitieron avanzar en este campo y así en 1949 EATON, MEIKLEJOHN y VAN HERICH ⁵ aislaron un microorganismo filtrable de los casos de neumonía atípica asociado a la presencia de aglutininas "a frígore" al que se denominó virus de EATON. En 1953 ROWE y HUEBNER, ²³ descubrieron la existencia de virus latentes en las amígdalas y vegetaciones adenoides de los niños, virus que fueron aislados más tarde por HILLEMANN (1954) en brotes de infecciones respiratorias agudas asociadas a conjuntivitis registrados entre los reclutas de la marina americana, y que por ello fueron designados con el nombre de virus APC. Posteriormente ENDERS propuso para estos virus la denominación de adenovirus bajo la que les conocemos actualmente.

En 1956 MORRIS, BLOUNT y SAVAGE aislaron en una epidemia de coriza observada en los chimpancés de laboratorio y en un laborante, el llamado virus CCA, el cual, aislado por CHANOCK en una epidemia de laringotraqueobronquitis, recibió la denominación de virus respiratorio sincitial. ^{3 y 2}

En 1958 diversos autores, y entre ellos PHILIPSON, ²⁰ ROSEN ²² y MOGABGAB, ¹⁵ aislaron de cuadros respiratorios agudos diversos enterovirus, especialmente virus ECHO y virus Cox-sackie, así como reovirus.

Por último, en 1962, investigadores ingleses y americanos independiente-

mente, aislaron de casos de resfriado común un grupo heterogéneo de virus que parece que intervienen con frecuencia en la aparición de estos cuadros en el adulto, y que se han agrupado bajo la denominación de Rinovirus.

Los virus respiratorios constituyen un grupo muy heterogéneo, incluyéndose desde el punto de vista taxonómico en los grupos siguientes:

- 1.º Mixovirus: V. gripales, v. parainfluenza y v. respiratorio sincitial.
- 2.º Adenovirus.
- 3.º Picornavirus: Enterovirus respiratorios y rinovirus.
- 4.º Reovirus.

CHANOCK y *col.* en 1962³ demostraron que el microorganismo filtrable aislado por EATON y colaboradores de casos de neumonía atípica primaria y denominado provisionalmente virus de Eaton, es en realidad un microorganismo del grupo PPLO (*Mycoplasma pneumoniae*), el cual, por producir afecciones respiratorias, suele incluirse en los estudios sobre el grupo de virus respiratorios.

Asimismo, por sus técnicas de estudio similares, se estudian entre los virus respiratorios dos agentes que no siendo virus precisan de células vivas para su multiplicación, uno perteneciente al género *Clamidia* o *Bedsonia*, *Bedsonia ornithosis*, causante de la ornitosis de las aves psitácidas, capaz de afectar al hombre, al que causa una neumonía severa, y una *Rickettsia*, *Rickettsia burnetti*, agente de la fiebre Q, que puede considerarse como

una afección predominantemente respiratoria.

LOS VIRUS PARAINFLUENZA

Los mixovirus parainfluenza son ribovirus, es decir están constituidos por un nucleoide formado por ácido ribonucleico y proteína; presentan simetría helicoidal, poseen las propiedades generales de los mixovirus, y se diferencian de los virus gripales por su mayor tamaño (150-250 m μ) y por su estructura, ya que el diámetro del espiral de RNA es de 15 a 18 m μ , doble que el del virus gripal, con una parte central hueca de 5 m μ de diámetro. Como el virus gripal, poseen una envoltura lipoproteica provista de espículas que representan la hemaglutinina, por tanto son capaces de aglutinar los hematíes, pero, a diferencia de dicho virus gripal, presentan capacidad hemolítica.

Son sensibles al éter y se destruyen con rapidez a pH 3, sin embargo conservan durante años su capacidad infectante congelados a -60°C .

Se conocen en estos momentos cuatro serotipos de virus parainfluenza humanos, así como algunas cepas afines aisladas en animales.

Aun cuando el primer virus parainfluenza fue aislado en el Japón por KUROYA a partir de ratones inoculados con tejido pulmonar procedente de niños fallecidos por neumonía, el primer virus humano reconocido, excluida toda posibilidad de origen animal, fue el llamado CA (croup associated), ais-

lado por CHANOCK¹ en 1955 de niños afectos de croup (laringotraqueobronquitis aguda), y que pudo identificarse gracias a su acción citopática sincitial sobre células de riñón de mono y amnióticas humanas.

Posteriormente se aislaron en niños afectos de infecciones respiratorias agudas tres nuevos virus que presentaban una serie de propiedades comunes con el anterior. La acción citopática de éstos es mínima, especialmente en los ensayos de aislamiento, por lo que la presencia del virus debe hacerse patente mediante el fenómeno de la hemadsorción de VOGEL y SHELOKOV,³¹ ya que pertenecen al grupo de los llamados virus hemadsorbentes.

Los cuatro serotipos de virus parainfluenza son:

1.º Virus parainfluenza 1. — Se incluyen el v. Sendai y el v. hemadsorción 2. El virus Sendai, aislado por KUROYA en el Japón en un caso de neumonitis del recién nacido, fue considerado por este autor como responsable de dichos cuadros en el Japón, China y Rusia, si bien estudios realizados posteriormente en este último país por GERNGROSS y ZHDANOV (1957)⁸ dieron como resultado el aislamiento de dicho virus en procesos gripales. FUKUMI⁷ en 1959 demostró la difusión de este virus entre los ratones de laboratorio. El virus hemadsorción 2 fue aislado por CHANOCK y col. de niños afectos de laringotraqueítis obstructiva o croup y puesto de manifiesto mediante la técnica de la hemadsorción. Los ensayos de inoculación a voluntarios han dado como re-

sultado la aparición de cuadros con síntomas respiratorios diversos y casi constante rinorrea.

2.º Virus parainfluenza 2. — Fue aislado por CHANOCK¹ en 1955 en Cincinnati y por BEALE en Toronto, a partir de niños afectos de laringotraqueítis obstructiva (v. CA). También en 1955 SHELOKOV y VOGEL³¹ aíslan virus semejantes de niños afectos de procesos gripales.

3.º Virus parainfluenza 3. — Recibe también la denominación de virus hemadsorción 1. Fue aislado por CHANOCK de niños afectos de procesos respiratorios. En 1959 SUTTON²⁸ en Inglaterra lo aisló asimismo en pequeños brotes epidémicos infantiles.

4.º Virus parainfluenza 4. — Fue aislado por JOHNSON¹¹ en 1960 empleando la técnica de la hemadsorción. La cepa tipo es la M-25. No se conoce con certeza su acción patógena para el hombre, aunque parece que se asocia con cuadros clínicos leves que afectan a niños de corta edad. Se conocen dos subtipos: A (M-25) y B (CH-19503).

Por lo que a las características biológicas generales de estos virus respecta, vamos a detenernos brevemente en la consideración por separado de algunas de ellas.

Hemaglutinación. — Los virus parainfluenza presentan la propiedad de aglutinar los glóbulos rojos de cobayo a 37°C (o mejor, primero a 4º y después a 27°C) obteniéndose títulos elevados con los 4 tipos. Cuando se emplean glóbulos rojos de pollo a +4°C se obtienen títulos más eleva-

dos con los tipos 1 y 2. La hemaglutinación es de tipo enzimático por acción de la neuraminidasa.

Hemolisis. — Se ha demostrado la presencia de una hemolisina en los tipos 1, 2 y 3, la cual se halla asociada a la partícula del virus y cuya actividad se efectúa a través del mismo receptor celular del hematíe que interviene en la hemaglutinación.

Hemadsorción. — Los cultivos celulares infectados con virus parainfluenza de los cuatro tipos presentan la propiedad de adsorber determinados tipos de hematíes cuando éstos se añaden a dichos cultivos. Este fenómeno de hemadsorción se atribuye a la presencia en la superficie de las células infectadas de hemaglutininas específicas que reaccionan con los receptores del hematíe.

Inclusiones. — Los virus parainfluenza inducen la formación de inclusiones citoplasmáticas de tipo eosinófilo en las células infectadas.

Acción citopática. — Los virus parainfluenza producen en general muy ligeras alteraciones celulares, a veces inaparentes, en los primeros pases; solamente el tipo 2, cuando se inocula sobre riñón de mono, produce unas alteraciones de tipo sincitial evidentes ya en los primeros pases. Desde luego las células más sensibles y por ello adecuadas para el aislamiento, son las de riñón de mono, sobre las que se desarrollan bien los cuatro serotipos. Pueden también utilizarse, aunque su sensibilidad es menor, los fibroblastos humanos diploides.⁹ Las células en línea continua son asimismo uti-

lizables para el aislamiento de los tipos 2 y 3.¹³

En las cepas adaptadas al cultivo celular los tipos 2 y 3 inducen la formación de células alargadas y estrelladas y de sincitios, en tanto que los tipos 1 y 4 producen únicamente un ligero redondeamiento y degeneración de las células. Los virus parainfluenza no presentan interferencia entre ellos.

Crecimiento en embrión de pollo. — En general crecen mal en embrión de pollo y únicamente el tipo 3 se ha aislado por este medio. Sin embargo las cepas de los 4 tipos, una vez aisladas sobre cultivos celulares, se adaptan con facilidad al crecimiento en saco amniótico de embrión de pollo de 8 ó 10 días con relativa facilidad.

Inoculación experimental. — La inoculación al cobayo o al hamster por instilación intranasal no provoca manifestación clínica alguna.

En diversas especies animales se han aislado virus semejantes a los humanos, dato a tener en cuenta para evitar la interpretación errónea de los resultados de la inoculación experimental. Así un virus semejante al tipo 1 infecta a los roedores y a los cerdos pudiendo producir brotes epidémicos; los virus SV₅ y SV₄₁ que producen infecciones latentes en los monos son semejantes al tipo 2, y el virus SF₄, que produce infecciones respiratorias en el ganado bovino (Shipping-fever) es idéntico al tipo 3.

Estructura antigénica. — Los virus parainfluenza presentan dos tipos de antígenos: los antígenos específicos

superficiales, ligados a la membrana de envoltura, que se pueden demostrar por reacciones de neutralización, inhibición de la hemaglutinación o de la hemadsorción; y antígenos específicos solubles, obtenidos por tratamiento con éter, que se demuestran por reacciones de fijación del complemento. No ha sido obtenido todavía ningún antígeno grupo específico.

Los tipos 1, 2 y 3 son antigénicamente homogéneos, pues sólo se ha identificado un único serotipo para cada uno, y además son antigénicamente estables, pues no se han demostrado variaciones en su estructura antigénica como en los virus gripales.

Sin embargo, presentan estos virus algunas relaciones antigénicas entre ellos y con virus de otros grupos que dificultan su identificación. Dicha identificación se efectúa mediante reacciones de fijación del complemento y de inhibición de la hemaglutinación frente a sueros inmunes de cobayo. Con la RFC' se obtienen títulos homólogos de 1/80 a 1/2560, los títulos heterólogos en general son inferiores a 1/10.

La respuesta serológica del hombre frente a la infección por estos tipos es menos específica que en los animales a consecuencia en general de las infecciones previas por alguno de los tipos o por otros paramixovirus relacionados antigénicamente, de ahí que a excepción de en los niños recién nacidos y en los menores de un año, que seguramente sufren primoinfecciones, en los demás casos, como el niño ha tenido ya una experiencia

previa, frente a una nueva infección se producen respuestas heterólogas, sobre todo por lo que al tipo 3 se refiere. Las primoinfecciones por este tipo se producen por lo general con antelación a las por los tipos 1 y 2. El gran número de diagnósticos serológicos de infección por el tipo 3 en los niños de edad avanzada son seguramente explicables como debidos a respuestas heterólogas. Los adultos desarrollan generalmente respuestas heterólogas frente a otros paramixovirus como el virus de la parotiditis, aparte de los restantes tipos de parainfluenza.

DESCRIPCION DE LA COLECTIVIDAD INFANTIL

Hemos realizado este estudio en el Instituto de Puericultura de la Maternidad Provincial de Barcelona, centro en que se albergan alrededor de 1.000 niños, nacidos en su mayoría en la propia Institución e ingresados el resto (un escaso 5 %) en general antes de cumplido un mes de edad. Estos niños permanecen en el centro hasta los 5 ó 6 años, a excepción de los que son reclamados por sus padres o son adoptados.

Según sus edades los niños están distribuidos en diversas salas y pabellones del siguiente modo:

Pabellón de Lactantes. En él se hallan los salones 1 al 4 que albergan niños de edades comprendidas entre una semana y un año de edad, y los salones 5 al 9 ocupados por niños de

uno a dos años. En cada uno de los salones suelen vivir de 30 a 35 niños.

Pabellones Destetes I y II. En cada uno se alojan 50 niños de dos a tres años y medio de edad.

Pabellón Cambó. Se alojan en el mismo 150 niños cuyas edades oscilan entre los dos y tres años y medio.

Pabellón Ave María. Alberga en pisos distintos a todos los niños y niñas desde los tres años y medio hasta los seis.

Aparte existe un pabellón de enfermería en el que se alojan los pequeños enfermos en boxes individuales y aislados.

La estancia de los niños en cada sala varía desde algunos meses en los salones 1, 2, 3 y 4, hasta más de un año en los restantes, ya que a partir del año de edad no se les cambia con tanta frecuencia.

Las posibilidades de contacto son grandes entre los niños albergados en la misma sala, pero raras entre los niños de salas distintas, ya que tanto las comidas como los juegos los realizan por separado.

El personal en continuo contacto con los niños está constituido por religiosas, enfermeras internas y algunas madres, que en calidad de domésticas prestan sus servicios en el Instituto. Como personal externo, cuyo contacto con los niños es menor, figuran los médicos y algunas trabajadoras sociales.

Las visitas son poco numerosas y los niños en general no salen de la Institución, aunque pueden pasar las vacaciones con sus familias.

Por lo que a la atención médica respecta, tras una amplia exploración sufrida previamente al ingreso en el Pabellón de Lactantes, y hasta los siete meses, todos los niños son examinados una vez por semana. Entre los siete y los doce meses son controlados cada 15 días y a partir de esta edad son sometidos a un solo examen completo anual.

Durante la lactancia se registra la temperatura corporal de los niños dos veces al día, se examinan las heces y se anotan todas las observaciones en la historia clínica de cada niño.

En caso de enfermedad, si ésta es leve, los niños son tratados en la misma sala, pero si reviste alguna importancia son trasladados a la enfermería.

DESCRIPCION DEL BROTE EPIDEMICO

A mediados del mes de diciembre de 1968 se produjeron en la Sala 4 del Instituto de Puericultura de Barcelona diversos casos de bronquitis febril que se extendieron en forma epidémica en los días sucesivos a la mayoría de los niños de la Sala y de dos salas próximas, Salas 1 y 3, situadas en el mismo edificio. En el transcurso de un mes enfermaron un 82,3 % de los niños de las tres salas, con porcentajes de morbilidad semejantes en cada una de ellas, que albergaban niños de edades similares (1 semana a 1 año de edad).

Clínicamente los procesos afectaron al tracto respiratorio inferior, diagnós-

ticándose bronquitis en la mayoría de los enfermos. El cuadro evolucionó en varios casos hacia la neumonía, que fue generalmente poco grave, excepto en una niña mongólica de la Sala 1 que falleció a los 6 días de la enfermedad.

Este brote epidémico evolucionó paralelamente a otro que, afectando salas distintas, fue producido por el virus Respiratorio Sincitial.¹⁷

MATERIAL Y METODOS

Material Clínico

Se escogió una muestra del 40 % aproximadamente de los 42 niños que resultaron afectados, entre los que se incluyeron la mayoría de los que, presentando un cuadro más severo, requirieron hospitalización. En conjunto se estudiaron 17 enfermos; 14 de ellos mediante intento de aislamiento del virus causal y la obtención de dos sueros para la práctica de reacciones serológicas, y dos únicamente por intento de aislamiento. La defunción de uno de los niños de la muestra impidió completar la serología de un caso (tabla núm. 1).

Ensayos de aislamiento

Frotis faríngeo. — Es el método de elección en estos procesos. Lo practicamos con escobillón estéril verificando un rascado enérgico de la región faringo amigdalár. Dicho escobillón lo introdujimos inmediatamente en un tubo con 5 ml de medio de transporte

a base de solución de Hanks con 30 % de líquido amniótico bovino y antibióticos, y lo más rápidamente posible lo trasladamos al laboratorio, donde el medio se reparte a pequeños volúmenes para conservarlo congelado a -50°C hasta el momento de la inoculación, caso de no hacerse ésta directamente.

Inoculación de los cultivos celulares. — Inoculamos con cada muestra un mínimo de 6 tubos o un frasco de 60 ml con células desarrolladas en capa monocelular, a razón de 0,2 ml por tubo o 0,8 ml por frasco.

Todas las muestras, directamente o previa congelación, fueron sembradas sobre células primarias de riñón de mono y además en líneas celulares continuas.

Células primarias. — Utilizamos células de riñón de mono (*Macacus Rhesus*, *Macacus Cynomolgus* o *Cercopithecus Aetiops*), que recibimos periódicamente en suspensión. Dichas células, tras agitación magnética y recuento, las repartimos o mejor resuspendemos, a razón de un millón por ml en medio de crecimiento y sembramos a razón de 200.000 células por tubo y un millón por frasco de 60 ml.

Sea cual sea la especie originaria, utilizamos para el desarrollo medio de hidrolizado de lactalbúmina¹⁴ al 0,5 % en solución de Hanks con 2 % de suero de ternera y antibióticos, y para la supervivencia medio 199 (medio de Morgan y Parker) sin suero, adicionado de un 0,2 % de suero antiSV₁ al 1/500.

Incubamos las células inicialmente

TABLA N.º 1

BROTE EPIDEMICO DE PROCESOS RESPIRATORIOS AGUDOS POR VIRUS PARAINFLUENZA TIPO 3 EN TRES SALAS DE PUERICULTURA EN DICIEMBRE DE 1968 Y ENERO DE 1969

NIÑOS RESIDENTES			NIÑOS CON P.R.A.			CASOS ESTUDIADOS MEDIANTE:							
SALA	Sexo	Edades	Número	Número	%	Aislamiento virus				Serología (R.F.C.)			
						núm.	% de los enfermos	Diagnóstico (virus aislado)	%	núm.	% de los enfermos	Diagnóstico serológico	%
4	V y H	1 sem. a 1 a.	17	13	76,44	4	30,7	2	50	4	30,7	3	75
1	V y H	1 sem. a 1 a.	16	14	87,5	6	42,8	0	0	5	35	4	80
3	V y H	1 sem. a 1 a.	18	15	83,3	7	46,6	1	14,2	5	33,3	3	60
			51	42	82,3	17	40,4	3	23,5	14	33,3	10	71,4

P.R.A.=Procesos respiratorios agudos.

en la estufa a 37°C, cuando el tapiz celular cubre aproximadamente el 75 % de la superficie de crecimiento, procedemos a sustituir el medio por medio de supervivencia, y a trasladarlas a la estufa a 33°C, momento a partir del cual puede ya efectuarse la inoculación de los productos patológicos.

El medio de supervivencia debe ser renovado cada cuatro días.

Cada dos días observamos los tubos para detectar la aparición de una posible acción citopática, y, además los días 7.º y 14.º tras la inoculación, practicamos una reacción de hemadsorción¹⁸ en un tubo de cada serie y una hemaglutinación con el medio.

La reacción de hemadsorción se realiza, tras cambiar el medio de los tubos si está acidificado, añadiendo a cada uno 0,2 ml de una suspensión de hematíes de cobayo al 1/250 y dejando en contacto durante 30 minutos a +4°C. La lectura la efectuamos en microscopio normal, no invertido, observando si los hematíes aparecen o no adheridos a las células del cultivo. Los tubos utilizados los desechamos y proseguimos la incubación de los restantes.

Tanto los tubos como los frascos, terminan su incubación a los 14 días, en cuyo momento recogemos el medio y las células desprendidas mediante rascado y lo repartimos en pequeños volúmenes para su conservación congelado con vistas a pases posteriores.

Con una pequeña cantidad de líquido procedemos a realizar una reacción de hemaglutinación cuantitativa

para detectar la presencia de hemaglutininas.

Realizamos dicha reacción en placas de Perspex, utilizando hematíes de cobayo suspendidos al 1/100 en suero fisiológico y manteniendo en contacto por espacio de una hora a temperatura ambiente.

Si las reacciones de hemadsorción y hemaglutinación son negativas, procedemos a un segundo pase. Si, por el contrario, son claramente positivas, se puede ya realizar una reacción de inhibición de la hemaglutinación frente a los sueros anti-mixovirus para identificar el virus, pero en general, prácticamente siempre, verificamos un segundo pase para aumentar el título del antígeno hemaglutinante.

Los pases los realizamos bien directamente en el momento de la recogida, o bien, en caso contrario, tras haber conservado los líquidos congelados a -50°C.

Antes de considerar un aislamiento como negativo realizamos sistemáticamente tres pases sucesivos.

Líneas continuas. — Mantenemos en el laboratorio, y hemos utilizado para este trabajo, tres líneas celulares continuas: HEp-2, KB y Amnios-57.

Para el crecimiento de las KB empleamos un medio de hidrolizado de lactalbúmina en solución de Hanks al 0,5 % con 10 % de suero de ternera inactivado y antibióticos, medio que para la supervivencia modificamos reduciendo al 2 % la cantidad de suero. Las HEp-2 precisan idéntico medio, pero adicionado de un 1,2 % de una solución de glucosa al 9 %. Las Am-57

las desarrollamos en medio 199 con 10 % de suero y antibióticos y las mantenemos en el mismo, pero reducida la concentración de suero al 2 %. Cuando se sospecha la posibilidad de que el virus objeto de estudio sea un respiratorio sincitial, el suero del medio de supervivencia debe sustituirse por un 30 % de líquido amniótico bovino, modificación por tanto no necesaria en nuestro caso.

Mantenemos estas líneas celulares por tripsinaciones sucesivas realizadas según la técnica de DULBECCO y VOGT con tripsina preparada según las indicaciones de WALLIS y colaboradores.³¹

Como la reiteración de los pases provoca alteraciones genéticas en las células, con consiguiente repercusión sobre la sensibilidad a la acción de los virus, reducimos aquellos al mínimo conservando las células congeladas a -60°C , ya que en estas condiciones mantienen su viabilidad durante un año.

Con cada muestra inoculamos un mínimo de tres tubos, a los cuales renovamos el medio de supervivencia cada cuatro días.

Cada dos días procedemos a la observación microscópica de los tubos para comprobar la aparición de un posible efecto citopático.

Transcurridos 14 días de la inoculación, procedemos a la recogida de las células y a la inoculación directa de nuevos tubos, es decir a la práctica de un segundo pase. Sistemáticamente realizamos siempre tres pases sucesivos, directos o, en caso necesario, con los productos conservados

congelados a -50°C , antes de dar un aislamiento como negativo.

Con los líquidos recogidos procedemos a realizar una reacción de hemaglutinación frente a hematíes de cobayo según la técnica habitual, al final de cada pase.

Si bien las líneas continuas no se consideran como de elección para el aislamiento de los virus parainfluenza, dan buenos resultados cuando se trata de los tipos 2 y 3, los cuales pueden producir ya en los primeros pases un efecto citopático evidente con formación de sincitios e inclusiones citoplásmicas.

Identificación de los virus aislados

Los virus aislados se identificaron por inhibición de la hemaglutinación (R.I.H.), previo tratamiento de los sueros de referencia (anti-Para 1, 2, 3 y SV5) con RDE (Receptor Destroying Enzyme), y por inhibición de la hemadsorción (R.I.Hd.).¹⁸

Reacción de inhibición de la hemaglutinación

a) *Sueros de referencia.* — Los sueros que utilizamos son anti Para 1, 2 y 3 Atlanta y anti SV5, los cuales deben sufrir dos tratamientos previos antes de su ensayo:

1. Destrucción de inhibidores inespecíficos.

Se realiza mediante "Receptor Destroying Enzyme" obtenido de filtrados de vibrión colérico.

2. Inactivación del complemento y destrucción del R.D.E.

Se colocan los tubos al baño María durante 1 hora a 56°C.

b) *Antígeno*. — Utilizamos como antígeno las cepas aisladas sobre células de riñón de mono.

c) *Técnica de la reacción*. — Verificamos la reacción en placas de material plástico Perspex según el método standard preconizado por la O.M.S.²⁶

Titulación del antígeno-hemaglutinina. — A pesar de conservarse previamente titulado, el antígeno hemaglutinante debe ser de nuevo titulado inmediatamente antes de cada reacción.

La titulación, como la reacción, la realizamos en placas Perspex del modo habitual.

La R.I.H. puede realizarse cuando la hemaglutinina contiene 4 U.H.A. (título 1/4), si bien preferimos utilizar una hemaglutinina más potente (≥ 64).

Reacción de inhibición de la hemadsorción

La reacción de inhibición de la hemadsorción para la identificación de un virus aislado puede ponerse en práctica a partir de una hemadsorción positiva en el 50 % de las células del cultivo.

Para la reacción se precisan un mínimo de 10 tubos más un testigo de las células.

Se practica hemadsorción de un tubo a los 4 y sobre otro a los 7 días de inoculación, cuando la lectura es ++ (50 % de las células con hemadsorción positiva), se realiza la R.I.Hd.

Utilizamos los sueros anti Parainfluenza 1, 2 y 3 de Atlanta y anti SV5.

Vertemos el medio de todos los tubos, los lavamos 2 veces con solución salina fisiológica y añadimos 0,6 ml del habitual medio de supervivencia.

Añadimos a continuación 0,2 ml de suero por tubo, utilizando 2 tubos por cada dilución de éste, y los dejamos inclinados durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras el contacto añadimos 0,2 ml de hematíes de cobayo al 1/250 a todos los tubos, incluyendo un testigo de las células.

Tras incubación de media hora a +4°C procedemos a la lectura de la reacción.

Métodos serológicos

Para el diagnóstico serológico hemos utilizado la reacción de fijación del complemento, cuya técnica, así como la de preparación de antígenos, describimos muy brevemente a continuación.

Preparación de antígenos solubles de virus parainfluenza

Realizamos la preparación de estos antígenos, sobre células de riñón de mono, si bien el del tipo 3 puede prepararse sobre células en línea continua KB o HEP-2.

Cuando la destrucción celular es completa, lo que suele ocurrir a los

6 u 8 días de la inoculación, recogemos el medio y las células, lo congelamos y descongelamos sucesivamente y lo sometemos a una centrifugación ligera. El sobrenadante constituye el antígeno llamado "clásico", generalmente satisfactorio para el tipo 3, ya que suele contener 2 U. A. en la dilución 1/2 al 1/4. Las técnicas de concentración pueden ser utilizadas si se desean mejorar los rendimientos de los antígenos de los tipos 1 y 2.

Se prepara siempre un antígeno normal con las mismas células empleadas en la preparación de los antígenos y obtenidas con el mismo método que dichos antígenos víricos.

Conservamos todos los antígenos congelados a -50°C .

Reacción de fijación del complemento

Para este estudio hemos empleado el micrométodo en tubos con fijación en frío descrito por SOHIER y colaboradores en 1956.²⁷

Sueros problema. — Hemos conservado los sueros de los enfermos repartidos en pequeños volúmenes y congelados a -20°C hasta el momento de la prueba. Previamente a su utilización los mantenemos durante media hora en el baño María a 56°C con el fin de inactivar el complemento.

Antígenos. — Todos los antígenos que utilizamos en nuestras experiencias son antígenos solubles, tipo-específicos, preparados según la técnica anteriormente expuesta. Ensayamos también en todos los casos los sueros problema frente a los antígenos norma-

les con el fin de detectar la presencia de anticuerpos inespecíficos.

Todos los antígenos los titulamos, tras su preparación, por el método de Boerner-Lukens en presencia de tres sueros de referencia cuyo título ha sido previamente determinado frente a un antígeno también de referencia; de dichos sueros, el primero debe ser negativo, el título del segundo debe ser medio, y alto el del tercero.

La dosis de antígeno a utilizar en la reacción de fijación del complemento se considera debe ser el doble de la cantidad mínima que permite a los sueros encontrar su título exacto (2U). Se utiliza un exceso de antígeno con el fin de evitar los fenómenos de zona.

Sueros de referencia. — Utilizamos como sueros de referencia positivos, sueros humanos procedentes de individuos cuya infección ha sido demostrada por el aislamiento de virus y/o por demostración de un aumento significativo del título de anticuerpos. Disponemos, asimismo, de sueros de referencia positivos proporcionados por los Centros Internacionales de Referencia (Communicable Disease Center de Atlanta, principalmente).

Los sueros negativos utilizados como control de la reacción, son sueros humanos, repetidamente controlados, desprovistos de anticuerpos frente a los virus respiratorios.

Complemento. — Utilizamos suero de cobayos machos conservado a -50°C .

Suero hemolítico. — Hemos utilizado el concentrado preparado por el Instituto Pasteur.

TABLA N.º 2
CASOS DE INFECCION POR VIRUS PARAINFLUENZA TIPO 3

SALA	Fecha comienzo enfermedad	Nombre	Edad años-meses	Cuadro clínico	Días en relación con el comienzo	Resultados	Días de obtención de los sueros en relación con el comienzo	Serología			
								R.S.	R.F.C. antígenos		
									Parainfluenza		
								1	2	3	
SALA 4	15.12.68	Julio	1-2	Neumonía	+3	—	+3 +20	0 0	0 0	0 0	0 64
	27.12.68	Salvador	1-2	Bronquitis	+1	+ virus Para 3	+3 +13	0 0	0 0	0 0	0 64
	27.12.68	Carmen	0-1	Neumonía Otitis	+1	+ virus Para 3	+1 +13	0 0	0 0	0 0	0 8
	25.1.69	José J.	1-0	Neumonía	+5	—	+9 +25	16 16	0 0	0 0	256 256
	21.12.68	Javier	1-9	Neumonía	+6	C	+6 +19	0 0	0 0	0 0	8 128
	6.1.69	María Carmen	0-3	Neumonía (mongólica) Fallecida (9.1.69)	+4	—	+4	0	0	0	0

**En el síndrome
ARTROPATIA -
IMPOTENCIA - FUNCIONAL
de la
ENFERMEDAD REUMATICA**

INDOMETACINA LIADE

antiinflamatorio
analgésico
antigotoso
anticolagenosis

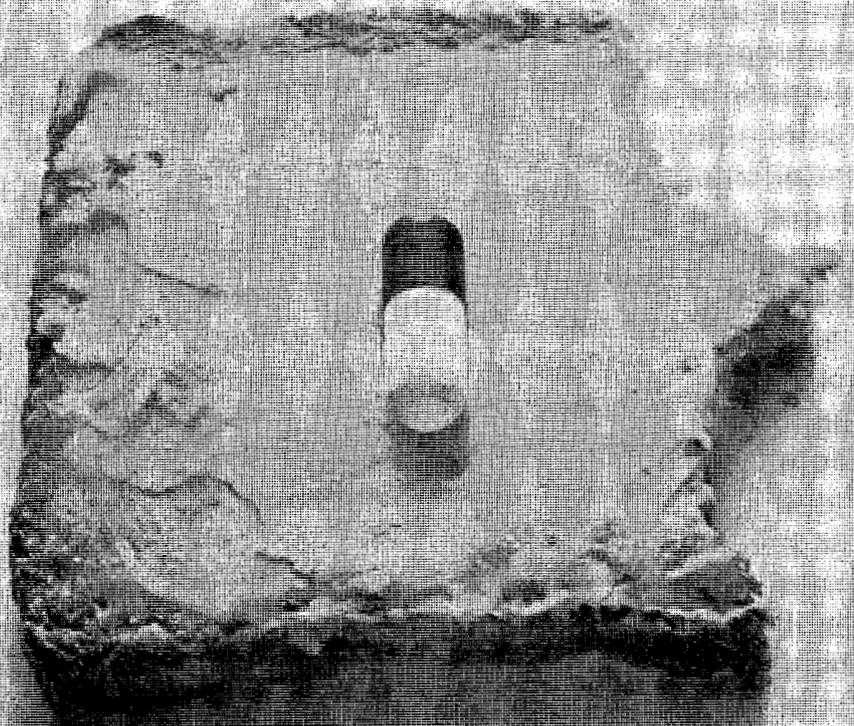
INDOMETACINA LIADE

Cápsulas con
25 mg. de Indometacina
Frasco de 50 cápsulas
P.V.P. 146,10

Supositorios con
100 mg. de Indometacina
Cajas con 10 supositorios
P.V.P. 88,90



Alca Butazolidina®



El antirreumático
preferido
por el estómago
de sus pacientes

Envase con 50 cápsulas
P. V. P. 111,60 ptas.

Geigy Sociedad Anónima
Apartado 1628
Barcelona

Geigy

SALA 1	6.1.69	María Teresa	0-4	Bronquitis	+4	—	+4 +16	0 0	0 0	0 0	0 32
	8.1.69	Antonio	0-5	Bronquitis	+2	—	+2 +14	0 0	0 0	0 0	0 16
	8.1.69	José A.	0-1	Rinofarinitis febril	+2	—	+5 +26	0 0	0 0	0 0	0 0
	9.1.69	Jorge	0-3	Bronquitis	+1	—	+4 +25	0 0	0 0	0 0	0 64
SALA 3	7.1.69	Magda	0-11	Bronquitis	+3	+ virus Para 3	+6 +22	0 0	0 16	0 0	0 256
	7.1.69	Angel	0-10	Bronquitis	+4	—					
	7.1.69	María Angeles	0-4	Bronquitis	+3	—	+6 +27	0 0	0 0	0 0	0 128
	8.1.69	Antonio	0-7	Bronquitis	+2	—	+5 +35	0 0	0 0	0 0	0 8
	8.1.69	Enrique	0-7	Bronquitis	+2	—	+5 +39	0 8	0 0	0 0	0 8
	10.1.69	Mónica	0-2	Rinofarinitis	+1	—					
15.1.69	M. ^a Luz	0-7	Bronquitis	+5	—	+5 +19	8 8	0 0	0 0	0 32	

C=Cultivo contaminado.

Hematíes de carnero. — Los lavamos y diluimos al 2 % en solución tampón-veronal tipo Mayer-Croft.

Antes de comenzar la reacción titulamos siempre el complemento frente a cada antígeno a ensayar y frente a un testigo de tampón veronal.

La unidad 100 % de complemento viene dada por la dilución que provoca hemolisis total a la media hora.

El suero hemolítico se titula una sola vez a la recepción de cada lote, y se conserva inalterado a +4°C durante meses. Por otra parte se realiza un control indirecto en la titulación del complemento.

En la reacción de fijación del complemento incluimos siempre un suero positivo, de título conocido y un suero negativo, realizando simultáneamente los controles generales y los controles de los sueros.

Reacción. — Diluimos inicialmente los sueros problema al 1/8, inactivamos el complemento y realizamos a continuación tantas diluciones sucesivas cuantas correspondan al título presumible del suero ensayado.

Cada antígeno lo ensayamos frente a todas las diluciones del suero problema, del cual establecemos un control en la dilución 1/8. Incluimos en la reacción un suero positivo a tantas diluciones como su título requiera más dos, un suero negativo, ambos con su correspondiente control y 4 pares de tubos testigos generales de la reacción.

Seguidamente añadimos el complemento diluido según el resultado obtenido en la titulación previa.

Tras agitar enérgicamente, coloca-

mos los tubos en la nevera a +4°C durante 14-16 horas. Transcurrido el período de contacto, los introducimos durante 2 minutos en baño María a 37°C y procedemos seguidamente a añadir la mezcla hemolítica a todos los tubos. Los agitamos enérgicamente y los introducimos en el baño María a 37°C. Transcurridos 30 minutos procedemos a la lectura de la reacción.

La reacción se considera positiva cuando la hemolisis es nula o alcanza un máximo de 20 %. El suero positivo debe presentar su título y el negativo debe ser negativo. Los testigos de suero deben ser asimismo negativos, otro resultado significa que dichos sueros presentan poder anticomplementario.

RESULTADOS

Los resultados globales obtenidos en el estudio del brote epidémico se reflejan en las tablas 1 y 2.

Aislamiento del virus. — De los 17 ensayos de aislamiento, 14 fueron negativos y en 3 se puso de manifiesto el crecimiento de virus hemaglutinantes.

Los tres aislamientos positivos fueron inoculados sobre cultivos celulares previa congelación a -50°C. En dos de ellos, tanto el primer pase como los sucesivos se efectuaron sobre células de riñón de mono. El tercero fue inoculado sobre células de riñón de mono tras haber observado la aparición de acción citopática sincitial en un 2.º pase sobre células en línea

TABLA N.º 3

AISLAMIENTO DE VIRUS PARAINFLUENZA TIPO 3

Nombre	Edad años-meses	Cuadro clínico	Días en relación con el comienzo de la enfermedad	Primer Pase				Segundo Pase				Tercer Pase				Identificación	
				Células	A.C.P.	H.	Hd.	Células	A.C.P.	H.	Hd.	Células	A.C.P.	H.	Hd.		
Salvador	1-2	Bronquitis	+1	RMR	+ 10º d	0	0	RMC	+ 8º d	+			RMC	+ 6º d	+	R.I.H.	
Carmen	0-1	Neumonía	+1	KB	0	0	0	Am-57	+ 5º d	0			RMR	+ 4º d	+	+	R.I.Hd.
Magda	0-11	Bronquitis	+3	RMR	+ 6º d	+	+	RMC	+ 4º d	+			RMC	+ 3º d	+	R.I.H.	

A.C.P. = Acción citopática.

H. = Hemaglutinación.

Hd. = Hemadsorción.

R.I.H. = Reacción de inhibición de la hemaglutinación.

R.I.Hd. = Reacción de inhibición de la hemadsorción.

RMR = Riñón de mono Rhesus.

RMC = Riñón de Mono Cynomolgus.

continua (Am-57); el primer pase había sido realizado sobre KB (tabla núm. 3).

La A.C.P. fue muy evidente en todos los casos, ya en el primer pase en los dos aislamientos sobre células de riñón de mono, y en el 2.º pase en el virus aislado sobre células en línea continua.

El fenómeno de la hemaglutinación con hematíes de cobayo se puso de manifiesto en el 2.º pase sobre células primarias a títulos suficientes para permitir la identificación por la R.I.H., que practicamos con sueros antiespecíficos de virus parainfluenza tipos 1, 2, 3 y virus SV5. El virus aislado por inoculación de células en líneas continuas no demostró capacidad hemaglutinante durante su crecimiento, en dichas células, pero mostró en su primer pase sobre riñón de mono, un fenómeno de hemadsorción suficientemente intenso para permitir la identifica-

ción mediante la R.I.Hd. La hemaglutinina se demostró también en este pase aunque a bajo título.

Los tres virus aislados se identificaron como virus parainfluenza tipo 3.

Serología. — La R.F.C.' (tabla número 4) permitió el diagnóstico de infección por virus parainfluenza en 10 de los 14 casos estudiados (71,4 %). La respuesta en anticuerpos se produjo sólo frente al antígeno de virus parainfluenza tipo 3, excepto en un caso (precisamente con virus aislado) que demostró una respuesta simultánea, aunque mucho menor, frente al tipo 1.

El diagnóstico serológico se obtuvo por la demostración de un aumento significativo del título de anticuerpos en 9 casos (64,2 %) y por la existencia de títulos significativos en un caso (7,2 %). De los 4 casos en que la R.F.C.' no permitió el diagnóstico, 3 tenían anticuerpos, si bien a títulos bajos.

TABLA N.º 4
DIAGNOSTICO SEROLOGICO

Núm. de casos estudiados	Reacción de fijación del complemento Virus parainfluenza tipo 3			
	Aumento significativo	Títulos significativos	Títulos no significativos	Títulos negativos
(2 o más sueros)	9 (64,2 %)	1 (7,2 %)	3 (21,4 %)	1 (7,2 %)
14	10 (71,4 %)		4 (28,6 %)	

DISCUSION

Las infecciones por virus parainfluenza son extraordinariamente fre-

cuentes en la infancia. HILLEMANN y TYRRELL,^{10, 30} recogiendo la información obtenida por numerosos autores, han precisado muchos aspectos de la

epidemiología y clínica de estas infecciones. El tipo 3, responsable en particular de broconeumonías y bronquitis, parece ser el tipo más patógeno, más difundido y el que afecta más precozmente a los niños.

En la colectividad infantil que estudiamos, el virus parainfluenza 3 se difundió en invierno (diciembre 1968-enero 1969) afectando en forma epidémica a niños menores de 1 año en general. La morbilidad entre los niños alcanzó a un 71,4 %.

En el cuadro clínico existió generalmente participación del tracto respiratorio inferior (bronquitis) y, aunque la evolución fue generalmente benigna, se estudiaron 5 casos que presentaron un síndrome bronconeumónico. Ocurrió un fallecimiento entre ellos, pero al no haberse completado el estudio serológico de dicho caso, y siendo portador de una grave malformación congénita, es aventurado atribuir la muerte a la infección por virus parainfluenza tipo 3, que debe sospecharse por las características epidemiológicas. En todo caso, es conocido que las malformaciones congénitas ensombrecen el pronóstico de las infecciones por mixovirus.

En nuestro estudio los tres virus aislados lo fueron tras la congelación del producto patológico a -50°C . Por ello, si bien es evidente que el virus parainfluenza 3 es muy frágil y es preferible la inoculación directa de los cultivos celulares, la congelación inmediata de los productos patológicos a -50°C , a diferencia de lo que ocurre con el virus R.S., se revela como

un sistema que permite el éxito del aislamiento.

Los virus parainfluenza requieren para su aislamiento el empleo de células primarias de riñón de mono, en particular los tipos 1 y 2. El tipo 3 ha sido aislado en algunas ocasiones sobre células en línea continua, a las que se adapta con facilidad tras su aislamiento.¹⁹ En nuestro trabajo aislamos dos cepas de virus parainfluenza tipo 3 sobre riñón de mono y otra sobre células KB, si bien en este caso los fenómenos de hemaglutinación y hemadsorción no se manifestaron hasta su siembra sobre riñón de mono. Si no se dispone en los momentos oportunos de células renales de mono nos parece muy recomendable la inoculación de líneas continuas, y su observación cuidadosa para detectar la aparición de acción citopática y proceder a un pase sobre riñón de mono en caso necesario.

Dos de los virus aislados se identificaron por R.I.H. Ello fue posible porque seguimos la técnica de inoculación de frascos de cultivo celular que permite la obtención de mayores cantidades de hemaglutinina. El virus restante fue identificado por R.I.Hd. como se realiza habitualmente tras el crecimiento en tubos.

En ausencia de aislamiento, el diagnóstico serológico por R.F.C.' y aun por R.I.H., presenta el inconveniente de las frecuentes reacciones heterólogas entre los tres tipos.^{4, 19} Incluso en presencia de un aumento significativo frente a los otros dos, es aventurado sentar el diagnóstico de tipo, y debe

interpretarse únicamente como infección por virus parainfluenza. Se ha demostrado, en efecto, que las infecciones por el tipo 1 frecuentemente presentan una respuesta heteróloga para el tipo 3, lo que se explica por la mayor frecuencia de la primoinfección por el tipo 3.

En los casos estudiados por nosotros, dejando el aislamiento del virus que soluciona el problema del tipo causal, la respuesta de anticuerpos FC' se presentó únicamente para el tipo 3, excepto en un caso, con virus aislado, que presentó una respuesta heteróloga a bajo título para el tipo 1.

La R.F.C.' fue diagnóstico de infección por virus parainfluenza en el 71,4 % de los casos estudiados.

RESUMEN

Se estudia un brote epidémico de

infecciones respiratorias agudas ocurrido en enero 1969, que afectó el 82,3 % de los niños albergados en tres salas de una institución de Barcelona, cuyas edades estaban comprendidas entre un mes y un año.

En una muestra de los enfermos se intentó el aislamiento del virus por siembra de frotis faríngeo sobre células primarias de riñón de mono, y se obtuvieron dos sueros para la práctica de reacciones serológicas.

Se aislaron tres cepas de virus parainfluenza tipo 3 y se diagnosticaron, mediante la reacción de fijación del complemento, un 71,4 % de los casos estudiados.

Se describen las características epidemiológicas del brote y los cuadros clínicos presentados. Se comentan los resultados del aislamiento de virus y reacciones serológicas.

BIBLIOGRAFIA

1. CHANOCK, R. M., *J. Exp. Med.*, 104, 555-74. 1955.
2. CHANOCK, R. M. y FINBERG, L., *Amer. J. Hyg.*, 66, 291-300. 1957.
3. CHANOCK, R. M., ROZMAN, B. y MYERS, R., *Amer. J. Hyg.*, 66, 281-290. 1957.
4. CHANOCK, R. M., WOYD, D. M., HUEBNER, R. J. y BELL, J. A., *Am. J. Publ. Health.*, 50, 1958. 1960.
5. EATON, M. D., MEIKLEJOHN, G. y VAN HERICK, W., *J. Exp. Med.*, 79, 649-68. 1944.
6. FRANCIS, T., *Science*, 92, 405-8. 1940.
7. FUKUMI, H., NISHIKAWA, F., SUGIYAMA, T., YAMAGUCHI, Y., NAUBA, J., MATSUURA, T. y OIKAWA, R., *Jap. J. M. Sc. and Biol.*, 12, 307. 1959.
8. GERNGROS, O. G., ZHDANOV, V. M., *Problems of Virology*, 2, 71. 1957.
9. HAYFLICK, L., MOORHEAD, P. S., *Exp. Cell. Res.*, 25, 585-621. 1961.
10. HILLEMANN, M. R., HAMPARIAN, V. V., KETLER, A., REILLY, C. M., MCLELLAND, L., CORNFELD, D. y STOKES, J., *J.A.M.A.*, 180, 445. 1952.

11. JOHNSON, K. M., CHANOCK, R. M., COOK, K. y HUEBNER, R. J., *Amer. J. Hyg.*, 71, 81-92. 1960.
12. KOLN, A., *J. Exp. Med.*, 53, 384-92, 1930.
13. LEPINE, P., *Techniques de Laboratoire en Virologie Humaine*. Masson. París. 1964.
14. MELNICK, J. L. y RIORDAN, J. I., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 81, 208: 1952:
15. MOGABGAB, W. J., PHILIPS, I. A. y PIERCE, W. E., *Bact. Proc.*, 67, 57. 1957.
16. OLITSKY, C., GATES, W. A., *J. of Bact.*, 8, 212-28. 1926.
17. PARROTH, R. H., *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 39, 629. 1963.
18. PARROTH, R. H., VARGOSKO, A. J., KIM, H. W., BELL, J. A., CHANOCK, R. M., *Amer. J. Publ. Health.*, 52, 907. 1962.
19. PEYRON, L., *Diagnostic des infections à myxovirus parainfluenza 1, 2, 3 et virus respiratoire syncytial par isolement et par reaction de fixation du complement*. Thèse pour le Doctorat de l'Université de Lyon. 1968.
20. PHILIPSON, L. y WESSLEN, T., *Arch. ges. Virus-forsch.*, 8, 76-94. 1958.
21. ROSEN, L., HOVIS, J. F., MASTROFA, F. M., BELL, J. A. y HUEBNER, R. J., *Amer. J. Hyg.*, 71, 266-74. 1960.
22. ROSEN, L., JOHNSON, J. H., HUEBNER, R. J. y BELL, J. A., *Amer. J. Hyg.*, 67, 300-10. 1958.
23. ROWE, W. P., HUEBNER, R. J., GILMORE, L. K., PARROTH, R. H. y WARD, T. G., *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.*, 84, 570-3. 1953.
24. SELTER, C. y col., *J. Exp. Med.*, 62, 63-72. 1928.
25. SMITH, W., ANDREWS, C. H. y LAIDLAW, P. P., *Lancet*, 2, 66-8. 1933.
26. SOHIER, R.: *Diagnostic des Maladies à Virus*. Flammarion. París. 1964.
27. SOHIER, R., PEILLARD, M. N., GINESTE, J. y FREYDIER, J., *Ann. Biol. Clin.*, 14, 281. 1956.
28. SUTTON, N. R. P., CHARKE, S. K. R. y TYRRELL, D. A. J., *Lancet*, 1, 359. 1959.
29. TAYLOR, R. M., *Amer. J. Publ. Health.*, 39, 171-8. 1949.
30. TYRRELL, D. A. J., *Common colds and related diseases*. Arnold. 1965.
31. VOGEL, J., SHELEKOV, A., *Science*, 126. 1957.
32. WALLIS y col., *Texas Rep. Biol. and Med.*, 19, 194. 1961.