

Artículo original – Primer puesto

DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE INFECCIONES POR VIRUS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES EN NIÑOS CON CRISIS DE ASMA

Elida Dueñas¹, Carlos Alberto Jaramillo², Eliana Correa¹, Carlos Arturo Torres-Duque¹, Diana Rojas², Mauricio Gonzalez¹, Ana María Paéz², Catherine García², Alejandra Hernández², María del Pilar Delgado²

1. Fundación Neumológica Colombiana, Bogotá D.C, Colombia

2. Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Bioinformática, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Introducción: los virus respiratorios son la causa principal de crisis de asma en niños y adultos. Nuestro objetivo fue determinar la prevalencia de infecciones por virus mediante técnicas moleculares en niños de 2-15 años con crisis de asma. **Metodología:** estudio analítico transversal que incluye análisis de datos demográficos, clínicos y de pruebas moleculares (Reacción en Cadena de Polimerasa y PCR de Transcripción Reversa), usadas para detección de virus ADN y ARN, respectivamente. Pruebas T, Chi cuadrado y Fisher sirvieron para comparar grupos con y sin virus. **Resultados:** la prevalencia de virus en la población estudiada (n=175) fue 83.4%. Su distribución fue de la siguiente manera: Rhinovirus: 71.4% (Subtipo tipo C: 47.4%, A: 20.6% y B: 3.4%); Influenza A: 27.4%, VSR: 8%, Parainfluenza (P) P1: 5.7%, P2: 0% y P3: 1.7%, Enterovirus: 1.7%. Adenovirus: 1.7%. No hubo diferencias entre los grupos en variables como sexo, índice de masa corporal y severidad de la crisis, sugiriendo que éstos por si solos no están relacionados con un incremento de la severidad de los síntomas y la necesidad de hospitalización. Debido al bajo número de detecciones de Adenovirus y Enterovirus-68 no fue posible concluir acerca de asociaciones de estos agentes con exacerbaciones severas descritas en la literatura. **Conclusiones:** la detección de virus fue frecuente en niños de 2 -15 años con crisis de asma en nuestro medio y similar a la descrita en la literatura. La prevalencia de virus en general y de Rhinovirus en particular, fue semejante a la descrita en la literatura. **Palabras Claves:** virus, técnicas de diagnóstico molecular, prevalencia, niño, estado asmático.

Recibido: 27 de junio de 2014

Aceptado: 31 de octubre de 2014

Correspondencia: eduenas@neumologica.org

DETERMINING THE PREVALENCE OF VIRAL INFECTIONS USING MOLECULAR TECHNIQUES IN CHILDREN WITH ASTHMA CRISIS

ABSTRACT

Introduction: respiratory viruses are the main cause of asthma crisis, both in children and adults. Our goal was to determine the prevalence of viral infections using molecular techniques in children aged 2-15 years with asthma crisis. **Methodology:** cross-sectional analytical trial including an analysis of demographic, clinical, and molecular tests data (polymerase chain reaction and reverse transcription PCR), used for the detection of the viral DNA and RNA, respectively. T, Chi-square and Fisher tests were used for group comparisons, with and without viruses. **Results:** the prevalence of the virus in the population studied ($n=175$) was: 83.4%. Rhinovirus; 71.4% (Subtype C: 47.4%, A: 20.6% and B: 3.4%); Influenza A: 27.4%, RSV: 8%, Parainfluenza (P) P1: 5.7%, P2: 0% and P3: 1.7%, Enterovirus: 1.7%. Adenovirus: 1.7%. There were no differences among the groups in terms of the following variables: gender, body mass index, and severity of the crisis, suggesting that these variables are not related to increased severity of the symptoms and the need for hospital admission. Due to the small number of Adenovirus and Enterovirus-68 detected, it was impossible to conclude any associations of these agents with severe exacerbations described in the literature. **Conclusions:** the virus detection was frequent in children 2 -15 years old with asthma crisis in our environment, and similar to the detection rates described in the literature. The prevalence of the virus in general and of Rhinovirus in particular, was similar to that described in the literature.

Keywords: virus, molecular diagnostic techniques, prevalence, child, status asthmaticus.

INTRODUCCIÓN

El asma es la enfermedad crónica más frecuente en la infancia (1-5). En Colombia, la prevalencia de asma en la población general es de 12.02% (11.35%, en Bogotá) y alcanza el 18.9% en la población menor de 4 años. El mayor impacto negativo del asma, sobre todo en calidad de vida y costos para el sistema de salud, deriva de las crisis de la enfermedad (1,6, 7).

Los virus respiratorios son la principal causa de las crisis de asma en niños y adultos. A pesar que hoy en día aún se desconoce si los agentes virales son capaces de inducir la patología de esta enfermedad, varios estudios han encontrado una alta prevalencia de virus respiratorios asociados con las exacerbaciones de asma (8, 9). Se ha reportado la presencia de diferentes agentes virales de acuerdo con la severidad de la crisis asmática, la edad y sexo del paciente y la época del año de acuerdo con los tipos de estudios realizados (10).

Algunos de los agentes virales encontrados en asociación con el asma aguda son: Rhinovirus humano (HRV), Enterovirus (EV), Virus Sincitial Respiratorio (RSV), Adenovirus humano (HAdV) y Bocavirus humano (HBoV) (9, 11). Las infecciones por Rhinovirus son las más frecuentes en los ataques de asma en lactantes y en niños mayores a nivel mundial (12, 13). El HBoV se ha encontrado en el 12% de los pacientes con asma aguda (10).

La evidencia actual que posiciona a los virus como desencadenantes de asma aguda en niños justifica la realización de estudios para establecer la importancia de estos agentes en niños con crisis de asma y determinar si su presencia está relacionada con una mayor severidad del cuadro clínico.

El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia de infecciones por virus mediante técnicas moleculares en niños de 2 a 15 años con crisis de asma que consultaron los servicios de urgencias y consulta prioritaria de dos instituciones de tercer nivel y establecer si existen diferencias entre los grupos en las variables severidad de la

crisis, necesidad de hospitalización, estancia hospitalaria y edad. Finalmente, se buscó establecer la estacionalidad de los diferentes virus durante este periodo de tiempo.

METODOLOGÍA

Diseño del estudio: estudio analítico de corte transversal para determinar la prevalencia de infecciones por virus en niños con crisis de asma, durante el periodo comprendido entre diciembre de 2010 y marzo de 2012. Este estudio es un subproducto de un gran estudio que incluyó además de virus, la prevalencia de *Mycoplasma pneumoniae* como causa de crisis de asma. Se incluyeron niños de 2 a 15 años con diagnóstico de asma 6 meses antes del ingreso, que consultaron por crisis de asma a los servicios de urgencias y consulta prioritaria de dos instituciones de salud de tercer nivel.

Se estableció como alta probabilidad de asma la presencia de más de uno de los siguientes síntomas: sibilancias, tos y dificultad respiratoria principalmente si estos síntomas eran frecuentes o recurrentes (mínimo 2 episodios para este estudio), si se presentaron independiente de los resfriados o en respuesta al ejercicio (14). Se definió crisis de asma como todo episodio caracterizado por un aumento progresivo de la dificultad para respirar, sensación de falta de aire, sibilancias, tos, dolor u opresión torácica, o una combinación de estos síntomas (1, 6, 15). Se clasificó el grado de severidad de la crisis según el índice pulmonar (16-18). Fueron excluidos aquellos niños que presentaban cuadros de broncoespasmo con diagnóstico diferente a asma: bronquiolitis, fibrosis quística y primer episodio sibilante en niños de 2 años.

Procedimientos

– **Aspectos éticos del estudio y anamnesis:** este estudio se ajustó a las reglas vigentes de la resolución No 8430 de 1993 y se clasificó como de riesgo mínimo. El estudio fue aprobado por los comités de ética en investigación de las instituciones participantes. Tras la obtención del consentimiento/ asentimiento informado (Anexos 1 y 2), todos los pacientes voluntarios fueron evaluados por un médico pediatra o neumólogo,

quien confirmó el diagnóstico y el grado de severidad de la crisis de asma. Una entrevista clínica y una valoración sirvieron al propósito de recolectar la información de cada paciente, la cual se incorporó en su historia clínica.

- **Recolección y transporte de especímenes:** una muestra de aspirado nasofaríngeo fue recolectada por paciente. Tras la toma, éstas fueron almacenadas a 4°C y luego se transportaron en hielo al laboratorio donde posteriormente fueron procesadas. Se utilizó 1,2 ml de PBS pH 7,4 para la resuspensión de éstas. Las muestras fueron centrifugadas a 1.900 rpm durante 10 minutos a 4°C y de ellas se tomó el sobrenadante para la extracción de ADN necesario para la realización de las pruebas moleculares.
- **Métodos moleculares:**
 - Extracción de ADN y síntesis de cADN.* ADN y ARN viral fueron extraídos con el kit Wizard DNA Clean-Up System (Promega, EE.UU.) y QIAampViral RNA Mini Kit (QIAGEN, Alemania), respectivamente. La síntesis de ADN copia (cADN) se realizó con el kit de First Strand cDNA Synthesis, (Fermentas, EE.UU.) y se almacenó a -20 C hasta su posterior procesamiento.
 - Detección molecular.* La detección de los agentes virales se realizó mediante una Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa (RT-PCR) a partir de ARN o PCR a partir de ADN viral según correspondiera. Para la detección de los virus Influenza A, B y Parainfluenza 1,2 y 3 los protocolos empleados se basaron en los descritos por Bellau-Pujol et al. 2005 (19) y modificados por Rojas et al. 2011. Se consideraron positivas todas aquellas muestras en las cuales se observó presencia del fragmento específico (para el caso del PCR del virus de la influenza A y B un fragmento de 212 y 362 pb, respectivamente, para el caso del virus de la Parainfluenza 1, 2 y 3 un fragmento de 317, 204 y 189 pb, respectivamente). Se validaron las reacciones en las que el control positivo presentó amplificación y el blanco de reacción no. Se consideraron negativas las PCR en las cuales hubo ausencia del fragmento específico. En caso de reacciones dudosas, se repitieron como primera opción, y como última opción se secuenciaron.

Se utilizaron extractos de ácidos nucleicos para detectar Picornavirus (HRV y EV), HAdV, y RSV se utilizaron protocolos específicos ya estandarizados, de PCR o RT-PCR según correspondiera; el RSV fue analizado mediante el kit de cuantificación PrimerDesign™ genesig Respiratory Sincitial Virus (todas las especies) (PrimerDesing™ Ltd., UK) que sigue un protocolo estandarizado de RT-PCR cuantitativo en tiempo real con sondas Taqman. Para distinguir entre los Enterovirus y los Rhinovirus y determinar los tipos, los productos de reacción de las muestras positivas para Picornavirus, obtenidos por RT-PCR fueron secuenciados. Este mismo procedimiento se llevó a cabo para confirmar todos los resultados positivos de PCR y RT-PCR. Así mismo, con el fin de determinar los verdaderos negativos, todas las muestras negativas fueron analizadas con el fin de detectar la presencia de inhibidores de la PCR.

- **Manejo de datos y análisis estadístico:** se utilizó el software estadístico SPSS versión 15. Para las variables continuas, se evaluó el supuesto de normalidad por la prueba de Kolmogorov Smirnov. Si se confirmó este supuesto se utilizó promedios y desviaciones estándar, de lo contrario medianas y rangos intercuartílicos. Para las variables de naturaleza cualitativa se calcularon proporciones. Para el cálculo del tamaño de la muestra se utilizó el programa Tamaño de la Muestra 1.1. Se tuvo en cuenta el censo colombiano realizado por el DANE en el año 2005, en donde se estableció que la población de Bogotá de niños de 2 a 15 años es de 1.682.569 y según estudios previos: la prevalencia de asma en niños (12%), el porcentaje de pacientes asmáticos que presentan crisis (35%). Con una precisión de 6%, un error tipo I de 5% y una hipótesis a dos colas, el tamaño de muestra obtenido fue de 171 niños. Se tomaron casos consecutivos de niños con crisis de asma de las dos instituciones.

La prevalencia se informó como una proporción con sus IC 95%. Se compararon los grupos con y sin virus. Para las diferencias de promedio se utilizó la prueba T de muestras independientes y para la de porcentajes (%) la prueba Chi cuadrado. Todos los valores de *p* eran de dos

colas y los valores menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Durante el periodo del estudio comprendido entre diciembre de 2010 y marzo de 2012, se incluyeron inicialmente 188 pacientes, de los cuales se excluyeron 13 debido a que no cumplían con los criterios de inclusión. Por esta razón, la población analizada presentó un total de 175 pacientes. Más de la mitad de los niños venían recibiendo esteroides y β 2 agonistas de acción corta inhalados.

Detección de virus. (Tabla 1) La prevalencia global de virus fue del 83.4%. Se encontró Virus Influenza A en 48 de las 175 muestras (27.4%). Para el Virus de la Influenza B no se detectó ninguna muestra positiva. Se encontró Parainfluenza 1 (PI1) en 10 muestras (5.7%), 3 muestras fueron positivas para el virus de Parainfluenza 2 (PI2) (1.7%) y ninguna para el virus de Parainfluenza 3 (PI3). De los Picornavirus, el Rhinovirus fue el agente más comúnmente detectado (125 casos; 71.4%), el tipo C fue el más frecuente (83 casos de 125 muestras positivas para Rhinovirus; 47.4%), seguido por el tipo A (36 casos; 20.6%) y por último el tipo B (6 casos; 3.4%). Los 3 casos positivos para Enterovirus (1.7%) fueron Entero-

TABLA 1. PREVALENCIA DE LOS VIRUS ANALIZADOS EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA

DETECCIÓN MOLECULAR	MUESTRAS POSITIVAS	%
Total de virus en la población estudiada	146	83,4
Picornavirus	128	73,1
Rhinovirus	125	71,4
- Enterovirus	3	1,7
Influenza A	48	27,4
Influenza B	0	0
VSR	14	8
Parainfluenza 1	10	5,7
Parainfluenza 2	0	0
Parainfluenza 3	3	1,7
Adenovirus	3	1,7

virus-68. Se detectaron 14 (8%) muestras positivas para VSR (8%) y no se encontró Bocavirus en ninguno de los pacientes. Se observó detección de más de 1 virus en 18 muestras: Parainfluenza 1 y 3: 2 (1.1%), Influenza A y Parainfluenza 1: 3 (1.7%), Adenovirus y Rhinovirus: 3 (1.7%), VSR y Rhinovirus: 10 muestras positivas (5.7%).

No hubo diferencias entre los grupos con y sin virus, en cuanto a las características demográficas, gravedad de las crisis, frecuencia de neumonía adquirida en la comunidad, necesidad de hospitalización ni en uso de antibiótico o de ciclo corto de esteroides. (Tablas 2 y 3).

TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS PACIENTES CON Y SIN VIRUS			
	No VIRUS (n=29)	VIRUS (n=146)	p
Edad, años	6,3 ± 3,1	7,3 ± 3,4	0,163
Sexo femenino	16 (55,2)	63 (43,2)	0,235
Peso (kg)	24,9 ± 13,9	27,1 ± 12,2	0,384
Talla (cm)	119,3 ± 19,4	122,9 ± 20,2	0,409
IMC	17,4 ± 3,1	17,3 ± 2,9	0,827
β2 acción corta	21 (72,4)	109 (74,7)	0,801
Anticolinérgico	2 (6,9)	5 (3,4)	0,327
Corticoide inhalado	20 (69,0)	94 (64,4)	0,636
Antileucotrieno	6 (20,7)	26 (17,8)	0,714

Valores como promedio ± DE ó n (%)

TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DE LA CRISIS			
	No VIRUS (n=29)	VIRUS (n=146)	p
Frecuencia respiratoria, rpm	30,8 ± 7,6	29,9 ± 7,8	0,547
SpO ₂ , %	88,3 ± 3,9	88,6 ± 4,3	0,765
Frecuencia Cardíaca, lpm			0,725
• <100	4 (13,8)	13 (9,0)	
• 100-200	8 (27,6)	43 (29,7)	
• >200	17 (58,6)	89 (61,4)	
Severidad de la crisis			0,969
• Leve	12 (41,4)	58 (39,7)	
• Moderada	15 (51,7)	79 (54,1)	
• Severa	2 (6,9)	9 (6,2)	
Neumonía	3 (10,3)	18 (12,3)	0,999
Hospitalización	5 (17,2)	40 (27,4)	0,253
Días de hospitalización (n=45)*	3,8 ± 1,8	3,2 ± 1,8	0,448
Antibiótico	4 (13,8)	25 (17,1)	0,790
Ciclo esteroide	21 (72,4)	122 (83,6)	0,156
Reingreso	2 (6,9)	15 (10,3)	0,742

Valores como promedio ± DE ó n (%)

*Los días de hospitalización corresponden sólo para las 45 hospitalizaciones (n=45)

Teniendo en cuenta que el virus más frecuentemente identificado como desencadenante de crisis de asma fue el Rhinovirus, se hizo un análisis tanto de las características demográficas como de las características clínicas de la crisis en los pacientes que presentaban infección por este agente sin observar diferencias entre los dos grupos.

Estacionalidad viral. El patrón estacional de Rhinovirus y Virus Sincitial Respiratorio a lo largo del periodo de recolección de muestras del estudio se presenta en la Figura 1, en la cual se observan picos de recolección que concuerdan con picos de detección de Rhinovirus en los meses de febrero de 2011 y 2012 y junio de 2011. El mayor pico de detección de RSV se presenta entre los meses de abril y mayo de 2011. En la gráfica únicamente se muestran los dos agentes de mayor detección en el estudio (Rhinovirus con el 71.4% y RSV con el 8%, respectivamente), debido a que la baja detección de los otros agentes hace imposible el análisis de su estacionalidad. Para el virus Influenza A se observaron dos picos de alta circulación, uno entre los meses de mayo y junio de 2011 y otro en febrero de 2011 y de 2012. (Figura 2).

DISCUSIÓN

Este estudio describe la prevalencia de infección por virus en niños de 2 a 15 años con crisis de asma. La prevalencia de 83.4% de virus en este grupo de pacientes es semejante a lo descrito en la literatura, en la cual del 32% al 85% de los niños con crisis de asma se les detectó infección respiratoria viral mediante PCR (12,20,21). La mayor frecuencia encontrada en el grupo de Rhinovirus de 71% y en especial del Rhinovirus tipo C de un 47% confirma lo encontrado en otras poblaciones donde se ha detectado una prevalencia del 50% a 60%. Lo anterior apoya la hipótesis actual del papel significativo de este último tipo en las enfermedades alérgicas y en el asma en particular (20,22-25). Es posible que la variación en estos valores de prevalencia se deba principalmente a diferencias en las poblaciones analizadas, las cuales pueden diferenciarse en cuanto a la edad de los pacientes y a las características clínicas que presentan.

Hay evidencia que soporta la interacción entre virus y asma, y existe un interés adicional en si los virus y las bacterias atípicas interactúan para provocar exacerbacio-

FIGURA 1. Frecuencia de recolección de muestras y detección viral de Rhinovirus y Virus Sincitial Respiratorio por mes

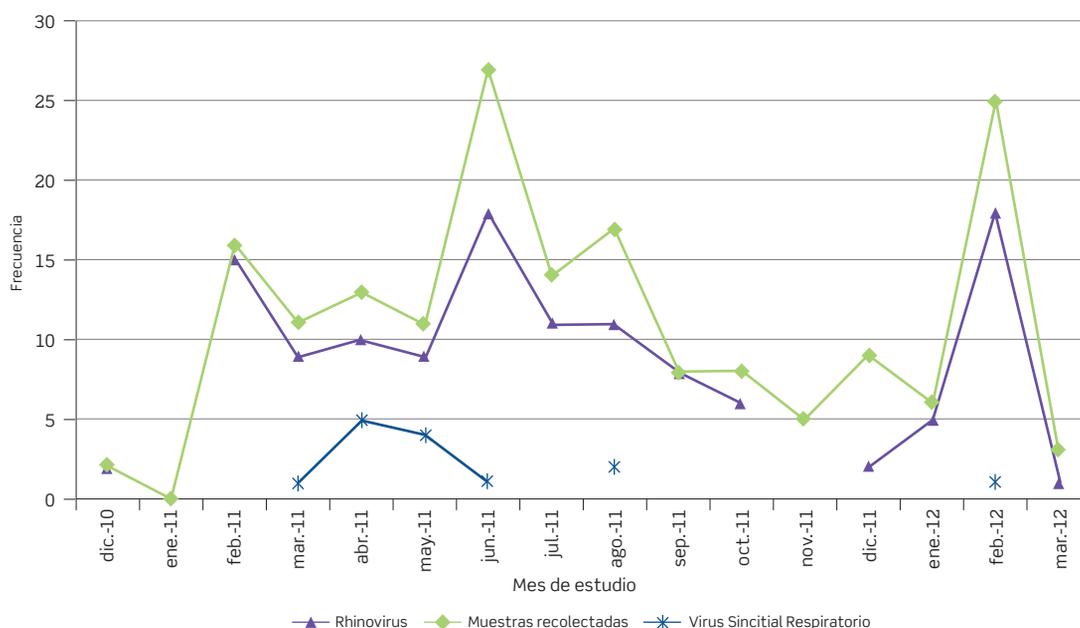
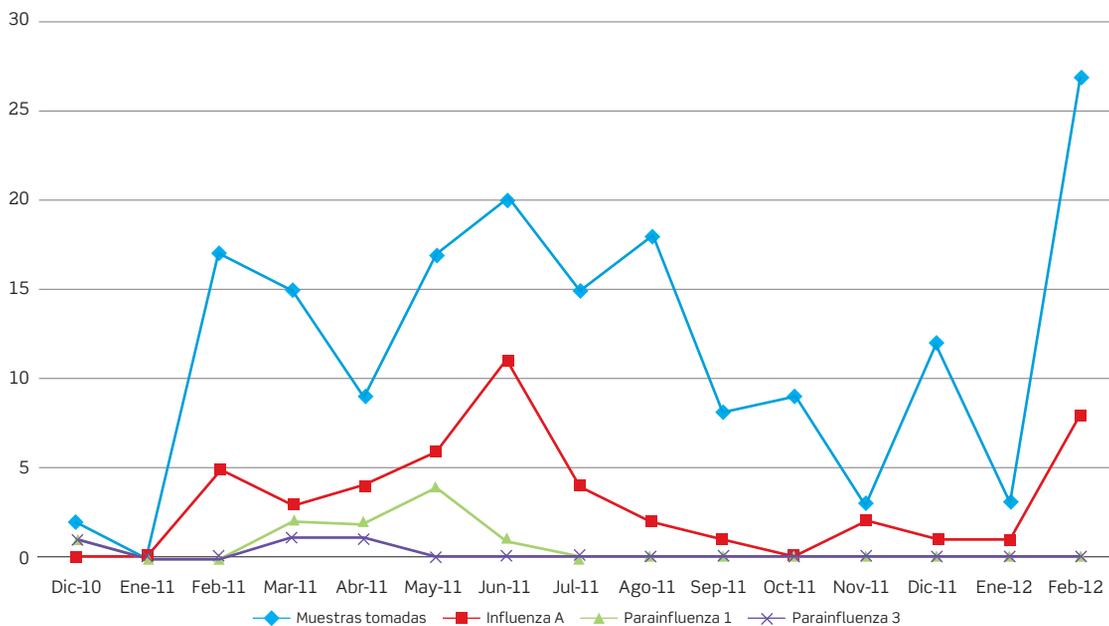


FIGURA 2. Frecuencia de recolección de muestras y detección viral de Influenza y Parainfluenza por mes



nes. Las infecciones virales del tracto respiratorio preceden frecuentemente a las infecciones bacterianas tanto en sujetos sanos como en aquellos con enfermedad pulmonar crónica (26). Oliver y colaboradores identificaron un daño en las defensas antibacterianas del hospedero en los macrófagos alveolares inducido por virus, sugiriendo que estas infecciones podrían facilitar la infección bacteriana adicional (27).

No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre sexo, índice de masa corporal y severidad de la crisis de asma con la presencia de agentes virales, sugiriendo que éstos no parecen estar relacionados con un incremento de la severidad de los síntomas y la necesidad de hospitalización, lo cual es semejante a lo encontrado en otros estudios; excepto, para el Adenovirus y Enterovirus-68, en los cuales existe una relación entre el aumento de la severidad de la crisis y la presencia de estos virus (28). En nuestro estudio los tres pacientes que tuvieron Enterovirus-68 fueron hospitalizados; sin embargo, por el número bajo de pacientes no es posible establecer conclusiones definitivas.

La estacionalidad de los virus, excepto para el virus de Influenza, es semejante a la encontrada en la ciudad de Bogotá en estudios anteriores (29).

CONCLUSIONES

El presente estudio constituye un primer acercamiento a la situación epidemiológica de los virus como causa de crisis de asma en nuestro medio y establece un patrón de estacionalidad que puede ser muy importante para la organización de los servicios de salud ante la presencia de dichos picos respiratorios.

Durante el período de tiempo del estudio se observó una prevalencia elevada de virus como desencadenante de crisis de asma en niños.

En la población estudiada, el Rhinovirus fue el agente viral más frecuentemente detectado. Podría existir alguna asociación entre severidad de la crisis y presencia de Enterovirus.

La presencia de una probable estacionalidad invita a la realización de estudios epidemiológicos continuos y

a largo plazo en los que se pueda determinar con mayor claridad los ciclos epidémicos de cada uno de los virus analizados.

Se encontró un alto porcentaje de muestras analizables, lo que junto con la sensibilidad, especificidad y rapidez, hacen a la PCR una herramienta diagnóstica que apropiadamente estandarizada, es altamente efectiva para ser usada de rutina.

Las implicaciones clínicas de esta investigación están por definirse y se deben hacer estudios que establezcan factores de riesgo y características de presentación que predigan la presencia de cada uno de los diferentes virus en especial el Rhinovirus tipo C, de los Adenovirus y de los Enterovirus, algunos de los cuales podrían asociarse con la presentación de casos severos.

FUENTES DE FINANCIACIÓN

Esta investigación fue financiada parcialmente por COLCIENCIAS.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores manifiestan que no existe ningún conflicto de interés.

AGRADECIMIENTOS

A todos los pediatras, médicos generales y enfermeras del servicio de urgencias de las instituciones participantes, a la coordinadora de neumología pediátrica y consulta prioritaria y a los médicos rurales por su apoyo en el proceso de recolección de pacientes.

REFERENCIAS

1. GINA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. NIH Publication: 2011.
2. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2008 Jan;31(1):143-78. PubMed PMID: 18166595. Epub 2008/01/02. eng.
3. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006 Aug 26;368(9537):733-43. PubMed PMID: 16935684. Epub 2006/08/29. eng.
4. Dennis R, Caraballo L, García E, Caballero A, Aristizabal G, Córdoba H, et al. Asthma and other allergic conditions in Colombia: a study in 6 cities. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2004 Dec;93(6):568-74. PubMed PMID: 15609767. Epub 2004/12/22. eng.
5. Dennis R, Caraballo L, García E, Rojas MX, Rondón MA, Pérez A, et al. Prevalence of asthma and other allergic conditions in Colombia 2009-2010: a cross-sectional study. *BMC pulmonary medicine*. 2012 May 2;12(1):17. PubMed PMID: 22551171. Epub 2012/05/04. Eng.
6. GINA. Global Strategy for Diagnosis and Management of asthma in children 5 years and younger. 2011.
7. Dougherty RH, Fahy JV. Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009 Feb;39(2):193-202. PubMed PMID: 19187331. Pubmed Central PMCID: 2730743. Epub 2009/02/04. eng.
8. Carroll KN, Hartert TV. The impact of respiratory viral infection on wheezing illnesses and asthma exacerbations. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2008 Aug;28(3):539-61, viii. PubMed PMID: 18572106. Pubmed Central PMCID: PMC2504766. Epub 2008/06/24. eng.
9. Busse WW, Lemanske RF, Jr., Gern JE. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *Lancet*. 2010 Sep 4;376(9743):826-34. PubMed PMID: 20816549. Pubmed Central PMCID: PMC2972660. Epub 2010/09/08. eng.

10. Murray CS, Poletti G, Kebabze T, Morris J, Woodcock A, Johnston SL, et al. Study of modifiable risk factors for asthma exacerbations: virus infection and allergen exposure increase the risk of asthma hospital admissions in children. *Thorax*. 2006 May;61(5):376-82. PubMed PMID: 16384881. Pubmed Central PMCID: PMC2111190. Epub 2005/12/31. eng.
11. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ (Clinical research ed)*. 1993 Oct 16;307(6910):982-6. PubMed PMID: 8241910. Pubmed Central PMCID: PMC1679193. Epub 1993/10/16. eng.
12. Khetsuriani N, Kazerouni NN, Erdman DD, Lu X, Redd SC, Anderson LJ, et al. Prevalence of viral respiratory tract infections in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Feb;119(2):314-21. PubMed PMID: 17140648. Epub 2006/12/05. eng.
13. Maffey AF, Barrero PR, Venialgo C, Fernandez F, Fuse VA, Saia M, et al. Viruses and atypical bacteria associated with asthma exacerbations in hospitalized children. *Pediatric pulmonology*. 2010 Jun;45(6):619-25. PubMed PMID: 20503289. Epub 2010/05/27. eng.
14. British Thoracic Society., Scottish Intercollegiate Guidelines Network. British guideline on the management of asthma : a national clinical guideline. Edinburgh, Scotland: SIGN; 2008. 121 leaves p.
15. Dueñas-Meza E. Crisis de asma en niños. En: García E CL, editores. Asma. Bogotá: Editorial Médica Panamericana; 2005. p. 473-92. Crisis de asma en niños. In: García E CL, editores, editor. Asma. Bogota: Editorial Médica Panamericana; 2005. p. 473-92.
16. Birken CS, Parkin PC, Macarthur C. Asthma severity scores for preschoolers displayed weaknesses in reliability, validity, and responsiveness. *Journal of clinical epidemiology*. 2004 Nov;57(11):1177-81. PubMed PMID: 15567635. Epub 2004/11/30. eng.
17. Ducharme FM, Chalut D, Plotnick L, Savdie C, Kudirka D, Zhang X, et al. The Pediatric Respiratory Assessment Measure: a valid clinical score for assessing acute asthma severity from toddlers to teenagers. *The Journal of pediatrics*. 2008 Apr;152(4):476-80, 80 e1. PubMed PMID: 18346499. Epub 2008/03/19. eng.
18. Hsu P, Lam LT, Browne G. The pulmonary index score as a clinical assessment tool for acute childhood asthma. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2010 Dec;105(6):425-9. PubMed PMID: 21130379. Epub 2010/12/07. eng.
19. Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *Journal of Virological Methods*. 2005;126(1-2):53-63.
20. Gern JE. The ABCs of rhinoviruses, wheezing, and asthma. *Journal of virology*. 2010 Aug;84(15):7418-26. PubMed PMID: 20375160. Pubmed Central PMCID: 2897627. Epub 2010/04/09. eng.
21. Lee SL, Chiu SS, Malik PJ, Chan KH, Wong HS, Lau YL. Is respiratory viral infection really an important trigger of asthma exacerbations in children? *European journal of pediatrics*. 2011 Oct;170(10):1317-24. PubMed PMID: 21448631. Pubmed Central PMCID: PMC3175036. Epub 2011/03/31. eng.
22. Johnston NW, Johnston SL, Duncan JM, Greene JM, Kebabze T, Keith PK, et al. The September epidemic of asthma exacerbations in children: a search for etiology. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jan;115(1):132-8. PubMed PMID: 15637559. Epub 2005/01/08. eng.
23. Gern JE, Busse WW. Association of rhinovirus infections with asthma. *Clinical microbiology reviews*. 1999 Jan;12(1):9-18. PubMed PMID: 9880472. Pubmed Central PMCID: 88904. Epub 1999/01/09. eng.
24. Miller EK, Edwards KM, Weinberg GA, Iwane MK, Griffin MR, Hall CB, et al. A novel group of rhinoviruses is associated with asthma hospitalizations. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jan;123(1):98-104 e1. PubMed PMID: 19027147. Epub 2008/11/26. eng.
25. Khetsuriani N, Lu X, Teague WG, Kazerouni N, Anderson LJ, Erdman DD. Novel human rhinoviruses and exacerbation of asthma in children. *Emerging infectious diseases*. 2008 Nov;14(11):1793-6. PubMed PMID: 18976575. Pubmed Central PMCID: 2630738. Epub 2008/11/04. eng.
26. Jackson DJ, Sykes A, Mallia P, Johnston SL. Asthma exacerbations: origin, effect, and prevention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;128(6):1165-74.
27. Oliver BG, Lim S, Wark P, Laza-Stanca V, King N, Black JL, et al. Rhinovirus exposure impairs immune responses to bacterial products in human alveolar macrophages. *Thorax*. 2008;63(6):519-25.
28. Imamura T, Fuji N, Suzuki A, Tamaki R, Saito M, Aniceto R, et al. Enterovirus 68 among children with severe acute respiratory infection, the Philippines. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(8).
29. Ucrós S, Dueñas E, Gutiérrez M. Calendario y variación estacional de las afecciones respiratorias en Santa Fe de Bogotá. *Rev colomb neumol*. 1997;9(3):124-32.