

138  
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO DEL VIRUS SINCITAL  
RESPIRATORIO DE NIÑOS  
HOSPITALIZADOS CON INFECCIONES  
RESPIRATORIAS AGUDAS

TRABAJO CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A N :  
SARMIENTO SILVA ROSA ELENA  
TIRADO MENDOZA ROCIO GABRIELA

México, D. F.

1990



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	pág 3
CAPITULO I .....	pág 4
INTRODUCCION	
CAPITULO II .....	pág 14
RESPUESTA INMUNE ANTE LA INFECCION VIRAL	
CAPITULO III .....	pág 17
CONFIRMACION DE LA PRESENCIA DEL FSV	
MATERIAL Y METODOS .....	pág 28
RESULTADOS .....	pág 39
DISCUSION .....	pág 64
CONCLUSIONES .....	pág 66
RESUMEN .....	pág 67
APENDICE .....	pág 68
BIBLIOGRAFIA .....	pág 70

#### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

- Confirmar la presencia de RSV en muestras nasofaríngeas de niños hospitalizados con infección respiratoria aguda.
- Evaluar la eficiencia en la determinación del agente viral por aislamiento en células Hep 2 vs. ABBOTT RSV EIA

## CAPITULO I INTRODUCCION.

Los virus respiratorios son probablemente el agente causal más importante de infecciones respiratorias. Las cuales se presentan en todas las edades sin distinción de sexo, aunque son más frecuentes y causan mayor problema en los grupos extremos de menores de 5 y mayores de 64 años. (34)

En promedio un adulto de cada 3 y dos niños de cada 7 presentan enfermedades respiratorias cada año. En los adultos los virus son la causa de enfermedades del tracto respiratorio superior con baja morbilidad y una tasa baja de mortalidad. (1,33,39)

En los niños los virus respiratorios son la principal causa de enfermedades del tracto respiratorio inferior y han sido asociados mundialmente con una tasa significativa de morbilidad, hospitalización y muerte. (1)

No hay relación específica entre el cuadro clínico y el agente etiológico; la gravedad de la enfermedad depende de la localización y de la extensión de las lesiones; en la etiología predominan los virus hasta en un 95% de los casos del tracto respiratorio superior y en menor magnitud, en el tracto inferior. Los casos graves frecuentemente son por complicación bacteriana agregada a una infección de origen viral. (34)

Las infecciones de las vías respiratorias presentan en México la más alta incidencia de morbilidad entre las enfermedades infecciosas transmisibles y son la causa de mortalidad más alta en niños de 0-12 meses; como puede observarse en las tablas y gráficas 1 y 2.

Los agentes causales de infecciones respiratorias agudas más frecuentemente reportados en México son: Adenovirus, Parainfluenza tipo A, tipo B, RSV, S. pneumoniae, H. influenza, K. pneumoniae, S. aureus S. pyogenes. (34,33)

En los países en los que se han realizado estudios epidemiológicos del agente causal de infecciones respiratorias, el mayor número de bronquiolitis y neumonías severas que requieren hospitalización de infantes menores de 2 meses tienen como agente etiológico al virus sincitial respiratorio. A nivel mundial se considera al RSV como agente causal más importante de las infecciones nosocomiales de las vías respiratorias en los patellones infantiles. (7,11)

Actualmente se dispone de antivirales específicos (Ribavirina) contra RSV, por lo que el diagnóstico oportuno permite prescribir el tratamiento adecuado, así como tomar medidas preventivas contra infecciones nosocomiales.

Definición de Infección Respiratoria Aguda.

La infección respiratoria aguda se define como:

- 1.- Escorrimiento nasal (con o sin obstrucción nasal).
- 2.- Dolor de oído o secreción purulenta.
- 3.- Enrojecimiento de garganta (con o sin placas purulentas).
- 4.- Fiebre.
- 5.- Tos (productiva o no productiva).
- 6.- Disnea.

De acuerdo a la severidad y pronóstico del cuadro clínico, las infecciones respiratorias agudas se clasifican en:

- 1.- Leves
- 2.- Moderadas
- 3.- Graves

(34,35)

Infección Respiratoria por RSV.

El Virus Sincitial Respiratorio es el agente etiológico más importante de enfermedades en el tracto respiratorio inferior (neumonía y bronquiolitis) en niños menores de dos años. (1, 12)

Generalidades del Virus.

El RSV pertenece a la familia Paramixoviridae. Es clasificado en el

género Pneumovirus y tiene como único huésped natural al hombre.

Es un virus envuelto con un diámetro de 90-130 nm. Su genoma está compuesto de RNA de una sola cadena no segmentada en una nucleocápside helicoidal. Está constituido por 7 polipéptidos: 3 de nucleocápside: VP1, VP2 (fosforilada) y L; y 4 de envoltura: 2 glicoproteínas G (90 KD) y F (70 KD), y 2 proteínas no glicosiladas: proteína matriz (VPM 28 KD) y la otra de un peso de 24 a 25 KD y carece de hemaglutinina. Es un virus lábil y su título decae rápidamente. (1, 21, 27, 29, 31, 32, 41, 47)

#### Ciclo de Replicación viral.

##### Fase de Penetración.

El RSV entran en la célula por fusión con la membrana con la consecuente liberación de sus nucleocápsides en el citoplasma. La notable capacidad de las envolturas de estos virus para fusionarse con la membrana celular, es una función de una de las dos espículas glicoproteicas aquella formada por la proteína F.

La adsorción, penetración y desnudamiento dan como resultado la pérdida de la infectividad lo cual se denomina periodo de eclipse.

##### Fase de Replicación.

Esta fase se lleva a cabo en el núcleo. La remoción de la envoltura activa la PNA polimerasa en la nucleocápside, la cual transcribe el RNA



de cadena negativa en RNA de cadena positiva de dos tipos usando mecanismos diferentes:

El primero consiste en la transcripción de cadenas negativas en cadenas positivas, las cuales sirven a su vez como modelos para la síntesis de numerosas cadenas hijas negativas en donde se requiere la síntesis de novo de proteínas virales.

El segundo mecanismo comprende la transcripción del RNA de cadena negativa en moléculas de RNA de cadena positiva que pueden servir como RNA mensajero a través del cual se expresa el propio genoma del virus.

#### Fase de Salida.

El RSV, virus envuelto, codifica dos tipos de proteínas estructurales, proteínas de la nucleocápside y proteínas de envoltura. Las proteínas de la nucleocápside son ensambladas en el citoplasma (solo los Orthomyxovirus son ensamblados en el núcleo), donde a menudo pueden verse en gran cantidad. Las proteínas de envoltura siguen una vía diferente. La glucoproteína es sintetizada en los ribosomas, como otras proteínas que deben atravesar membranas poseen secuencias líderes hidrófobas de 15 a 20 AA de longitud en sus extremos amino terminales, a medida que son sintetizadas las glucoproteínas también son glicosiladas. Mientras ocurre la glicosilación, las glucoproteínas son transportadas a través del sistema de la membrana celular hacia "poros" en la membrana plasmática, membranas que cubren las vacuolas.

Intracitoplásmicas; donde habitualmente reemplazan totalmente a proteínas de membrana específicas del huésped. Posteriormente las nucleocápsides migran hacia las áreas modificadas que reconocen con gran especificidad, se alinean y emergen a través de ellas, quedando recubiertas por estas durante el proceso. (13)

#### Aspectos Clínicos y Epidemiológicos.

El RSV es transmitido por propagación directa persona-persona y/o por aerosoles y fomites. (1)

Los aspectos clínicos de la infección por RSV particularmente en adultos, son indistinguibles de muchas otras infecciones virales del tracto respiratorio. Los signos y síntomas son compatibles con infecciones de la mucosa del tracto respiratorio superior (15). La sintomatología clínica manifestada por los adultos corresponde en un principio de la infección a congestión nasal, tos no productiva (en la cual no existe expectoración), fiebre, dolor de garganta y ronquido. El RSV causa enfermedad respiratoria significativa en adultos normales y en los ancianos son ocasionalmente fatales (19). Sin embargo en niños, particularmente en lactantes y menores de dos años, estos virus pueden causar bronquiolitis, bronconeumonía así como una enfermedad leve del tracto respiratorio superior. El RSV ha sido raramente asociado con

GROUP. Los síntomas aparecen alrededor del cuarto a quinto día postinfección; el RVB está presente en el tracto respiratorio superior por un periodo corto después de los síntomas (3-5 días en niños pequeños), se puede aislar del tracto respiratorio por un periodo largo (7-10 días). (13)

El papel que juega la respuesta inmune del huésped en la enfermedad no es claro. El RVB es el único virus que causa serias enfermedades en lactantes y niños menores de dos años, a pesar de la presencia de anticuerpos maternos circulantes. En adultos o niños a edad escolar, el suero con anticuerpos neutralizantes no es preventivo pero aminora la enfermedad. Los niveles significativos de anticuerpos son frecuentemente encontrados en el suero de fase aguda de personas infectadas y hasta cuatro años después. Estudios en adultos voluntarios han demostrado que la infección con RVB puede ocurrir en presencia de anticuerpos neutralizantes. (8)

#### Sintomatología Clínica.

El virus entra en contacto con la superficie mucosa de la nasofaringe y se produce la replicación viral. La inmunofluorescencia (IF) de secreciones nasales proporciona evidencias de que las células epiteliales y macrófagos contienen antígeno y por ende son sitios de

La infección normalmente se limita a la vías respiratorias y en general sólo se aísla virus de tejidos y secreciones respiratorias. El periodo de incubación habitualmente es de 1-4 días. (18,30)

El cuadro clínico generado por una infección dada por sincitial respiratorio se caracteriza en su inicio por flujo nasal, tos, falta de apetito debido a la inflamación local generando dolor al ingerir alimentos, esputo y prostración.

En la segunda fase de la infección el paciente manifiesta disnea, cianosis, e hiperventilación (50-100 respiraciones por minuto), y fiebre.

Los signos clínicos que caracterizan a la tercera fase de la infección son: jadeo (respiración difícil, ruidosa y anhelante), hiperfonesis y descenso del diafragma, lo cual ocasiona que la expiración se dificulte generando acumulación de  $CO_2$  en los pulmones, esto aparece como consecuencia de la presencia del virus en los bronquiolos.

Tanto la bronquiolitis como la neumonía generan un cuadro clínico como el descrito; es posible diferenciar estos padecimientos a través de una placa torácica la cual nos revela que en la bronquiolitis no hay presencia de infiltrados, mientras que en la neumonía existe estridor a

infiltrados celulares, ambos padecimientos, incluyendo al asma son considerados como parámetros característicos de infección respiratoria por RSV.

A partir de un estudio patológico de pacientes con infección respiratoria por RSV se desprenden los siguientes puntos a considerar:

- a) Bronquitis purulenta.
- b) Neumonía hemorrágica.
- c) Citología.

Necrosis y obstrucción del epitelio bronquial.

Infiltración celular peribronquial (células mononucleares).

Inclusión intracitoplásmica en células epiteliales.

Las muertes debidas a RSV han sido reportadas solamente en infantes con neumonía o bronquiolitis.

Un aspecto importante de considerar con respecto a la infección de vías respiratorias por RSV es el que se refiere a la frecuencia y severidad con que éste agente se presenta causando brotes nosocomiales.

La alta frecuencia de contagio se debe a diferentes factores como son: tiempo de hospitalización, edad de los niños, personal enfermo y portador sano) y como fuente principal aquellos niños con infección debida a RSV los cuales expulsan grandes cantidades de partículas virales por periodos prolongados ocasionando una alta transmisión del virus a niños hospitalizados por causas de enfermedades respiratorias no

debidas a REV y otros padecimientos no relacionados.

Existe una alta morbilidad asociada con los brotes nosocomiales causados por REV, puede llegar a tener hasta consecuencias fatales en en aquellos niños con problemas congénitos cardíacos. (5,7)

## CAPITULO II.

### RESPUESTA INMUNE ANTE LA INFECCION VIRAL.

a) Inmunidad mediada por células. - Las células T citotóxicas juegan un papel primordial durante la infección de vías respiratorias por RSV (6).

La respuesta citotóxica de estas células está restringida a la expresión de las moléculas de MHC y son capaces de reconocer los diferentes serotipos de RSV; esto se debe a que existe una región relativamente invariable de la nucleoproteína del virus.

La proliferación de células T citotóxicas durante el proceso infeccioso revela que el desarrollo de un cuadro agudo severo no está asociado a una deficiencia en la respuesta inmune celular.

Es de importancia considerar que una respuesta de hipersensibilidad es considerada como un factor de riesgo durante la infección del tracto respiratorio inferior por RSV. (46,24)

Se ha señalado una respuesta celular ligeramente superior en bronquiolitis que en asma, lo cual no se contraponen a otros estudios cuyos resultados reflejan una mayor respuesta celular en bronquiolitis y neumonía. La respuesta celular en infantes es debida a la sensibilización fetal de linfocitos por RSV o a la transferencia transplacentaria de mediadores solubles de CHI (Inmunidad mediada por células). (42)

b) Interferón.- Niños menores de 6 meses con padecimientos en vías respiratorias inferiores causadas por RSV, producen una pequeña o nula cantidad de Interferón en secreciones nasales dando como resultado la expulsión abundante y prolongada de partículas virales. Pero en aquellos infantes donde fue posible la detección de Interferón esto no disminuye la excreción del virus.

No ha sido del todo aclarada si la falta de producción de Interferón en estos pacientes se deba a factores que actúan directamente al huésped como es la edad. De lo anterior se sugiere que el Interferón no participa en el reconocimiento de RSV y esto puede estar relacionado con una falta de respuesta celular local, lo que se relaciona con los periodos prolongados de excreción del virus. (8)

c) Inmunidad mediada por anticuerpos.- Los anticuerpos para RSV en secreciones nasofaríngeas aparecen rápidamente durante la enfermedad, habitualmente en los tres primeros días. Se detecta IgG e IgM con títulos pico en los 6-15 primeros días. La IgA es la clase predominante de anticuerpos, con títulos pico 14-28 días postinfección y se mantiene a lo largo de dos meses, periodo en que las IgG e IgM disminuyen. Los niños mayores de 6 meses producen títulos más altos de IgA en respuesta a la infección primaria. La infección secundaria genera una respuesta anamnésica en las tres diferentes clases de inmunoglobulinas. (17,23,26)

Se realizó un estudio detallado de la respuesta dada por anticuerpos frente a los 7 diferentes polipéptidos que constituyen tanto la



envoltura como la nucleocápside de RSV en pacientes menores de 21 meses hospitalizados por bronquiolitis. Este estudio se realizó tanto en la fase aguda como convalescente de la enfermedad encontrando lo siguiente:

Durante la fase aguda los niños hospitalizados manifestaron principalmente una respuesta a las dos glicoproteínas G y F, VP32 de la nucleocápside y formación de anticuerpos neutralizantes.

Con respecto al título de anticuerpos neutralizantes con valores ND 50 > 100/ml no existe respuesta contra la glicoproteína G, esto se explica en función a un enmascaramiento o eliminación lenta de anticuerpos maternos circulantes.

La baja producción de anticuerpos neutralizantes en niños menores de 6 meses se debe a su pobre respuesta antigénica.

En la fase convalescente los niños responden a los mismos polipéptidos mencionados durante la fase aguda, únicamente se manifiestan diferencias claras en el título de anticuerpos anti-F y la alta producción de anticuerpos anti-VP32. En relación a la respuesta dada por los anticuerpos anti-F se manifiesta una clara disminución en el título, pero se produce la inhibición de la fusión a pesar de, este resultado nos indica que existe respuesta a la infección viral pero su respuesta a esta proteína se debe nuevamente al enmascaramiento o eliminación lenta de los anticuerpos maternos circulantes.

El incremento de anticuerpos anti-VP 32 en esta fase nos indica

únicamente que juegan un papel primordial en la inmunidad durante la infección de vías respiratorias por RSV. (32)

Más recientemente se demostró IgE específica para RSV con más frecuencia y con títulos más altos en secreciones nasofaríngeas de niños infectados con sibilancias. El grado de respuesta de IgE-RSV se correlacionó con la hipoxia y por ende con la severidad de la enfermedad; además de la presencia de histamina. (23,46)

### CAPITULO III.

#### CONFIRMACION DE LA PRESENCIA DEL RSV

##### Aislamiento del Virus.

Es posible llevar a cabo el aislamiento de RSV de aspirados y lavados nasofaríngeos, gargarismos, lavada nasal y aspirado bronquial a partir de cultivos celulares (células Hep 2, MRC-5, Vero y otros) produciendo un efecto citopático característico conocida como Sincitio. (12)

El efecto citopático causado por RSV se caracteriza porque las células adyacentes se fusionan en grandes capas de material celular de límites indistintos, núcleos múltiples e inclusiones citoplásmicas eosinofílicas. (30)

El efecto citopático es observable mediante microscopio óptico y microscopio electrónico que permiten detectar cambios en una variedad de

organelos celulares, poco después de la infección. Con frecuencia el núcleo es el primero en ser dañado, observándose picaosis, cambios en la estructura nucleolar y marginación de la cromatina. Posteriormente aparecen cambios en la membrana celular; las células gradualmente pierden su capacidad para adherirse a superficies de sostén y por ende se redondean y algunas veces desarrollan una fuerte tendencia a fusionarse entre ellas. A continuación aparecen, ya sea en el núcleo o en el citoplasma, claros focos de diseminación que en general están compuestos por material fibrilar, estos son los clásicos cuerpos de inclusión que representan los sitios de biosíntesis y morfogénesis dirigidas por el virus. Por último, en el momento en el cual la síntesis de proteínas estructurales ocurre en su máxima intensidad se observan cambios necróticos degradativos. (4,23)

Estos cambios pueden atribuirse a tres causas:

- 1.- Interferencia de la biosíntesis macromolecular de la célula huésped.
- 2.- La función de la membrana declina, probablemente porque cesa la síntesis de lípidos y proteínas de la célula huésped y porque los sitios de proteína de la membrana del huésped son reemplazados por proteínas codificadas por el virus. Poco después de la infección, la permeabilidad de la membrana se incrementa y la pérdida de la función de esta da como resultado que la concentración intracelular de iones no sea la apropiada, provoca la disminución de transporte de nutrientes esenciales hacia la célula y de productos de desecho fuera de ella.

3.- Ruptura de las membranas lisosomales con la consecuente liberación de enzimas hidrolíticas que se filtran hacia el citoplasma.

Incrementando así los efectos causados por los otros mecanismos.

El resultado neto de la necrosis celular es la liberación de virus que no emergen de la membrana celular.

Las técnicas utilizadas para el diagnóstico de RSV son las siguientes:

a) Fijación de complemento.

La fijación de complemento ocurre durante la interacción del antígeno y el anticuerpo. Por lo tanto, el consumo de complemento in vitro puede ser usado como prueba para identificar y medir anticuerpos, antígenos o ambos.

Esta prueba compleja enfoca el análisis de reactantes inmunes en una forma que no es fácil ni rápidamente comprensible.

La prueba de fijación de complemento puede considerarse como la secuencia de dos titulaciones del complemento. La primera realizada en ausencia de una muestra de suero del paciente y también en ausencia del antígeno en estudio, y la segunda en presencia de estos reactantes. La diferencia, si la hay, en la actividad del complemento entre estas dos titulaciones, refleja la cantidad de complemento "fijado" por los anticuerpos del paciente al reaccionar con su antígeno análogo. (29, 30)

b) Neutralización de la Infectividad.

La reacción entre los anticuerpos neutralizantes y los virus siguen una cinética de primer orden, que indica que una molécula de anticuerpo puede inactivar una partícula viral. Ocurre por interferencia con los sucesos iniciales del ciclo de multiplicación viral.

Existen varios mecanismos propuestos que tratan de explicar como se lleva a cabo la neutralización de las partículas virales. El primero se refiere al impedimento estérico, es poco probable que las partículas virales unidas a anticuerpos sean capaces de reaccionar con sus receptores en la superficie celular. El segundo mecanismo se relaciona con cambios en la conformación estérica de la superficie viral o del recubrimiento de los sitios receptores reales. El tercer y último mecanismo probable se relaciona con la interferencia de la fase correspondiente al desnudamiento.

La prueba de neutralización viral detecta anticuerpos que bloquean la infecciosidad de una partícula viral. De todas las reacciones que se utilizan para investigar anticuerpos producidos por virus es esta la más específica. Debido a esta especificidad, las pruebas de neutralización viral se emplean tanto para identificar presuntos agentes aislados de pacientes como para diagnosticar una enfermedad viral específica, mediante el aumento del título de anticuerpos observado en determinaciones seriadas.

Existen dos variantes en la técnica de neutralización:

- 1.- Neutralización independiente de complemento.

La neutralización de este tipo es reversible ya que los complejos virus anticuerpo pueden ser disociados, generando viriones infectantes.

## 2.- Neutralización facilitada por complemento.

El mecanismo de esta intensificación varía con el tipo de virus. En algunos casos, puede producir la disgregación de la cubierta de lipoproteína, con neutralización irreversible y pérdida de la infectividad; o bien acrecenta los cambios estéricos generados por el anticuerpo. (14,23)

## c) Inmunoquímica.

### Inmunofluorescencia.

Es una técnica muy sensible para la detección de antígenos celulares, ya sea plasmáticos, nucleares o unidos a la membrana plasmática.

La mayoría de los compuestos fluoróforos o fluorescentes son sustancias con estructura de anillo. Cuando el compuesto absorbe luz hay una excitación de electrones que oscilan en resonancia. Con la absorción de luz de menor longitud de onda, la energía se puede emitir en forma de luz de mayor longitud de onda, mediante un breve lapso entre absorción y emisión de luz. El intervalo aproximado entre absorción de energía y emisión de fluorescencia es menor de  $10^{-9}$  seg.

La sensibilidad de los métodos fluorométricos se puede ahora ajustar para la detección de concentraciones de  $10^{-12}$  molar o menores.

La inmunofluorescencia directa requiere un anticuerpo que es

conjugado con un colorante fluorescente. Las células intactas o seccionadas se incuban con los anticuerpos fluorescentes, se lavan y se examinan con un microscopio con fuente de luz UV. Las células unidas a anticuerpos son muy fluorescentes y fácilmente visibles.

La sensibilidad de la técnica puede incrementarse por medio de IF indirecta. En este caso, el colorante fluorescente se conjuga con Iq<sub>0</sub> de un suero anti-inmunoglobulina. Las células en estudio primero se incuban con anticuerpo antigeno específico, se lavan y luego se incuban con el suero anti-inmunoglobulina conjugado con la sustancia fluorescente. (23,25,40)

#### EIA.

Los ensayos inmunoenzimáticos tienen su fundamento en el marcaje de una anti-inmunoglobulina con una enzima (conjugado), generando una reacción colorida cuantificable que es el resultado de la degradación del sustrato por la enzima.

El antígeno es adsorbido en una superficie (tubos, perlas, discos, microplacas de nylon, poliestireno, polivinilo o polipropileno), y se agrega el suero de prueba. Todo anticuerpo específico se adhiere al antígeno. Luego se agrega anti-inmunoglobulina marcada con la enzima y se adhiere al complejo antígeno anticuerpo. Después de un lavado exhaustivo, el agregado del sustrato da como resultado un visible cambio de color. Si no hay ningún anticuerpo específico presente, la anti-inmunoglobulina marcada con la enzima no se adhiere al complejo y

no podrá haber hidrólisis del sustrato.

Existe una gran variedad de razones por las que se eligió un ensayo inmunoenzimático para determinar la presencia de RSV en las muestras nasofaríngeas obtenidas por aspiración en niños hospitalizados con infecciones respiratorias agudas.

Las ventajas del EIA, incluyen bajo costo, estabilidad de los reactivos, seguridad, sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y facilidad de realización; además es objetivo, automatizable y exento de legislación restrictiva. Todos estos factores constituyen el porqué de la elección del RSV EIA de ABBOTT como método de diagnóstico. (2,11,33, 40,43,44).



**TABLA 1**  
**MORBILIDAD DE INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS**  
**POR MES**  
**ESTADOS UNIDOS MEXICANOS**  
**1983 - 1986**

	1983	1984	1985	1986
Enero	504 012	496 623	752 064	735 248
Febrero	524 220	769 499	769 667	596 517
Marzo	572 322	595 574	851 569	530 316
Abril	456 766	534 721	661 546	784 952
Mayo	365 964	617 028	540 819	614 392
Junio	470 498	493 281	878 849	481 076
Julio	362 232	473 357	531 786	567 975
Agosto	462 657	539 252	692 145	381 742
Septiembre	351 553	451 814	514 599	390 104
Octubre	535 685	725 421	786 298	641 572
Noviembre	560 205	633 065	818 772	651 863
Diciembre	633 657	729 173	815 503	1 000 784

Fuente: Dirección General de Epidemiología/SS.

**MORBILIDAD POR INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS**  
**ENTIDADES FEDERATIVAS QUE OCUPARON**  
**LOS CINCO PRIMEROS LUGARES**  
**1983 - 1986**

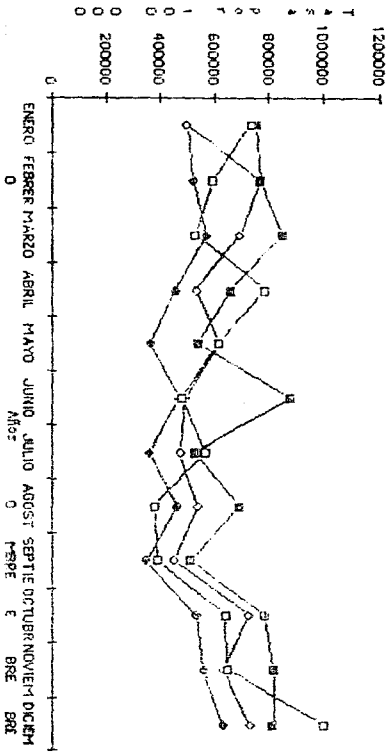
Entidades	1983		1984		1985		1986	
	C	T*	C	T*	C	T*	C	T*
Quintana Roo	41 582	14326.6	51 254	22472.6	59 520	9454.2	219 482	63344.4
Tlaxcala	50 499	826.2	53 444	9707.5	68 023	10744.2	349 003	55474.3
Baja Cal.Sur	88 177	34381.9	97 543	41487.2	119 039	42620.6	84 714	30373.9
Nuevo León	420 979	14852.8	469 401	15257.0	569 689	19196.8	807 855	25640.4
Aguascalientes	133 832	22544.9	152 205	28553.7	178 569	28362.6	155 412	24489.7

\*Tasa por 100 000 hab.

Fuente: Dirección General de Epidemiología/SS.

GRAFICA 1

PREVALENCIA DE INFECCIONES RESPIRATORIAS  
 AGUDAS POR MES  
 ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
 1983 - 1986



4- 1983  
 ○- 1984  
 ■- 1985  
 □- 1986

Fuente: Dirección General de Epidemiología/SS

TABLE 2

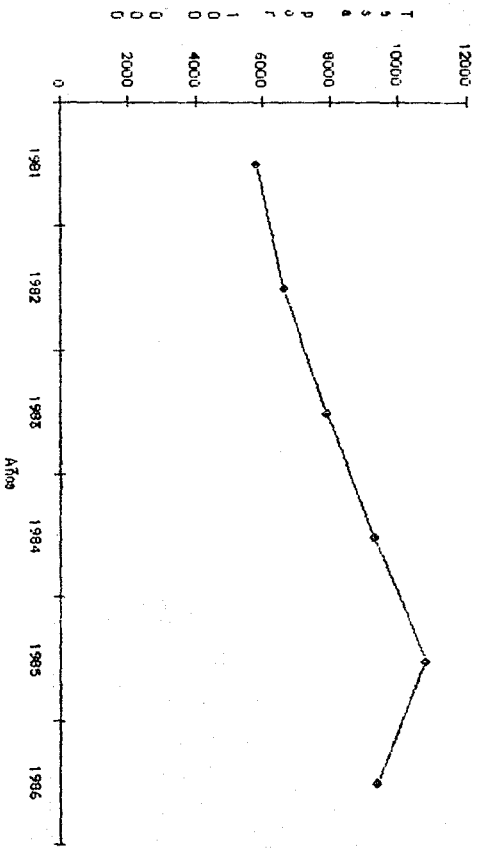
MORBILIDAD POR INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS  
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
1982 - 1986

EDAD	1982	1983	1984	1985	1986
- 1	570757	673776	746242	969321	713902
1 - 4	1125744	1466236	1791351	2100196	1784909
5 - 14	971338	1219850	15112635	1777089	1588627
15 - 44	1138400	1391641	1800337	2074687	2023377
45 - 65	291973	366975	455733	535677	480808
65 +	126316	148093	174957	221073	167747
Se ignora	497155	528018	677504	824774	795313
TOTAL	4721683	5709483	7151759	8502817	7554683

Fuente: Dirección General de Epidemiología / S. S.

GRAFICA 2

MORBILIDAD POR INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS  
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS 1981-1986



Fuente: Dirección General de  
Epidemiología, SSA

MATERIAL

Y

MÉTODOS

REACTIVOS QUIMICOS.

- Albumina sérica bovina. SIGMA Chemical Co. Cat 1989
- Antibióticos
- Estreptomina SIGMA Chemical Co. Cat S-6501 y # de L 21F-0542
- Penicilina SIGMA Chemical Co. Cat PEN-NA y # de L 121F-0542
- Carbonato de Na. J.T. Baker Cat. 790
- Cloruro de K. Merck Cat. 6404 y # de L 106570N
- Cloruro de Na. Merck Cat. 6404 y # de L 206110R
- EDTA (Etilen dinitrietetracetato disódico) J. T. Baker. Cat. 79
- Folin y Ciocalteus SIGMA Chemical Co. Cat. 1989
- Fosfato monobásico de K. J.T. Baker Cat. 790
- Fosfato dibásico de Na. anhidro ANALIT Quimica Dinámica
- Hidróxido de Na. Merck Cat. 649B y # de L 214102R
- MEM (Medio Mínimo Esencial) Gibco Lab. Cat. 630-550
- Nistatina SIGMA Chemical Co. Cat. 1989
- OPD (Orto fenilendiamina) SIGMA Chemical Co. Cat. 1989
- Sulfato de Cobre pentahidratado Merck Cat. 6404
- Sefarosa 2B Pharmacia Fine Chemical.
- Tartrato de Na y K Merck Cat. 6404
- Tripsina fresca bovine pancreas SIGMA Chemical Co. Cat. 1989

MATERIAL BIOLÓGICO.

- Muestras Clínicas.

Las muestras fueron obtenidas por aspiración nasofaríngea de niños menores de 2 años hospitalizados con infecciones respiratorias agudas, proporcionadas por el Hospital General Manuel Gea González y el Instituto Nacional de Pediatría, su procesamiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Virología Facultad de Medicina UNAM, estas muestras fueron tomadas durante el periodo invernal noviembre 1989 a febrero 1990.

Su traslado se llevó a cabo empleando el medio de transporte para rsv (ver apéndice).

Las muestras se mantuvieron a 4C durante su transporte del hospital al Laboratorio de Virología; una vez en este se conservaron a -70C hasta su procesamiento.

#### -Cultivo Celular.

Se utilizaron células Hep 2 (Carcinoma epidermoide de laringe) del Laboratorio de Virología Experimental, Facultad de Medicina UNAM; la cual originalmente fue proporcionada por el Doctor Trudel del Instituto Armand Frappie, Montreal Canadá. Esta línea celular se mantuvo con MEM adicionado de 2 ó 10 % de suero bovino fetal inactivado (SIGMA Chemical Co. Cat. 1989), 100 UI/ml de estreptomocina, 100 micro gramos por ml de penicilina, 50 micro gramos por ml de nistatina. La inactivación del suero se realizó durante una hora a 56C. Los cujos de cultivo se incubaron a 35C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>.

**-Virus Sincitial Respiratorio.**

Capa Long (ATCCUR-26 AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, ROCKVILLE, MD, USA.) donada por el Doctor Trudel del Instituto Armand Frappie. Se recibió en células Hep 2 infectadas en frascos de 25 cm<sup>2</sup> suplementado con MEM, 100 UI/ml de estreptomycin, 100 micro gramos/ml de penicilina y 50 micro gramos/ml de nistatina. Los frascos se incubaron a 37C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. La cosecha viral fue recogida cuando aproximadamente el 70 % de las células Hep 2 presentaron efecto citopático y/o del 80-100% de células desprendidas.

**\*ABBOTT RSV CIA Diagnostic KIT 50 Tests.**

El cual consiste:

- 1.- 50 esferas recubiertas con anti-RSV producido en cabra.
- 2.- Un vial (11 ml) de conjugado. Anticuerpo contra IgG de conejo producido en cabra unido a peroxidasa (de rábano). Concentración mínima de 0.5 micro gramos /ml de proteína estabilizadora y antibióticos.
- 3.- Un vial (3.5 ml) control negativo, constituido por buffer de fosfatos y antibióticos.
- 4.- Un vial (1.5 ml) control positivo, concentración mínimo de 0.01 micro gramos/ml de RSV inactivado.
- 5.- Un vial (11 ml) anticuerpo anti-RSV producido en conejo, concentración mínima de 0.1 micro gramos/ml, en proteína estabilizadora y antibióticos.
- 6.- Un vial (6 ml) buffer de dilución, constituido por amortiguador de



fosfatos, proteína estabilizadora y antibióticos.

7.- Una botella (10 tabletas) de DPD, cada tableta contiene 12.8 mg de sustrato.

8.- Una botella (55 ml) de amortiguador fosfato citrato con 0.02 de peróxido de hidrógeno.

9.- Una botella (50 ml) de ácido sulfúrico 1 N.

#### MÉTODOS.

##### 1.- DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOURY.

Se utilizaron las siguientes soluciones:

A. 1 ml de tartrato de sodio y potasio al 2%

1 ml de sulfato de cobre al 1%

50 ml de carbonato de sodio 5% en hidróxido de sodio 0.1 N

B. Folin Discaltrus diluido 1:1 en agua destilada

C. Estándar de albúmina sérica bovina 1 mg/ml

D. Se realiza una curva estándar de Albúmina.

Procedimiento:

Curva estándar.

tubo	solución estándar de albúmina (microlitros)	PBS (microlitros)
0	0	200
1	5	195
2	10	190
3	25	175
4	50	150
5	100	100

Adicionar 1 ml de solución A a cada tubo, agitar con vortex inmediatamente. Dejar los tubos 10 min a temperatura ambiente.

Adicionar 100 microlitros de la solución B a cada tubo, agitar con vortex inmediatamente. Dejar los tubos 30 min a temperatura ambiente.

Determinar la densidad óptica en un espectrofotómetro a 680 nm.

Se corren dos series de la curva estándar de albúmina por el mismo procedimiento.

La concentración de proteínas de las muestras se determina de la misma manera y el valor de densidad óptica de cada una de ellas se interpola en la curva estándar de albúmina.

#### CLARIFICACION DE RSV.

La clarificación de RSV se efectúa en una centrífuga clínica a una velocidad de 1500 rpm 15 minutos a 25C, empleando tubos de centrifuge de plástico de 10 ml estériles con tapón de rosca.

Se recoge el sobrenadante (suspensión viral) y se traslada a tubos de vidrio con tapón de rosca estériles. Mantener la suspensión viral a 4C, desechar el sedimento.

#### CONCENTRACION DE RSV POR ULTRAFILTRACION.

25 ml de suspensión viral se concentran hasta un volumen final de 1.5 ml, por ultrafiltración empleando el sistema de AMICON 8000 y una membrana XM 300 AMICON. Mantener el sistema en hielo durante la

concentración del virus evitando de esta manera que se inactive.

#### PURIFICACION DE RSV.

El RSV concentrado por ultrafiltración a un volumen de 1.5 ml se purifica por columna de Sepharosa 2B con una altura de 20 cm y 3 cm de ancho, el buffer utilizado para la elución fue NTE, se colectaron fracciones de 3 ml cada 3 minutos determinando a cada una de ellas la concentración de proteínas a 280 nm en un espectrofotómetro DU-6 Beckman.

#### TITULACION DE RSV.

Preparar placas de 24 pozos de fondo plano estériles, con células Hep 2 (100,000 células/pozo contadas en cámara de Neubauer) e incubar a 37C en atmósfera húmeda y 5% de dióxido de carbono hasta tener una monocapa semiconfluyente.

Hacer diluciones de la suspensión viral en MEM y en base 10.

Lavar 3 veces las células con PBS estéril evitando que se sequen.

Tomar 200 microlitros de la suspensión viral original (virus concentrado) e infectar la células Hep 2 semiconfluentes en cuatro pozos diferentes distribuidas en forma horizontal. El procedimiento anterior se repite de igual manera para cada una de las diluciones de la suspensión viral.

En cada una de las placas, dos de los pozos con células Hep 2 semiconfluentes corresponden a los controles negativo y positivo. En el pri

mero únicamente tenemos células Hep 2 con MEM, antibióticos y histidina y; en el segundo una cantidad equivalente (200 microlitros) del virus de referencia, en este caso RSV cepa Long, producido en el Laboratorio de Virología Experimental Facultad de Medicina UNAM, que fue proporcionado originalmente por el Dr. Toudel.

Incubar 1 hora a 37C en atmósfera húmeda y 5% de dióxido de carbono. Al término de este tiempo completar a un volumen final de 500 microlitros con MEM.

Se deja incubando bajo las condiciones mencionadas anteriormente hasta observar ECP o células desprendidas.

La titulación se realiza 4 veces para cada dilución.

Esta titulación es de carácter cualitativo, debido a que sólo se observó efecto citopático o células desprendidas. Se lleva a cabo el conteo de placas para determinar PFU (unidades formadoras de placa). Por lo que el título está dado por la mayor dilución que presente efecto citopático.

#### AISLAMIENTO DEL VIRUS SINCIETIAL RESPIRATORIO DE MUESTRAS CLÍNICAS.

El aislamiento del RSV de las muestras obtenidas por aspiración nasofaríngeas de niños hospitalizados con infecciones respiratorias agudas, se realizó de la siguiente manera:

Preparar placas de 24 pozos de fondo plano estériles, con células Hep 2 (100,000 células por pozo contadas en cámara de Neubauer) e incubar a 37C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> hasta tener una monocapa

semiconfluento.

Las muestras clínicas se centrifugaron en centrifuga EPPENDORFF durante 2 minutos.

Lavar 3 veces las células con FBS estéril evitando que se sequen.

Tomar un volumen de 200 microlitros de cada una de las muestras e infectar en forma individual cada uno de los pozos con células Hep 2 semiconfluentes.

En cada una de las placas dos de los pozos con células Hep 2 semiconfluentes corresponden a los controles negativo y positivo. En el primero únicamente tenemos células Hep 2 con MEM, antibióticos y nistatina y; en el segundo una cantidad equivalente 200 microlitros de virus de referencia preparado en el laboratorio de virología experimental facultad de Medicina UNAM.

Incubar durante una hora a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Al término de este tiempo completar a 500 microlitros con MEM, antibióticos y nistatina.

Incubar en las mismas condiciones hasta observar efecto citopático o células desprendidas.

La suspensión viral es recogida en condiciones estériles y mantenida a 4°C.

Aquellas muestras que después del primer pase resulten negativas deben volver a probarse empleando para ello la suspensión viral recogida en el pase anterior.

**DETERMINACION DEL ANTIGENO.**

**ABBOTT RSV EIA.**

La prueba se realiza de acuerdo al instructivo proporcionado por el KIT.

**Enzyme Immunoassay for the Detection of RSV in Nasopharyngeal Washes, Aspirates, and Swabs.**

**Primera Incubación.**

- 1.- Pipetear 100 microlitros del buffer de dilución en cada pozo.
- 2.- Agitar en vortex los controles y las muestras.
- 3.- Pipetear 100 microlitros de cada control (3 controles negativos seguidos de 1 positivo).
- 4.- Pipetear 100 microlitros de cada una de las muestras.
- 5.- Adicionar una esfera por pozo.
- 6.- Cubrir la placa.
- 7.- Incubar 120 min. en baño María a 37C.
- 8.- Descubrir la placa y lavar cada pozo 3 veces empleando un volumen final de 12-18 ml de agua desionizada o destilada.

**Segunda Incubación.**

- 9.- Adicionar 200 microlitros de anticuerpo anti-RSV a cada pozo.
- 10.- Cubrir la placa.
- 11.- Incubar 60 min. en baño María a 37C.
- 12.- Descubrir la placa y lavar como se mencionó anteriormente.

**Tercera Incubación.**

13.- Adicionar 200 microlitros del conjugado a cada pozo.

14.- Incubar 60 min. en baño María a 37C.

15.- Cubrir la placa.

16.- Descubrir la placa y lavar nuevamente.

**Desarrollo de Color.**

17.- Transferir inmediatamente las esferas por vertido a los tubos de ensayo.

18.- Adicionar 300 microlitros de OPD (sustrato) a cada tubo problema o incluir un tubo para el blanco.

19.- Cubrir la placa e incubar 30 min. a temperatura ambiente.

20.- Adicionar 1 ml de ácido sulfúrico 1 N a cada tubo y agitar.

21.- Determinar la densidad óptica de los controles positivo y negativo y de las muestras a 492 nm en un espectrofotómetro DU-6 Beckman.

## RESULTADOS

### I. Recolección de muestras.

Las muestras fueron obtenidas de pacientes cuyo cuadro clínico correspondía a una infección respiratoria aguda.

En la tabla 3 se indican los síntomas predominantes presentes en los pacientes seleccionados.

Se recolectaron un total de 51 muestras de las cuales 39 correspondieron al Instituto Nacional de Pediatría y 22 al Hospital General Manuel Gea González, durante el periodo invernal de noviembre 1989 a febrero de 1990.

### II. Aislamiento del virus.

Se seleccionaron células Hep 2 para llevar a cabo el aislamiento de RVFV de las muestras obtenidas por aspiración nasofaríngea.

Al término de 3 pases para cada muestra, el total de positivas por efecto citopático fue de 57.37%, de negativas 32.76% y dudosas 9.83% (ver tabla 4).

### III. Confirmación de la presencia del virus por ensayo inmunoenzimático.

Se probaron 51 muestras para la detección del antígeno por ABBOTT RSV EIA. De las cuales el 4.91% resultaron positivas, 67.2% negativas y 28.1% dudosas (ver tabla 5).

### IV. Debido a la discrepancia encontrada en los resultados obtenidos por



aislamiento en células Hep 2 y determinación del antígeno por ABBOTT RSV EIA, se probó un virus producido en el laboratorio de Virología Experimental Fac. de Medicina UNAM, para ser utilizado como control positivo, por lo que se procedió a realizar lo siguiente :

Determinación de proteínas por el método de Lowry.

RSV crudo del lab. de virología experimental	-----	0.503 mg/ml
RSV de ABBOTT lab.	-----	0.431 mg/ml
RSV concentrado y purificado por el lab. de virología experimental.	-----	0.497 mg/ml

V. Título del RSV.

RSV crudo del lab. de virología experimental	-----	11
RSV de ABBOTT lab.	-----	sin título
RSV concentrado y purificado por el lab. de virología experimental.	-----	10

TABLA 3

## SINTOMAS

PAC.	EDAD	SX	C	S	A	BN	BQ	D	N	EP	I.	E.	T.
1	12	M	+	+	-	-	-	+	+	+	13/09	27/09	13/09-89
2	07	F	-	-	-	-	-	+	+	-	27/08	13/09	30/08-89
3	10	F	+	+	-	-	+	+	+	+	01/10	10/10	03/10-89
4	05	M	+	-	-	-	-	+	+	-	05/10	10/10	06/10-89
5	03	M	-	-	-	+	+	+	-	-	10/10	15/10	13/10-89
6	03	M	-	-	-	+	+	+	-	-	12/10	15/11	14/11-89
7	04	F	-	-	+	+	+	+	-	+	23/11	26/11	23/11-89
8	05	M	-	+	-	-	+	+	+	-	25/11	29/11	27/11-89
9	10	M	+	-	-	-	+	+	-	-	02/12	06/12	04/12-89
10	01	M	-	-	-	-	-	+	+	-	11/12	15/12	15/12-89
11	08	F	-	-	-	-	-	+	+	-	17/12	24/12	20/12-89
12	05	M	-	+	-	-	+	+	-	-	12/12	24/12	13/12-89
13	07	M	-	-	-	-	+	+	-	-	19/12 (1989)	01/01 (1990)	21/12-89
14	07	F	+	-	-	-	-	+	+	-	08/12	15/12	12/12-89
15	10	M	+	-	-	-	+	+	+	-	21/11	02/12	24/11-89
16	24	M	-	-	-	-	-	+	+	-	24/11 (1989)	15/02 (1990)	15/12-89
17	72	F	+	-	-	-	-	+	-	-	27/11 (1989)	02/01 (1990)	13/12-89
18	11	F	-	-	-	-	-	+	+	-	18/11	24/12	12/12-89
19	24	M	-	+	+	-	+	+	-	-	31/01	19/02	02/02-90
20	11	F	-	-	-	-	-	-	-	-	20/02	23/02	22/02-90
21	12	M	-	-	-	-	-	+	+	-	01/02	11/02	11/02-90
22	12	F	+	+	-	+	-	+	-	-	16/01	15/01	12/01-89
23	08	M	-	-	-	-	-	+	-	-	28/11	08/12	30/11-89
24	09	M	-	-	-	-	-	+	-	-	22/12 (1989)	12/01 (1990)	23/12-89

TABLA 3

## SINTOMAS

FAC.	EDAD	SK	C	S	A	BN	BQ	D	N	EP	I.	E.	T.
25	08	F	+	+	-	-	-	+	-	-	01/01	13/01	03/01-90
26	09	F	-	-	-	-	+	-	-	-	20/02	04/03	22/02-90
27	72	M	+	+	-	-	-	+	-	-	02/01	12/01	05/01-90
28	10	F	-	+	-	-	-	+	-	-	31/01	12/02	02/01-90
29	15	F	-	-	-	-	-	+	+	-	15/01	19/01	16/01-90
30	65	F	-	-	-	+	-	+	-	-	06/01	12/01	08/01-90
31	12	F	+	-	-	+	-	+	+	-	23/01	26/01	23/01-90
32	03	M	-	+	+	+	+	+	-	-	09/01	13/01	09/01-90
33	01	M	-	-	-	-	-	-	-	-	09/01	11/01	10/01-90
34	10	M	-	-	-	+	+	+	-	+	01/02	07/02	01/02-90
35	01	M	-	-	-	+	-	+	-	-	07/02	10/02	07/02-90
36	10	M	-	-	-	+	-	+	+	-	09/02	15/02	09/02-90
37	03	M	-	-	-	+	+	+	-	-	16/02	19/02	16/02-90
38	26	F	+	-	-	+	-	+	+	-	12/02	15/02	12/02-90
39	04	M	-	-	-	+	-	+	+	-	30/01	04/02	31/01-90
40	10	F	-	-	-	-	-	-	-	-	02/02	12/02	03/02-90
41	05	M	+	+	-	-	-	+	+	-	06/02	02/03	09/02-90
42	11	M	+	-	-	-	-	-	+	-	18/02	02/03	19/02-90
43	09	F	-	-	-	-	-	+	-	-	20/02	04/03	22/02-90
44	24	M	-	-	-	-	-	+	-	-	01/02	06/02	02/02-90
45	48	F	+	-	-	-	-	+	-	-	03/02	12/02	07/02-90
46	36	M	-	-	-	-	-	+	-	-	01/03	13/03	06/03-90
47	04	M	-	-	-	-	-	+	-	-	28/02	10/03	02/03-90
48	11	F	-	-	-	-	-	-	-	-	22/02	16/03	06/03-90

TABLA 3

## SINTOMAS

PAC.	EDAD	SEX	C	S	A	BN	BQ	D	N	EP	I.	E.	T.
49	02	M	-	-	-	-	-	+	-	-	01/02	13/02	03/02-90
50	08	M	-	-	-	-	-	+	-	-	15/02	27/02	18/02-90
51	05	F	-	-	-	-	-	-	-	-	04/12	26/12	16/12-89
52	11	M	-	-	-	-	-	+	-	-	19/02	28/02	20/02-90
53	06	F	-	-	-	-	-	+	-	-	08/03	12/03	06/03-90
54	11	M	-	-	-	-	-	+	+	-	02/02	09/02	06/02-90
55	10	M	+	+	-	-	-	+	+	-	21/01	30/01	25/01-90
56	22	M	+	+	-	-	-	+	+	-	06/02	17/02	08/02-90
57	08	M	-	+	-	-	-	-	-	-	08/03	08/04	13/03-90
58	06	M	-	-	-	-	-	+	-	-	04/03	14/03	06/03-90
59	01	F	-	-	-	-	-	-	-	-	17/02	28/02	20/02-90
60	<01	M	-	-	-	-	+	-	-	-	14/02	16/03	16/12-89
61	05	M	-	-	-	-	-	+	-	-	18/03	30/03	20/03-90

SEX = SEXO

S = SIBILANCIAS

BN = BRONCONEUMONIA

C = CIANOSIS

A = ASMA

BQ = BRONQUIOLITIS

D = DISNEA

N = NEUMONIA

EP = ESPIRACION PROLONGADA

I = INGRESO

E = EGRESO

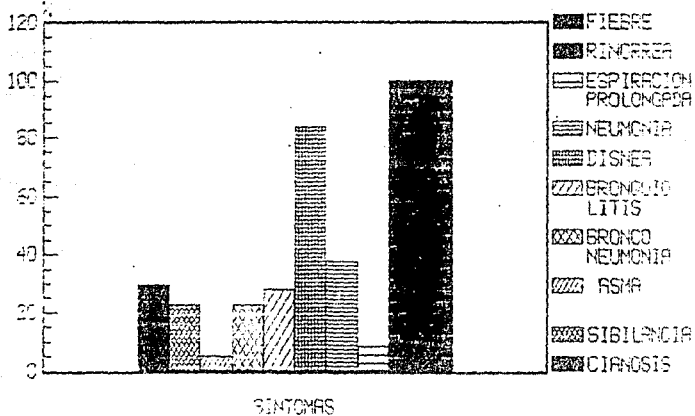
T = TOMA DE MUESTRA

SINTOMATOLOGIA PRESENTADA EN EL TOTAL  
DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS

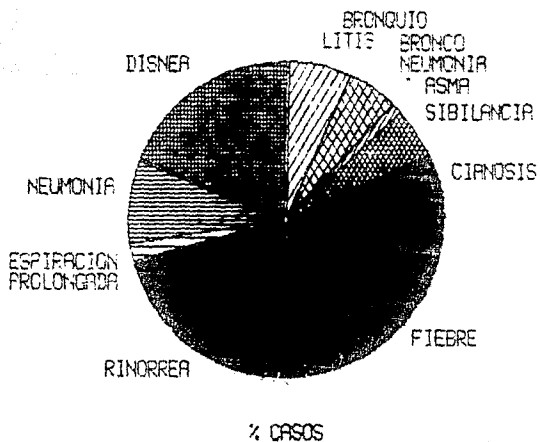
CIANOSIS	29.50%
SIBILANCIAS	22.95%
ASMA	4.91%
BRONCONEUMONIA	22.95%
BRONQUIOLITIS	27.86%
DISNEA	83.60%
NEUMONIA	37.70%
ESPIRACION PROLONGADA	8.19%
RINORREA	100.00%
FIEBRE	100.00%

TOTAL DE MUESTRAS : 61

SINTOMATOLOGIA PRESENTADA EN EL TOTAL  
DE PACIENTES ESTUDIADOS



SINTOMATOLOGIA PRESENTADA EN EL TOTAL  
DE PACIENTES ESTUDIADOS



INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

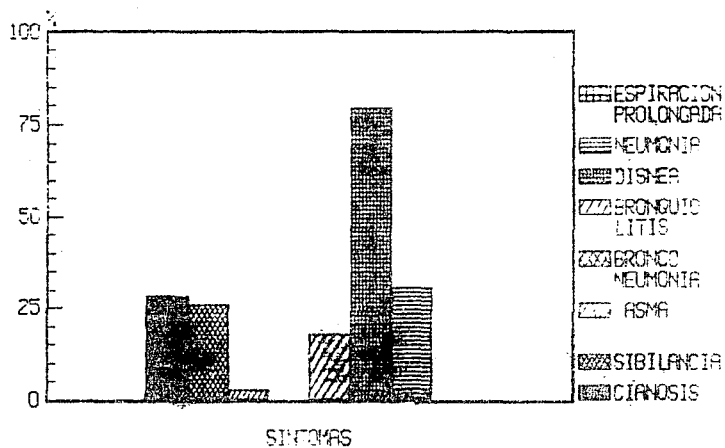
SINTOMATOLOGIA

CIANOSIS	28.20%
SIBILANCIAS	25.64%
ASMA	2.56%
BRONCONEUMONIA	0.00%
BRONQUIOLITIS	17.94%
DISNEA	79.48%
NEUMONIA	30.76%
ESPIRACION PROLONGADA	0.00%

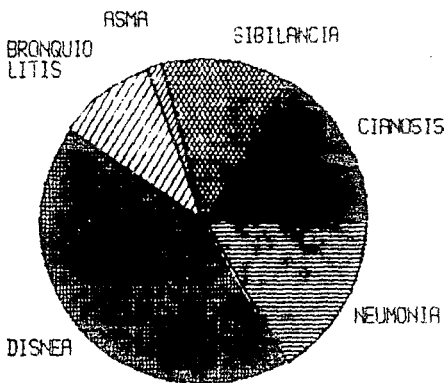
TOTAL DE MUESTRAS : 39



INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA  
SINTOMATOLOGIA



INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA  
SINTOMATOLOGIA



% CASOS

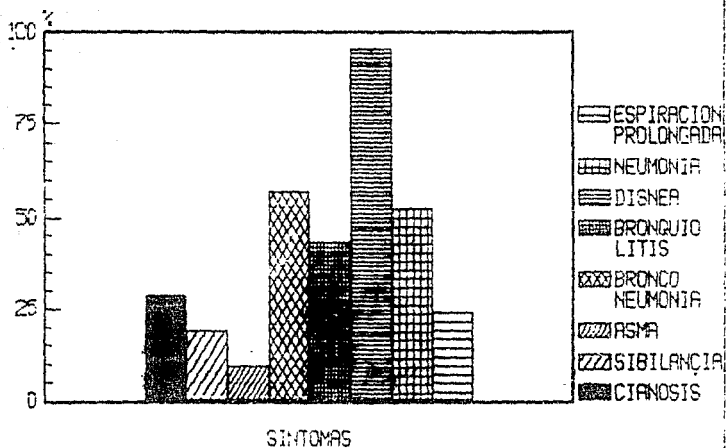
HOSPITAL GENERAL MANUEL GEA GONZALEZ

SINTOMATOLOGIA

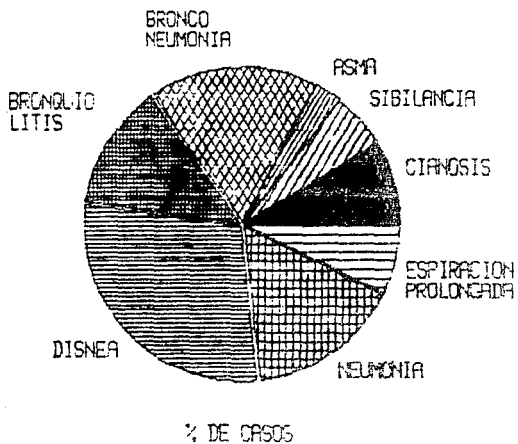
CIANOSIS	29.50%
SIBILANCIAS	19.05%
ASMA	8.02%
BRONCONEUMONIA	57.14%
BRONQUIOLITIS	35.58%
DISNEA	21.24%
NEUMONIA	29.91%
ESPIRACION PROLONGADA	25.81%

TOTAL DE MUESTRAS : 22

SINTOMATOLOGIA  
HOSPITAL GRAL. MANUEL GEA GONZALEZ



SINTOMATOLOGIA  
HOSPITAL GRAL. MANUEL GEA GONZALEZ



## ECP EN CELULAS Hep 2

MUESTRAS	1er Pase	2 Pase	3er Pase
1	+/-	células desprendidas	células desprendidas
2	células secas	células desprendidas	células desprendidas
3	células secas	células desprendidas	+
4	+/-	+	+
5	+/-	-	-
6	+	+	+
7	+/-	-	-
8	-	-	-
9	+	+	+
10	+	+	+
11	-	-	-
12	células secas	-	-
13	-	+	+
14	+	+	+
15	células secas	-	-
16	+	+	+
17	células secas	-	-
18	+	+	+
19	células secas	-	-
20	-	-	-
21	-	+/-	+
22	-	células desprendidas	células desprendidas
23	+/-	-	-
24	+	+	+

TABLA 4  
ECP EN CELULAS Hep 2

MUESTRAS	1er Fase	2 Pase	3er Pase
25	+	+	+
26	+/-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	células desprendidas
29	+	+	+
30	+/-	-	-
31	+/-	-	-
32	células secas	+/-	+/-
33	+	+	+
34	+	+	+
35	+	+	+
36	+	+	+
37	+	+	+
38	+	+	+
39	+	+	+
40	+	+	+
41	+	+	+
42	contaminación	+	+
43	+	+	+
44	-	+/-	+
45	-	+	+
46	células secas	+	+
47	+	células desprendidas	+
48	células secas	-	-

TABLA 4  
ECP EN CELULAS Map 2

MUESTRAS	1er Pase	2 Pase	3er Pase
49	células secas	-	-
50	+/-	-	-
51	-	-	+
52	+	+	+
53	+/-	-	-
54	-	-	-
55	-	-	+
56	+	+	+
57	+/-	-	+/-
58	+	+	+
59	+	+	+
60	+	+/-	+
61	+	+	+

Total de Muestras = 61

1er Pase :	muestras	%
	+	42.62
	-	19.67
	+/-	37.70

2 Pase :	muestras	%
	+	45.90
	-	39.34
	+/-	14.75

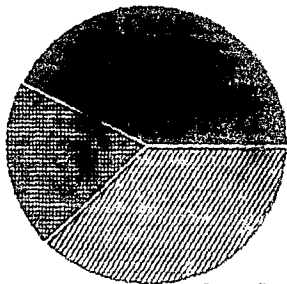
3er Pase :	muestras	%
	+	57.37
	-	32.78
	+/-	9.83



% DE EFECTO CITOPATICO  
EN CELULAS Hep 2

Caso 1  
Positivas

Caso 2  
Negativas



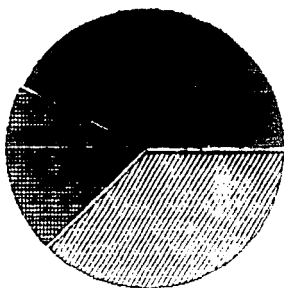
Caso 3  
+/-

1er PASE

% DE EFECTO CITOPATICO  
EN CELULAS Hep-2

Caso 1  
Positivas

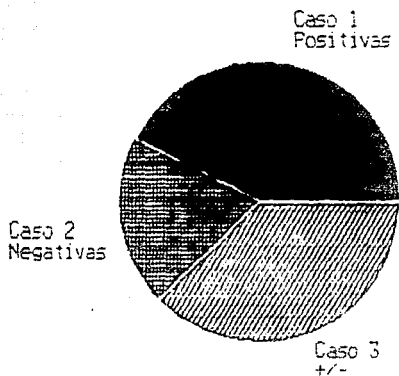
Caso 2  
Negativas



Caso 3  
47%

2o PASE

% DE EFECTO CITOPATICO  
EN CELULAS Hep 2



Jer PASE

% DE EFECTO CITOPATICO  
EN CELULAS Hep 2

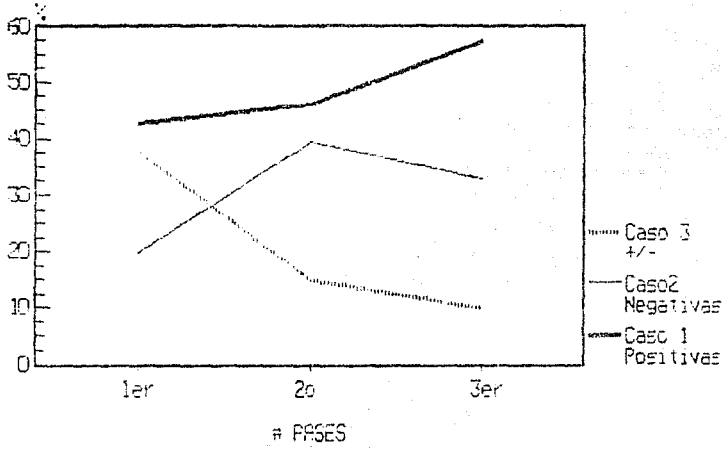


TABLE 5

COMPARACION DE LA EFICIENCIA EN LA DETECCION DEL VIRUS. EIA vs. ECP.

Muestra	ECP	D.O.
1	+	0.5727
2	+	0.7563
3	+	0.0730
4	+	0.0688
5	-	0.1107
6	+	0.1707
7	-	0.2103
8	-	0.1131
9	+	0.1051
10	+	0.0538
11	+	0.0988
12	-	0.1287
13	+	0.1049
14	+	0.0492
15	-	0.0980
16	+	0.0585
17	-	0.0839
18	+	0.0793
19	-	0.0928
20	-	0.1216
21	+	0.0812
22	+	0.0583
23	-	0.0899
24	+	0.0815

TABLA 5

COMPARACION DE LA EFICIENCIA EN LA DETECCION DEL VIRUS. EIA vs. ECP.

Muestra	ECP	D.O.
25	-	0.1093
26	-	0.0994
27	-	0.1176
28	+	0.0172
29	+	0.0573
30	-	0.1337
31	-	0.1260
32	+/-	0.1416
33	+	0.1162
34	+	0.0929
35	+	0.1491
36	+	0.0941
37	+	0.1307
38	+	0.0955
39	+	0.1117
40	+	0.0837
41	+	0.0535
42	+	0.1230
43	+	0.0472
44	+	0.0608
45	+	0.0553
46	+	0.0411
47	-	0.0504
48	-	0.0488

TABLA 5

COMPARACION DE LA EFICIENCIA EN LA DETECCION DEL VIRUS. EIA vs. ECP.

Muestra	ECP	D. O.
49	-	0.0550
50	-	0.0542
51	+	0.0672
52	+	0.0457
53	-	0.0530
54	-	0.0573
55	+	0.0574
56	+	0.0549
57	+/-	0.0556
58	+	0.0854
59	+	0.0693
60	+	0.0602
61	+	0.0663
Control +		0.6400
Control -		0.0600
		0.0500
		0.0700

CALCULOS:

$\bar{X}$  de controles negativos = 0.0600

Rango de negativos +/- 3S = 0.030-0.090

Cutoff =  $\bar{X}$  de negativos + 0.120 = 0.0600 + 0.120 = 0.180

Zona gris = +/- 7% del valor del Cutoff = 0.07 \* 0.180 = 0.012

Calculo de valor positivo - el valor negativo = P -  $\bar{X}$  de N

P - N = 0.6400 - 0.0600 = 0.6000

Aquellas muestras cuyo valor de D.O. sea igual o mayor que el valor del cutoff son consideradas positivas por ABBOTT RSV EIA.

Las muestras cuyos valores de D.O. sean menores al valor de cutoff son consideradas negativas por ABBOTT RSV EIA.

Las muestras cuyo valor de D.O. se encuentra en la zona gris son consideradas como dudosas. Su valor definitivo deber'a ser confirmado.



#### DISCUSION.

Se recolectaron un total de 61 muestras obtenidas nasofaríngea de niños hospitalizados con infección respiratoria aguda, de las cuales 39 correspondieron al Instituto Nacional de Pediatría y 22 al Hospital General Manuel Gea González.

Para el aislamiento del virus sincitial respiratorio de estas muestras, se emplearon células REF 1, se eligió esta línea celular debido a que favorece el aislamiento del antígeno viral hasta en un 82% considerando además que es posible observar efecto citopático en aproximadamente 2.9 días.

Se realizaron 3 pases a cada una de las muestras al término de los cuales se determinó un 57.37% de positivas, 31.78% de negativas y 9.83% dudosas. (Ver tabla 4)

En la determinación del antígeno viral por ABBOTT RSV EIA, los valores determinados para los controles positivo y negativo se encontraron en el límite inferior aceptado por el kit, por lo que se dudó de la pureza del control positivo, y se procedió a realizar la misma técnica pero empleando la cepa Long (ATCCVR-25 AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, ROCKVILLE, MD, USA.) producida y purificada en el Laboratorio de Virología Experimental Fac. de Medicina UNAM., esperando un incremento en el valor de densidad óptica del control positivo, pero

el resultado obtenido caía dentro de los valores correspondientes a los controles negativos, de lo que concluimos que un antígeno externo no puede ser utilizado como control positivo dentro del kit.

En los resultados obtenidos por ABBOTT REV EIA sólo 2 muestras fueron positivas de acuerdo a los cálculos realizados que indica el kit, un alto porcentaje fueron consideradas negativas (67.24) y un 29.1% corresponde a las muestras señaladas como dudosas por lo que requieren nueva confirmación.

No fue posible llevar a cabo la comparación de la eficiencia para la determinación del antígeno viral (REV) entre las dos técnicas utilizadas, debido principalmente a los problemas que presentó el kit ABBOTT RSV EIA siendo básicamente el hecho de que se trató en un periodo cercano a la fecha de caducidad del kit.

En los 51 pacientes estudiados menores de 2 años en su mayoría, los síntomas más frecuentemente encontrados fueron disnea, cianosis y neumonía (ver tabla 3).

En las dos muestras reportadas como positivas por ABBOTT REV EIA, y dudosas en efecto citopático no encontramos una correlación directa con la sintomatología presentada por estos pacientes, ya que los síntomas comunes fueron disnea y neumonía, no manifestando bronquiolitis como cuadro característico de una infección respiratoria causada por RSV.

## CONCLUSIONES.

El aislamiento por efecto citopático del virus sincitial respiratorio de muestras nasofaríngeas obtenidas de niños hospitalizados con infección respiratoria aguda a partir de células Hep 2, no es definitivo en el diagnóstico; debido a que existen otros virus respiratorios que generan sincitio, así como, bacterias que ocasionan destrucción celular, por lo que es necesario llevar a cabo la confirmación definitiva a través de un ensayo inmunoenzimático ABBOTT RSV EIA.

La determinación del antígeno viral por ABBOTT RSV EIA no confirma los resultados obtenidos por aislamiento en células Hep 2, por lo que no podemos decir con certeza cuales muestras fueron francamente positivas o negativas, ya que hubo una gran diferencia en los resultados obtenidos

#### RESUMEN.

Las infecciones de las vías respiratorias presentan en México la tasa de mortalidad más alta en niños entre 0 y 12 meses. Los agentes etiológicos no se han identificado, sin embargo es factible que el virus sincitial respiratorio (RSV) sea el responsable de gran parte de estas infecciones. A nivel mundial se considera al RSV como el agente causal más importante de las infecciones respiratorias agudas en niños, principalmente de las bronquiolitis y neumonías severas que requieren hospitalización y de las infecciones nosocomiales de las vías respiratorias en los pabellones infantiles.

Actualmente es posible controlar la infección con ribavirina en aerosol, no obstante para que el antiviral sea realmente eficaz es necesario administrarlo al inicio de la infección. Por lo que es importante confirmar la presencia del virus.

La identificación del RSV se hace por aislamiento del virus en células Hep 2 y por ABBOTT RSV EIA.

## APENDICE.

Medio de transporte para RSU.

100 ml de solución de Hanks balanceada.

0.5 % de albúmina sérica bovina.

1 ml de antibióticos.

Preparación de la solución de Hanks:

### Solución 1.-

NaCl	40.0 g.
KCl	2.0 g.
Fosfato monobásico de sodio	0.356 g.
Fosfato diácido de potasio	0.3 g.
Glucosa	5.0 g.
Sulfato de sodio	1.0 g.
Rojos de fenol	0.085 g.
Agua desionizada	1.0 l.

### Solución 2.-

Cloruro de calcio	0.037 g.
o Cloruro de calcio dihidratado	0.485 g.
Agua desionizada	100 ml
Esterilizar por autoclave 15 min.	

### Solución 3.-

Bicarbonato de sodio	0.7 g.
Agua desionizada	100 ml.
Esterilizar por autoclave 15 min.	

Preparar frascos con 70 ml. de agua desionizada + 20 ml. de la solución 1. Esterilizar por autoclave 15 min. A estos frascos agregar 5 ml. de la solución 2 y 5 de la solución 3.

Amortiguadores.

a) Amortiguador de Fosfatos pH 7.8.

Fosfato monobásico de sodio 0.02 M 2.75 g.

Agua destilada	1.0 l.
Fosfato dibásico de sodio 0.02 M	7.16 g.
Agua destilada	1.0 l.

- b) Amortiguador NTE pH 7.4.  
 NaCl 0.15 M  
 Tris-HCl 0.05 M  
 EDTA 0.001 M

Soluciones.

a) PBS

NaCl	8.0 g.
KCl	0.2 g.
Fosfato monobásico de sodio anhidro	0.96 g.
Fosfato dibásico de potasio	0.2 g.
Aforar con agua destilada a 1 litro.	

Se ajusta el pH a 7.8 y se esteriliza en autoclave a 121°C 30 min.

b) EDTA

NaCl	9.0 g.
EDTA	0.2 g.
Aforar con agua destilada a 1 litro.	
Esterilizar en autoclave a 121°C 30 min.	

c) tripsina

d) Antibióticos

100 mg de Sulfato de Estreptomicina  
 100,000 UI de Penicilina G Sódica

Se disuelven en 10 ml. de PBS.

Se esteriliza por filtración con filtro milipore de 0.22 micras.

e) Nistatina

100 mg. de Nistatina

Se disuelven en 1 ml de NaOH 1N y se adicionan 9 ml. de PBS.

Se esteriliza por filtración con filtro milipore de 0.22 micras.

ESTA TESIS NO DEBE  
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

1. - ANDERSON LARRY J., PATRIARCA P. A., HIRSCHOLZER J. & NOBLE G.  
VIRAL RESPIRATORY ILLNESSES. MEDICAL CLINICS OF NORTH AMERICA. 1983;  
67: 1009-1029.
- 2.- ANDERSON LARRY J., HIRSCHOLZER J., BINGHAM P. & STONE Y.  
MICRONEUTRALIZATION TEST OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS BASED ON AN  
ENZYME IMMUNOASSAY. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1985; 22:  
1050-1052.
- 3.- LAFFENS G. H., SWIERKOSZ M., SCHMIDT R., ARMSTRONG T. & RIVETNA K.  
ENHANCEMENT ISOLATION OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS IN CELL CULTURE.  
JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1986; 23: 800-802.
- 4.- ARMSTRONG J.A., FERREYRA H.G. & VALENTINE R.C.  
MORPHOLOGY AND DEVELOPMENT OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS IN CELL  
CULTURE. NATURE. 1968; 22:1177-1181.
- 5.- BALASSO G. ET AL .  
ANTIVIRAL TREATMENT AND VIRAL DISEASES OF MAN. RAVEN PRESS. NEW YORK  
1979
- 6.- BANGHAM C.R., CANNON M.J., KANEON D.T. & ASKONAS D.A.  
CITOTOXIC T CELL RESPONSE TO RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS IN MICE.  
JOURNAL OF VIROLOGY. 1985; 56: 55-59.
- 7.- GREISE H.C., DOUGLAS G.R., DEIMAN M.J. & MESSNER K.H.  
HOSPITAL RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTIONS. THE NEW ENGLAND

JOURNAL OF MEDICINE. 1975; 293: 1343-1346.

8.- BREESE H.C., KOPELMAN E.A., DOUGLAS G.R., GERMAN H.J. & MEAGHER P.M.

NEONATAL RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTION. THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE. 1979; 300: 373-376.

9.- BREESE H.C., DOUGLAS G.R. & SIMONS L.R.

INTERFERON PRODUCTION IN ADULTS WITH RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS. ANNALS OF INTERNATIONAL MEDICINE. 1981; 94: 52-55.

10.- BRUCKOVA H., GRANDIEN M., PETTERSSON C.A. & KUNZOVA.

USE OF NASAL AND PHARYNGEAL SWABS FOR RAPID DETECTION OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS AND ADENOVIRUS ANTIGENS BY ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1989; 27: 1867-1869.

11.- BROMBERG K., TANNIS G., BARTONE R., CLARK J. & STERIA M.

COMPARISON OF HEP 2 CELL CULTURE AND ABBOTT RSV EIA. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1987; 25: 434-436.

12.- CHANOCK R., BETHESDA H., HYUN WMA K., ANDREW J.VARGOSKO & DELEVA A.

RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS. THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. 1961; 176: 647-653.

13.- COATES H.V., FORSYTH B.R. & CHANOCK R.

BIOPHYSICAL STUDIES OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS. JOURNAL OF BACTERIOLOGY. 1966; 91: 1263-1269.

14.- FUDENBERG H.H. & STITES P.D.

INMUNOLOGIA CLINICA SEXTA EDICION. EL MANUAL MODERNO. MEXICO 1988.



- 15.- DARVEY J. & CREMER N.  
METHODS IN IMMUNOLOGY. THIRD EDITION W.A. BENJAMIN, INC. LONDON 1971.
- 16.- GERRARD C.S., LEVANDOWSKI R.A., DERRITY T.R., YEATES D.B. & KLEIN E.  
THE EFFECTS OF ACUTE RESPIRATORY VIRUS INFECTION UPON TRACHEAL MUCOSAL  
TRANSPORT. ARCHIVES OF ENVIRONMENTAL HEALTH. 1985; 40: 322-325.
- 17.- GIMENEZ H.B., KEIR H.M. & CASH P.  
IN VITRO ENHANCEMENT OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTION OF U937  
CELL BY HUMAN SERA. JOURNAL GEN VIROLOGY. 1989; 70: 92-96.
- 18.- HALL C. & DOUGLAS G.  
CLINICALLY USEFUL METHOD FOR THE ISOLATION OF RESPIRATORY SYNCYTIAL  
VIRUS. JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. 1975; 131: 1-5.
- 19.- HALL J.W., BREESE H.C. & SPEERS H.D.  
RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTIONS IN ADULTS. ANNALS OF  
INTERNATIONAL MEDICINE. 1978; 88: 303-305.
- 20.- HENDRY H.R., FIERIK L. & McINTOSH N.  
COMPARISON OF WASHED NASOPHARYNGEAL CELLS AND WHOLE NASAL SECRETIONS FOR  
DETECTION OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS ANTIGENS BY ENZYME LINKED  
IMMUNOSORBENT ASSAY. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1986; 23:  
383-389.
- 21.- HORNSLETH A., GRAUBALLE P., FRITS B., BENNER J. & PEDERSON I.  
PRODUCTION OF ANTISERUM TO RSV POLYPEPTIDES: APPLICATION IN ENZYME  
LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 1981; 14:  
501-509.

- 22.- HUGHES H.J., HANN R.D. & HAMPARIAN V.V.  
DETECTION OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS IN CLINICAL SPECIMENS BY VIRAL  
CULTURE DIRECT AND INDIRECT IMMUNOFLOURESCENCE AND ENZYME IMMUNOASSAY.  
JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1986; 26: 588-591.
- 23.- JOPLIK N.W., WILLETT P.H. & AMOS R.D.  
MICROBIOLOGIA. 18a EDICION. MEDICA PANAMERICANA. BUENOS AIRES 1983.
- 24.- KATSNELSON B. & FRIVALOVA I.  
RECRUITMENT OF PHAGOCYTIZING CELLS INTO THE RESPIRATORY TRACT AS A  
RESPONSE TO THE CYTOTOXIC ACTION OF DEPOSITED PARTICLES. ENVIRONMENTAL  
HEALTH PERSPECTIVES. 1984; 55: 313-325.
- 25.- KAUL A., SCOTT R., GALLENGHER M., SCOTT H. CLEMENT J. & OGRA P.L.  
RAPID DIAGNOSIS IN CHILDREN BY USE OF INDIRECT IMMUNOFLOURESCENCE.  
PEDIATRIC PULM. 1978; 132: 1088-1090.
- 26.- KRILOV L., ANDERSON L.J., MARCOUX L., BONAGURA V.R. & WEDGWOOD J.F.  
ANTIBODY MEDIATED ENHANCEMENT OF RSV INFECTION IN TWO  
MONOCYTE/MACROPHAGE CELL LINES. THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES.  
1985; 150: 777-782.
- 27.- LAMBERT D., PONS M.W. & DORSCHHASLER K.  
NUCLEIC ACIDS OF RSV. JOURNAL OF VIROLOGY. 1980; 36: 837-846.
- 28.- LEHNINGER A.  
BIOQUIMICA. 6a. EDICION. OMEGA. BARCELONA 1983.
- 29.- LENNETTE E.  
DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR VIRAL AND RICKETTSIAL DISEASES. THIRD EDITION.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1969

30. - LENNETTE E.

MICROBIOLOGIA CLINICA. 3a. EDICION. MEDICA PANAMERICANA. BUENOS AIRES  
1982.

31. - LEVINE S. POLYPEPTIDES OF RSV. JOURNAL OF VIROLOGY. 1977; 21:  
427-431.

32. - LEVINE S., DAJANI A. & KLAIBER F. THE RESPONSE OF INFANTS WITH  
BRONCHIOLITIS TO THE PROTEINS OF RSV. JOURNAL GEN. VIROLOGY. 1988; 69:  
1229-1232.

33. - OPS/OMS

INFORME DE ASESORIA AL PROGRAMA DE CONTROL DE LAS INFECCIONES  
RESPIRATORIAS AGUDAS EN NIÑOS DE 5 AÑOS EN LA REPUBLICA MEXICANA.  
MEXICO 1985.

34. - OPS/OMS

GUIA OPERATIVA PARA LA IMPLANTACION Y SEGUIMIENTO DEL PROGRAMA NACIONAL  
DE PREVENCION Y CONTROL DE LAS IRAS.  
MEXICO 1985.

35. - OPS/ OMS

MANUAL DE NORMAS PARA EL CONTROL DE IRAS.  
MEXICO 1985.

36. - OMS

PROGRAMME OF ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS.  
GENEVA 1985.

- 37.- PIZARRO E. Y MEDINA GUTIERREZ. VIRUS RESPIRATORIOS EN NIÑOS PEQUEÑOS CON SINTOMATOLOGIA GRAVE. REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA. 1976; 20: 185-189.
- 38.- PIZARRO E., GARCIA RAMOS E., CARDENAS V. Y LUGO S. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO Y ETIOLOGICO DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS EN NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS PROVENIENTES DEL HOSPITAL INFANTIL DE NAUCALPAN EDO. DE MEXICO. COMUNICACION PERSONAL. MEXICO 1990.
- 39.- ROONEY J.C. & WILLIAMS E.H. THE RELATIONSHIP BETWEEN PROVED VIRAL BRONCHIOLITIS AND SUBSEQUENT WHEZZING. JOURNAL OF PEDIATRICS. 1971; 75: 744-747.
- 40.- ROSE R.N. & FRIEDMAN H. EL LABORATORIO EN INMUNOLOGIA CLINICA. 2a. EDICION. MEDICA PANAMERICANA. BUENOS AIRES 1984.
- 41.- SCOPES G., WATT P. & LAMBER P. IDENTIFICATION OF A LINEAR EPITOPD ON THE FUSION GLYCOPROTEIN OF RSV. JOURNAL GEN OF VIROLOGY. 1990; 71: 53-59.
- PULLAN R. C., SCOTT M. & McQUILLIN J. CELL MEDIATED IMMUNITY IN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS DISEASE. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY. 1984; 13: 105-114.
- 43.- SWENSON P. & RAFLAN M. RAPID DETECTION OF RSU IN NASOPHARYNGEAL ASPIRATES BY A COMMERCIAL ENZYME IMMUNOASSAY. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1986; 23: 485-488.
- 44.- VAUR L., AGUT H. & BRICOUT F.

- SIMPLIFIED ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR SPECIFIC ANTIBODIES TO RSV. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 1986; 24: 596-599.
- 45.- WALLACE T.H. TRANSPLANTABLE HUMAN NEOPLASMS MAINTAINED IN CORTISONE TREATED LABORATORY ANIMALS. CANCER RESEARCH. 1954; 14: 660-672.
- 46.- WELLSER C.R. & OGRA L.P. IMMUNOLOGY OF RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS. ANNALS RESEARCH MEDICINE. 1988; 39: 147-162.
- 47.- WULFF H., KIDD P. & WENNER H.A. RSV: OBSERVATIONS ON ANTIGENIC HETEROGENEITY. P.S.E.B.H. 1984; 115: 240-243.