

93 21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

FRECUENCIA DE INFECCION POR VIRUS RESPI-  
RATORIO SINCICIAL EN UN MEDIO  
HOSPITALARIO.

**TITULO DE ORIGIN**



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

T E S I S  
Que para obtener el Titulo de  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
p r e s e n t a  
ROSA MARIA MONTIEL LOPEZ



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.

## 1.0.0 INTRODUCCION

El Virus Respiratorio Sincicial (VRS) es considerado en la actualidad el patógeno viral de mayor importancia en el tracto respiratorio de niños e infantes (1,2,3,4,5,6,7,8), encontrándose una alta tasa de morbilidad y mortalidad (5,7,8,9).

Aunque este fenómeno no se puede generalizar a los adultos en donde a pesar de la evidencia de algunos reportes clínicos (2,4,10), la mayoría de los signos y síntomas se confunden con los ocasionados por un resfriado común, e - bien pueden ser asintomáticos.

En países desarrollados como Estados Unidos, Australia e Inglaterra se tienen cifras apreciables del problema producido por el VRS, como resultado de un gran número de estudios epidemiológicos realizados, en los que se aboca el problema desde muy diversos puntos de vista, como es la - posible influencia de factores físicos, biológicos, climá - ticos y de diagnóstico.

En nuestro país no ha podido ser estudiado este problema ampliamente, debido a que a pesar de su importancia, -- existen enfermedades que aún causan mayor número de decesos, como es el caso de las enfermedades gastrointestinales, las cuales representan el problema número uno en -- nuestro medio y ésto aunado a la falta de recursos tanto económicos como de desarrollo, y no han permitido realizar un estudio más profundo del problema el cual pondría de manifiesto la importancia de contar de manera rutinaria con metodologías de diagnóstico que permitieran demostrar la presencia de infección por VRS en casos en los -- que hay indicios de bronquiolitis, neumonía, asma recurrente y algunos otros síndromes respiratorios en los que

se sospeche la presencia de dicho agente.

En el presente trabajo se llevó a cabo una encuesta de -- anticuerpos contra el VRS en un grupo de niños cuyas edades se encontraban entre recién nacidos y cinco años, con el propósito de contribuir a un mejor conocimiento de -- este problema en nuestro país. A manera de antecedentes, se mencionan a continuación algunos resultados y datos estadísticos de investigaciones realizadas en instituciones de otros países, de los cuales puede inferirse la importancia de la infección por este virus.

En un trabajo realizado en el Hospital Pediátrico Royal - Alexandra, de Australia (6) se obtuvieron los datos que se presentan en la tabla I:

Tabla I

|                    | 1979 | 1980 | 1981 | 1982 | 1983 | 1979-83 |
|--------------------|------|------|------|------|------|---------|
| Total de muestras  | 405  | 428  | 526  | 487  | 380  | 2.226   |
| Muestras positivas | 104  | 112  | 164  | 212  | 176  | 768     |
| % Positivo         | 25.7 | 26.0 | 31.2 | 43.5 | 46.3 | 34.5    |

En este estudio no sólo se observó un alto porcentaje de incidencia en enfermos que presentaban afecciones respiratorias sino que además mostró la alta predisposición de los infantes, según puede verse en la tabla II, en la que se observa que el mayor índice de morbilidad se encontró en el grupo de los niños menores de seis meses de edad y que este disminuyó notablemente después del año de edad.

Tabla II

| Edad/Años   | 1979  | 1980  | 1981  | 1982  | 1983  | 1979-1983 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| 1 mes   | 0     | 5     | 6     | 9     | 8     | 28        |
| 1-2 meses   | 10    | 13    | 16    | 31    | 29    | 99        |
| 1-3 meses   | 22    | 14    | 20    | 31    | 35    | 122       |
| 3-4 meses   | 16    | 11    | 30    | 30    | 16    | 103       |
| 4-5 meses   | 11    | 16    | 21    | 21    | 21    | 90        |
| 5-6 meses   | 7     | 4     | 10    | 14    | 16    | 51        |
| 6 meses   | 66    | 63    | 103   | 136   | 125   | 493       |
| Subtotal  | &63.4 | &56,2 | &62.8 | &64.1 | &71.0 | &64.2     |
| 6-12 meses  | 28    | 33    | 44    | 51    | 42    | 198(25.8) |
| 1-4 años  | 9     | 13    | 14    | 19    | 8     | 63        |
| 4 años  | 1     | 3     | 0     | 2     | 1     | 7         |
| & Indica el porcentaje del total de casos detectados. |       |       |       |       |       |           |

Existen algunos otros estudios en los cuales se analizan los grados de severidad de la infección producida por este virus, e incluso se compara con algunos otros virus (11), encontrándose que el Virus Respiratorio Sincicial es el virus que produce cuadros clínicos de mayor severidad.

En adultos, como se mencionó anteriormente la gravedad de los casos se reduce al mínimo, presentándose la enfermedad como infecciones más o menos leves, localizadas principalmente en el sistema respiratorio superior y que suelen confundirse con cuadros gripales; sin embargo, eso no

es una regla, como lo demuestran diversos estudios realizados en otros países (2,3,4,10). Por otro lado se ha observado que un gran número de adultos son portadores del virus, y que de éstos sólo unos cuantos llegan a presentar la enfermedad.

Hall y colaboradores (4) muestran el siguiente cuadro (tabla III).

Tabla III

| Características                                    | No. de pacientes | Promedio de duración(días) |
|--|------------------|----------------------------|
| Aislamiento del VRS en lavados nasales.            | 10               | 4 (1-17)                   |
| Rinorrea y congestión nasal                        | 10               | 22 (7-41)                  |
| Fiebre (mayor o igual a 37.8°C tomada anualmente). | 10               | 2 (2-7 )                   |
| Tos  | 10               | 12 (7-19)                  |
| Inflamación de amígdalas                           | 5                | 8 (3-10)                   |
| Inflamación faríngea                               | 2                | 9 (3-10)                   |
| Ronquera   | 4                | 14 (4-23)                  |
| Ronquera de pecho                                  | 2                | 4 (2-6 )                   |
| Incapacidad  | 8                | 6 (2-14)                   |

( ) El número encerrado indica rango (en días).

Este estudio se realizó en 10 pacientes adultos de los -- cuales la mitad eran hombres y la otra mitad mujeres, su

edad promedio era de 30 a 60 años y en ellos se observó - que el 80% presentaron sintomatología y cuadros clínicos de mediana severidad.

Se han realizado otros estudios para conocer el origen de la enfermedad producida en los adultos y en general se -- tiene la teoría de que ésta se debe a una reinfección.

Todos los datos presentados anteriormente nos muestran el problema tan grave para la salud que representa el VRS; además se ha podido observar que la enfermedad tiene un - pico de incidencia en el período comprendido entre el otoño y la primavera, con lo cual se establece que el virus tiene un comportamiento de tipo estacional (12).

El VRS ha sido aislado e identificado como el principal - agente causal de enfermedades tan graves como son la bronquiolitis y la neumonía.

La importancia de estas enfermedades es que se encuentran relacionadas con el tracto respiratorio bajo, y al presentarse en infantes y niños pequeños el riesgo de mortalidad aumenta.

En el estudio realizado por Kim y colaboradores (12) se - obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla IV.

En esta tabla se indica el porcentaje de muestras en que se logró identificar el Virus Respiratorio Sincicial como el agente causal de la enfermedad que presentaban esos individuos.

Tabla IV

| Diagnóstico de la enfermedad | Promedio de edad (meses) | No. de muestra | % de muestra positiva. |
|------------------------------|--------------------------|----------------|------------------------|
| Neumonía                     | 24.8                     | 1,547          | 9.2                    |
| Bronquiolitis                | 7.8                      | 1,179          | 26.9                   |
| Tos                          | 24.5                     | 765            | 3.9                    |
| Faringitis<br>Bronquiolitis  | 29.3                     | 1,137          | 4.7                    |
| Infección respiratoria alta  | 20.7                     | 6,723          | 7.8                    |
| Total respiratorio           | 21.0                     | 11,351         | 9.4                    |
| Paciente de control interno  | 34.0                     | 1,785          | 0.3                    |
| Paciente de control externo  | 17.9                     | 3,783          | 0.3                    |
| Total pacientes control      | 23.1                     | 5,568          | 0.3                    |

En la tabla V , obtenida de una publicación de World Health Organization (13), se puede observar el número de muestras clínicas examinadas en el período comprendido entre 1972-1976 y el número de casos en que se aislaron otros agentes virales como causantes de la enfermedad, lo que permite demostrar la frecuencia de infección por VRS en comparación con otros agentes, ya que sólo la infección por virus de influenza tipo "A" mostró una frecuencia francamente mayor, y casi igual a la frecuencia de infección respiratoria por Adenovirus.

Tabla V

| Virus                        | Años  |       |       |       |       | Total  |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
|                              | 1972  | 1973  | 1974  | 1975  | 1976  |        |
| Adenovirus                   | 1937  | 2291  | 2508  | 1883  | 1712  | 17711  |
| Virus Influenza tipo A       | 4365  | 3356  | 2612  | 5066  | 6484  | 37792  |
| Virus Influenza tipo B       | 147   | 591   | 1551  | 299   | 1284  | 6263   |
| Virus Influenza tipo C       | 24    | 29    | 29    | 12    | 11    | 235    |
| Virus Parainfluenza          | 1521  | 1610  | 1608  | 1435  | 1495  | 14229  |
| Virus Respiratorio Sincicial | 1938  | 2123  | 2514  | 2144  | 2106  | 16960  |
| Rinovirus                    | 350   | 410   | 395   | 429   | 367   | 3395   |
| Virus del Sarampión          | 371   | 457   | 405   | 347   | 227   | 3016   |
| Esterovirus                  | 1133  | 1375  | 1425  | 1317  | 1001  | 11060  |
| Virus del Herpes             | 802   | 1123  | 1104  | 1176  | 1200  | 3081   |
| Mycoplasma pneumoniae        | 1997  | 1198  | 2196  | 3565  | 2071  | 14214  |
| Otros virus                  | 285   | 303   | 266   | 490   | 736   | 2686   |
| Total                        | 14570 | 15366 | 16613 | 18133 | 18694 | 135702 |

En una publicación científica dada a conocer por la Organización Panamericana de la Salud con el No. 493 (14), se reporta el cuadro 1 en el que se muestra la distribución de enfermedades respiratorias ocasionadas por varios virus en los diferentes meses del año. Esta distribución es irregular y además se puede observar que el VRS es el segundo en frecuencia estacional, antecedido únicamente por el virus de la Influenza tipo A, teniendo ambos un pico de incidencia semejante; este pico se presenta en el período comprendido entre los meses de Noviembre y Abril. En el período que comprenden dichos meses, las enfermedades ocasionadas por estos virus se presentan en forma epidémica habitualmente; como puede verse en el mismo cuadro la frecuencia de cuadros clínicos producidos por el VRS - representa aproximadamente una quinta parte del número de casos de Influenza ocasionados por el virus tipo "A".

De la misma publicación se presenta la gráfica (cuadro II) de frecuencia relativa de enfermedad provocada por el VRS a lo largo de las diferentes etapas de la vida del hombre en esta gráfica también se hace una comparación de frecuencia con algunos agentes virales. En dicha gráfica se puede observar que esta frecuencia, para el VRS, es muy alta en niños cuya edad es inferior a un año, y esto disminuye gradualmente con la edad hasta llegar a un nivel mínimo en los individuos adultos y aumenta ligeramente en individuos cuya edad es superior a 60 años, aunque este aumento es poco significativo comparado con el que se presenta en niños menores de un año.

Ambos cuadros (I y II) muestran el comportamiento epidemiológico del VRS y de alguna manera la importancia del -

mismo como agente causal de enfermedades.

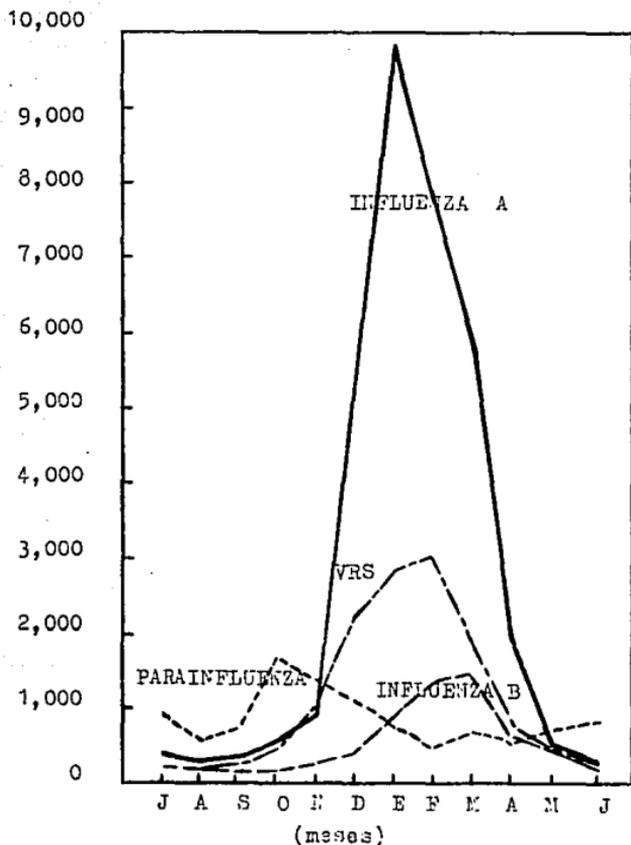
De las enfermedades ocasionadas por el VRS, sólo el 10% fueron reportadas en el hemisferio sur, y por ello también se piensa en una posible influencia de tipo climático geográfico aunque esto no se ha podido comprobar.

Por otro lado, se han encontrado algunos patrones epidemiológicos relacionados con el sexo de los individuos infectados, y se ha visto que por lo general se presenta la infección por VRS con mayor frecuencia en niños que en niñas (13).

Existen otros reportes que sugieren que la infección por VRS puede ser una importante causa de exacerbaciones agudas de bronquitis crónica, de asma (14) y ocasionalmente de otitis media (15).

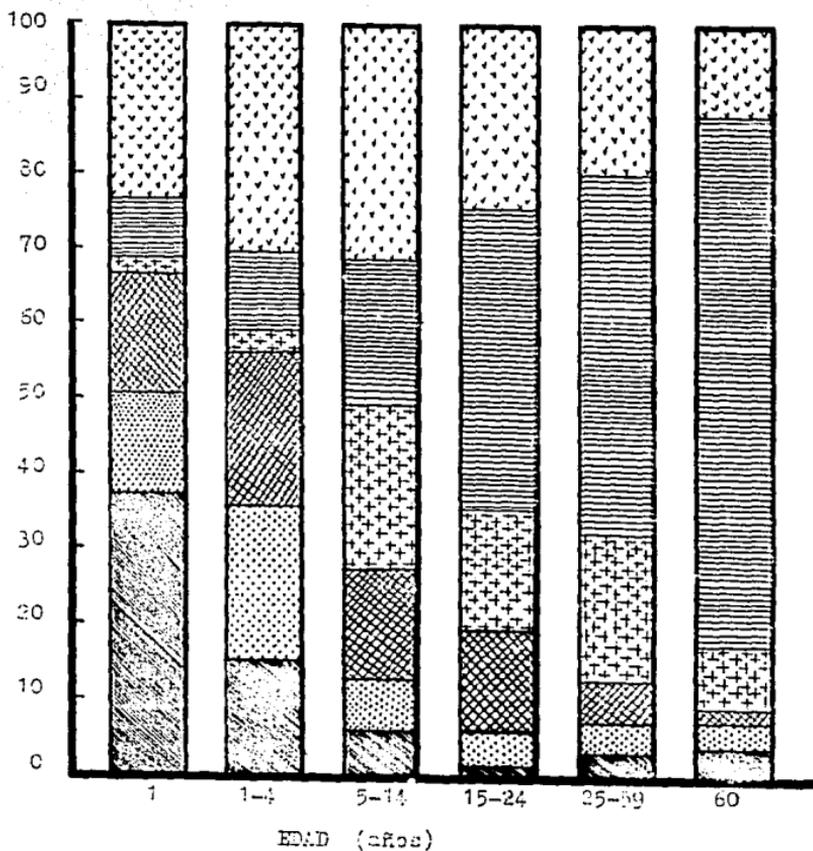
Otro aspecto de interés se refiere a la relativa frecuencia con que este virus causa infecciones intrahospitalarias (16).

# Frecuencia de enfermedad respiratoria por meses



Cuadro No. I

Frecuencia relativa de enfermedad respiratoria ocasionada por Virus y M.pneumonias, en relación a la edad



Cuadro No. II



Otros



V. de Influenza "A"



Mycoplasma Pneumoniae



Adenovirus



V. de Parainfluenza



V. Respiratorio Sincicial

(Continuación) Cuadro No. II

**2.0.0 OBJETIVO**

Como se pudo observar en el capítulo anterior , se presen-  
tan datos que muestran la frecuencia de infección por --  
Virus Respiratorio Síncicial, estos datos, y algunos o-  
tros estudios y publicaciones revisadas fundamentan la --  
importancia de la realización de una encuesta seroepide-  
miológica en niños menores de 5 años, por tratarse del -  
grupo más expuesto a la infección y a presentar cuadros -  
clínicos de mayor gravedad, y además para contribuir al -  
mejor conocimiento de este problema de salud en nuestro -  
medio.

3.0.0 ANTECEDENTES

- 3.1.0 Características del Virus Respiratorio Sincicial.
- 3.2.0 Patología asociada a la infección por Virus Respiratorio Sincicial.
- 3.3.0 Aspectos Inmunológicos.
  - 3.3.1 Diagnóstico.
- 3.4.0 Posibilidad de prevención.

## CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL

Este virus fué aislado por vez primera en 1956 de un chimpancé que sufría una infección de las vías respiratorias altas, que en ese entonces era conocida como coriza del chimpancé. Estudios demostraron que el Virus Respiratorio Sincicial no sólo atacaba a los chimpancés sino que además era capaz de infectar al hombre, lo cual se detectó al encontrar al virus en investigaciones hechas a los investigadores que habían estado en contacto con los chimpancés infectados. En la actualidad a este virus se le conoce con el nombre de Virus Respiratorio Sincicial (VRS), por su tendencia a infectar el tracto respiratorio, bajo en niños, y en adultos casi exclusivamente el alto, formando sincicios, esto es, acúmulos de células cuyas membranas se han fusionado; esto mismo se observa en los tejidos infectados como un efecto citopático característico (17,18,19,20,21).

El VRS está clasificado en el subgrupo de los Pneumovirus de la familia Paramyxoviridae. Posee dos glicoproteínas en la membrana del virión que constituyen los principales antígenos de protección del virus (22).

Una de estas glicoproteínas es denominada F ó de fusión, tiene un peso molecular estimado de 70 000 daltons y tiene una estructura glicoproteica típica del subgrupo de los paramixovirus. La segunda glicoproteína es conocida como G y tiene un peso molecular aparente de 90 000 daltons, obtenido por electroforesis en gel de dodecil sulfato

nato de sodio-poliacrilamida. Una vacuna de VRS inactivada con formaldehído mostró que el componente F es el que tiene un mayor poder inmunogénico y que la actividad inmunogénica del componente G sólo se expresaba cuando las vacunas eran viejas (23).

Algunos estudios de microscopía electrónica del virus, -- propagado en células heteroploides, revelaron un alto polimorfismo de la partícula viral, la cual posee un filamento helicoidal interior, el cual está constituido por una cadena sencilla de RNA 50 S de polaridad negativa (17, 24, 25) debida a su secuencia de aminoácidos, y esta acompañada de una enzima transcriptasa. Cuando esta cadena se aísla de la nucleocápside probablemente presenta el genoma viral intacto (17). El análisis bioquímico del virus purificado, indica que el virus consiste de polipéptidos, algunos de los cuales son glucosilados como se mencionó anteriormente (18, 20). Posee además una envoltura lipoproteica, proveniente de la membrana de la célula hospedera; esta envoltura posee una simetría helicoidal con proyecciones en la superficie. La nucleocápside mide entre 11 y 15 nm (17, 19). Otra descripción que se da de la nucleocápside del VRS es la que menciona Fenner (17), quien dice que esta constituida por una cadena simple, helicoidal con un diámetro de 14 nm y a una periodicidad de 70 Å.

El VRS crece lentamente en cultivos celulares (4 a 8 días) y no proliferan en huevos embrionados (17, 18, 19, 20, 21). Los cultivos de células infectadas con VRS muestran primeros cambios morfológicos caracterizados por el desarrollo de sincicios. Estos contienen grupos de núcleos que usualmente se encuentran en el centro del sincicio, y cuando -

se fijan y se tiñen con Giemsa o Hematoxilina-eosina, se observan inclusiones citoplásmicas eosinofílicas rodeadas de un halo claro (17).

#### AISLAMIENTO Y CULTIVO DEL VIRUS

Las líneas celulares continuas tales como HEP-2 y HeLa -- son usadas para replicar satisfactoriamente el VRS, tanto en el aislamiento como para su propagación. Además, las cepas diploides de fibroblastos humanos tales como la WI-38 y la MCR-5 soportan el crecimiento del VRS, lo mismo que los cultivos epidermoides humanos (17,18,19,21), e incluso se ha reportado un crecimiento satisfactorio en una línea celular de riñón de perro (26).

La formación de sincicios en los cultivos celulares se ve afectada por muchos factores como el medio utilizado, la densidad de la capa celular y la sensibilidad de la línea celular. El medio que se ha visto produce mejores resultados es el Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) adicionado con un volumen igual de medio 199 y el 2% de suero de ternera (7,18,27,28,29).

#### ESTABILIDAD DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL

El VRS es considerado como uno de los virus más lábiles y ya que muestra gran inestabilidad a 37°C, y a 4°C sólo se conserva activo durante unas horas. Estudios de estabilidad muestran que el 90% de la infectividad se pierde en 5 minutos a 55°C y en 24 horas a 37°C y en 4 días a 4°C. La congelación lenta conlleva a la pérdida del 90% de su poder infectante (17).

La infectividad del VRS también se pierde rápidamente a pH 3, y el virus presenta su máxima estabilidad a pH 7.5

Por estas razones la mejor manera de preservar el virus es realizando una congelación rápida en presencia de proteínas, suero o una solución hipertónica de sacarosa que debe ir seguida de un almacenamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$  (17).

#### MODELOS ANIMALES SUSCEPTIBLES

Una variedad amplia de huéspedes pueden desarrollar la infección ocasionada por VRS; entre ellos se encuentran, además del hombre y el chimpancé, ratas, hamsters, cuyos y hurones (13).

Todos estos animales pueden ser inoculados por vía intranasal y la infección puede ser totalmente asintomática y no letal, pero en todas ellas el VRS puede ser identificado por aislamiento a partir de secreciones respiratorias o midiendo la respuesta inmunológica.

### 3.2.0.

#### PATOLOGIA ASOCIADA A LA INFECCION POR VRS

El VRS generalmente se asocia a enfermedades tan severas como lo son la bronquiolitis y la neumonía, y se ha visto que es una de las principales causas de este tipo de enfermedades que en la mayoría de los casos son mortales para los niños menores de seis meses. Las lesiones y por consiguiente las formas clínicas están indiscutiblemente relacionadas con la edad, y aunque el término "bronquiolitis" muchas veces se ha reservado para el síndrome clínico común en niños menores de un año, el que suele presentarse con un período inicial de tos que después de algunos días puede provocar un aumento en la frecuencia respiratoria y aparición de todos los signos de una obstrucción de las vías respiratorias e hipoxemia progresiva (14)

La obstrucción de los bronquios es la respuesta a la infección y consiste en la reacción inflamatoria de las mucosas y el aumento de las secreciones del lumen, así que el aire entra al alvéolo más fácilmente de lo que sale. Esta obstrucción expiratoria relativa atrapa el aire en el alvéolo produciendo angustia respiratoria caracterizada como se dijo antes por enfisema y respiración jadeante (14). Estos cuadros pueden cursar también con atelectasia y neumonía.

La otra enfermedad ocasionada por el VRS y que puede manifestarse con igual grado de severidad es la neumonía, que por definición significa inflamación en el parenquima pulmonar. El diagnóstico suele ser difícil y se realiza me--

dian te análisis radiológicos y sanguíneos, aunque en el caso de este virus es más eficiente el lavado bronquial para la identificación del virus.

Existen algunas otras enfermedades asociadas al VRS que surgen, más que como enfermedades primarias, como resultado de una infección ocasionada por otro tipo de microorganismos como una bacteria, entre las que se cuenta la otitis media.

Se ha descrito la acumulación de fluidos en el oído medio en infantes infectados con VRS, pero las infecciones de oído medio sintomáticas no parecen ser más comunes que otras infecciones respiratorias agudas.

En cuanto a otitis media, se realizó un estudio para comprobar la evidencia epidemiológica que la asocia con infecciones virales del tracto respiratorio (15); en dicho estudio, Sarkkinen encontró que de 28 niños que fueron estudiados 16 presentaron evidencias de infección por VRS, lo que representa un 57% de casos positivos. De esta proporción, tan sólo el 7% fué asociado a VRS y en el resto de las muestras se encontró la participación de alguna bacteria. Además, un 25% de ellos mostrarón positividad a la existencia de antígenos del VRS en los fluidos del oído medio analizados, y en sólo 3% de los niños se detectó la presencia de Adenovirus (15).

La infección por VRS comparte sintomatología con otras infecciones virales que se caracterizan por elevación excesiva de la temperatura, presencia de linfocitos atípicos y leucopenia.

### 3.3.0

#### ASPECTOS INMUNOLOGICOS

Como se mencionó en el capítulo anterior el VRS posee antígenos localizados en la envoltura que son los responsables de la respuesta inmune de los hospedadores; esta respuesta, según se ha visto, no es tan efectiva como se podría esperar y en algunas ocasiones se ha demostrado que por el contrario resulta indeseable.

Uno de estos efectos indeseables los podemos explicar de la siguiente manera:

El VRS, debido a los antígenos de superficie que presenta activa el sistema inmune promoviendo la formación de anticuerpos específicos, estos anticuerpos interactúan con los antígenos del virus provocando la formación de los complejos inmunes antígeno-anticuerpo, los cuales por si mismos son capaces de activar el metabolismo del ácido araquidónico en los neutrofilos, éste metabolismo da origen a la formación de algunos productos de degradación que son capaces de lisar células, como es el caso de la formación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), superóxido ( $O_2^-$ ) entre otros, estos en parte son capaces de mediar la patogénesis de la infección provocada por el VRS, como son el daño tisular directo y la broncoconstricción (30).

Por otro lado se ha observado que las células que tienen mayor capacidad para mediar la recuperación de este tipo de infección son los polimorfonucleares, en seguida se encuentran los macrófagos y en último lugar los linfocitos. Esta capacidad fué estudiada en base a la capacidad de mediar la destrucción de células infectadas por el VRS, se

sabe que los polimorfonucleares son los más eficaces mediadores de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (28), lo que fortalece la hipótesis de que son estas células las que juegan un papel principal en la defensa antiviral. A este fenómeno se le considera potenciador junto con el complemento, debido a una interacción del complemento con las células efectoras (polimorfonucleares para la destrucción de células blanco (células infectadas por virus).

En otro estudio (9) se observó que los niños pequeños que padecen enfermedades como la neumonía y la bronquiolitis presentan algunos datos como los siguientes: presencia de anticuerpos neutralizantes que están relacionados con la severidad de estos padecimientos; la neumonía tiene una relación inversa al nivel de anticuerpos y la bronquiolitis ninguna; la presencia de anticuerpos fijadores de complemento no se pudo relacionar con la presencia de anticuerpos neutralizantes y el aumento de la gravedad de los padecimientos.

Otro aspecto que se ha observado es que las dos glicoproteínas del virus tienen poder inmunogénico, pero al ser inactivadas con formalina, ésta cambia sus estructuras y/o altera los epítopes de estas proteínas produciendo una respuesta pobre de anticuerpos del tipo neutralizante para la proteína G y alto para la proteína F. No obstante los niveles son inferiores a los producidos por individuos que adquirieron la infección de la cepa salvaje. El nivel de protección de esta respuesta es inverso al aumento de este tipo de anticuerpos y pueden provocar una reacción inflamatoria muy parecida a la de Arthus. Esta reacción es característica y muy conocida, ya que según pudo

observar Arthus, la administración de antígeno a un animal que ya posee anticuerpos precipitantes para este antígeno era la forma de desencadenar una reacción inflamatoria. Esta reacción es más tardía que una reacción de hipersensibilidad inmediata pero más precoz que una reacción de inmunidad celular. Esta inflamación ha sido clasificada dentro del tipo III según Gell y Coombs la cual es producida por la interacción hística entre el antígeno y el anticuerpo dando como resultado una inflamación destructiva de los pequeños vasos sanguíneos.

La patogenia de este tipo de enfermedades puede resumirse de la siguiente manera:

- Formación de los complejos antígeno-anticuerpo (generalmente en exceso de antígeno).
- Fijación del complemento por los complejos antígeno-anticuerpo.
- Liberación de los complejos quimiotácticos del complemento para los leucocitos.
- Daño a las plaquetas, causado por la liberación de las enzimas vasoactivas.
- Aumento de la permeabilidad vascular.
- Localización de los complejos antígeno-anticuerpo en las paredes de los vasos.
- Mayor fijación de complemento y liberación de factores quimiotácticos.
- Infiltración de leucocitos, polimorfonucleares.
- Ingestión de los complejos inmunes por los neutrófilos y liberación de enzimas lisosómicas.

- Daño de la células adyacentes y a los tejidos por las enzimas lisosómicas.
- Deposito de fibrina.
- Regresión y cicatrización, si la lesión es debida a una sola dosis de antígeno o a un depósito crónico e inflamación, si hay formación continua de complejos inmunes.

Otro aspecto de interes es que como su nombre lo indica el Virus Respiratorio Sincicial tiene una marcada preferencia para infectar el sistema respiratorio, y es en las membranas mucosas de la nariz, garganta y a veces en la laringe en donde lleva a cabo su replicación, pero en la tantes esta replicación se disemina en ocasiones hasta la tráque, bronquios, bronquiolos y alvéolos (17).

Un aspecto adicional es que se han observado por lo menos tres variantes antigénicas entre el reducido número de cepas VRS estudiadas. No obstante, la reacción inmunológica cruzada entre variantes es demasiado grande para que este justificada una división como tipos distintos, y además las diferencias antigénicas advertidas no parecen acentuar se en epidemias progresivas. Cada variante tiene un antígeno de superficie específico, que puede identificarse mediante pruebas de neutralización en cultivos de tejidos con suero de hurón infectado. Tanto los viriones purificados como los extractos de células infectadas tienen un antígeno de superficie específico del virus y un antígeno soluble en la nucleocápside, que puede ser detectado por titulación de anticuerpos fijadores de complemento, y que es común a todas las cepas de VRS pero no a otros virus que se incluyen en el mismo grupo de los paramixovirus.

Probablemente el antígeno soluble sea idéntico al antígeno interno de la partícula vírica, al igual que ocurre con el virus de la influenza (21).

El virus presenta varias diferencias antigénicas con respecto a la familia en la que se le ha incluido, Paramixovirus; estas son que no posee actividad hemolítica, hemaglutinante, de hemadsorción, ni neuraminidásica, a pesar de sus características estructurales (17,19,20,21).

### 3.3.1

#### DIAGNOSTICO DE INFECCION POR VRS.

El diagnóstico de la infección por VRS en general se realiza tomando en cuenta sus características, de las que se puede hacer uso para llevar a cabo metodologías adecuadas. En cuanto a estas metodologías, podemos mencionar que -- existe un gran número de ellas y diversas variantes de las mismas; algunas de ellas se describen someramente a continuación:

- a. Aislamiento y/o identificación de VRS en cualquiera de los fluidos biológicos comunes, exudados orofaríngeos y nasales, o con un mayor grado de seguridad en lavados de algunos órganos respiratorios (18). El aislamiento por lo general se realiza en la forma tradicional inoculando las muestras en cultivos celulares; esta metodología es la que presenta la mayor sensibilidad y seguridad, pero tiene la desventaja del tiempo tan prolongado de incubación (4 a 8 días) se requiere el virus para mostrar sus efectos citopáticos característicos, por un lado, y por el otro la debida a la inestabilidad del virus, aunque la pérdida de su poder infeccioso es mínima cuando la inoculación de las células se realiza en un período no mayor de 4 horas después de haber sido tomada la muestra (27).
  
- b. La identificación del VRS se puede realizar directamente a partir de las muestras obtenidas de cultivos celulares infectados, aunque como ya se mencionó anteriormente el tiempo de incubación de las células es

largo y cuando es necesario efectuar un diagnóstico - rápido es imposible esperar un período de 3 días, de ahí que el método de identificación se efectúa directamente en las muestras biológicas obtenidas.

Para llevar a cabo esta metodología, una de las técnicas más usuales es la inmunofluorescencia, que puede realizarse en dos formas; directa o indirecta. Estas técnicas se pueden llevar a cabo en un lapso de tiempo muy corto, no mayor de 2 horas, lo que representa la principal ventaja de la metodología; como desventajas pueden mencionarse el alto costo de los reactivos y aparatos utilizados, además de requerir personal especializado. Esta técnica es una de las más utilizadas a nivel de instituciones de investigación, como lo demuestra un gran número de estudios realizados con ella (5,31,32), ya que muestra además una gran especificidad y sensibilidad.

Existen otras metodologías más sofisticadas para la realización de este trabajo diagnóstico, como la técnica de ELISA (5), que actualmente es utilizada sobre todo para la cuantificación de anticuerpos específicos en sueros de pacientes (diagnóstico inmunoserológicos), pero que también puede ser aplicada para la detección del antígeno viral. Del método ELISA existen diversas variantes, como lo demuestran algunas investigaciones (33,34,35), incluyendo el uso de anticuerpos monoclonados para obtener mayor especificidad.

Los métodos de base inmunoserológica hoy en día siguen -- siendo muy utilizados, entre los cuales se encuentran la cuantificación de anticuerpos específicos por inhibición

de la hemaglutinación (36), fijación del complemento, neutralización - en general cualquier metodología que sirva para cuantificación de anticuerpos en suero. La especificidad y utilidad de estas técnicas es variable, por lo que se deben analizar las ventajas y desventajas de cada método para la aplicación en particular que se le va a dar.

#### METODO DE FIJACION DEL COMPLEMENTO.

Como se mencionó anteriormente todos los métodos poseen - desventajas, en el presente trabajo se utilizó la técnica de fijación de complemento debido a un gran número de razones; entre ellas se pueden enumerar las siguientes:

- a. La técnica es sencilla en su manipulación.
- b. Los reactivos son de fácil adquisición.
- c. Se requiere un tiempo relativamente corto para efectuarla.
- d. Existe una gran seguridad en lo que se refiere a resultados, ya que se mencionó en el capítulo anterior, el VRS no comparte antígenos con ningún otro virus de la misma familia y aunque se han descubierto algunas variantes en las cepas, esta separación no es necesario efectuarla para el presente trabajo.
- e. Se requieren pequeñas cantidades de muestra y la sensibilidad es alta.
- f. No requiere de gran habilidad práctica.

Estas ventajas demuestran sobradamente el por que se utiliza esta técnica con mucha frecuencia hoy en día, cuando existen técnicas muy sofisticadas como el de ELISA ó Inmuno fluorescencia etc.

La técnica, como se mencionó, presenta desventajas y entre ellas podemos mencionar;

- Que se debe realizar un estricto control sobre los -- reactivos, ya que además de contar con sueros control (positivo y negativo), se deban incluir en las placas;
- a. Control de antígeno, de complemento y de la solución amortiguadora, cuya finalidad es verificar que ninguno de estos reactivos sean capaces por si mismos de lisar glóbulos rojos de carnero, ya que esto se utiliza como revelador, e implicaría resultados erróneos.
- b. Control de suero, ya que existe la posibilidad de -- que algunas muestras aún después de la desactiva-- ción del complemento posean la capacidad de anticomplementaridad.

Estas desventajas pueden considerarse mínimas si tomamos en cuenta las ventajas tanto económicas como prácticas -- que tienen esta metodología.

### 3.4.0

#### POSIBILIDAD DE PREVENCIÓN

En este capítulo hay poco que tratar, pues a través de numerosas investigaciones no se ha podido desarrollar un programa preventivo adecuado, ya que se han presentado respuestas adversas a las vacunas o bien ineficiencia de las mismas.

Como se ha visto, el VRS es uno de los agentes patógenos que con frecuencia ataca principalmente a los niños menores de un año de edad, de ahí la importancia y necesidad de encontrar un método preventivo que permita reducir las tasas de morbilidad y mortalidad.

Se han realizado estudios con vacunas inactivadas de VRS para propiciar una respuesta inmune adecuada y prevenir así los daños ocasionados por la infección; sin embargo, se ha observado sobre todo en los lactantes que han recibido estas vacunas, que pueden presentar la enfermedad con mayor grado de severidad que el observado en los no vacunados. Estas vacunas en general producen un aumento en el nivel de anticuerpos pero éstos no muestran ser protectores y por tanto no evitan contraer una bronquiolitis posteriormente. En base a estos resultados se han formulado hipótesis que expliquen este fenómeno inmunológico; por hipersensibilidad retardada, por depósito de complejos inmunes tipo Arthus sobre la pared bronquial o por una reacción alérgica mediada por IgE (37,38).

También se ha pensado en la participación de un fenómeno

inmunológico asociado a la bronquiolitis por VRS en los lactantes que tienen anticuerpos transferidos pasivamente por la madre, en cuyo caso se consideran varias posibilidades;

- a. Los antígenos virales, acoplados con la Ig G específica de la madre, pueden producir complejos inmune antígeno-anticuerpos.
- b. Los anticuerpos maternos pueden tener un efecto inmunológico supresor sobre la respuesta inmunitaria del niño hacia el virus.
- c. Las infecciones previas inaparentes pueden también actuar como un estímulo sensibilizante, provocando una mayor respuesta inmunitaria a una infección subsecuente (14).

Al respecto, Jawetz menciona que en la actualidad los anticuerpos transmitidos de la madre al feto no lo protegen de la infección, y que por ello provoca una reacción de tipo alérgico debido a una reacción de hipersensibilidad inmediata, debido a las alteraciones producidas por los complejos virus Ig E, ya que se ha observado que estos niños presentan en sus secreciones nasales, histamina e IgE anti-VRS, cuando en el enfermo se presentan las reacciones graves del cuadro clínico (20).

La otra opción es la vacunación con el VRS, la que se ha encaminado a la producción de anticuerpos locales, del tipo Ig A, inoculando el virus atenuado por vía nasal, aunque hasta el momento esto no ha tenido resultados satisfactorios debido a que el grado de atenuación es variable

y las vacunas no son muy estables. Esto deja sin esperanza momentáneamente a la vacunación como método de prevención, por lo que es necesario realizar mayores investigaciones, tal vez con cepas mutantes del VRJ (39).

Otro aspecto que se ha tratado de abordar es la utilización de Interferón como medida de control, aunque todos los estudios que se han realizado al respecto, han resultado infructuosos; las cantidades de Interferón requeridas para este fin han sido tan elevadas, que el tratamiento resultaría muy costoso pues la obtención de Interferón resulta muy problemática, y además no es satisfactorio su efecto antiviral (35,40,41,42).

El método que hasta la fecha ha tenido mayor eficiencia es la aplicación de un fármaco denominado ribavirina, administrado en aerosol continuo de 3 a 6 días en lactantes hospitalizados, y que además reduce la diseminación del virus (20).

El empleo de este fármaco tiene como limitante la realización de un diagnóstico preciso y temprano de la infección que algunas veces suele ser inaparente aún después de 2 semanas.

#### 4.0.0 TRABAJO EXPERIMENTAL

4.0.1 Material biológico.

4.0.2 Material de laboratorio y aparatos.

4.0.3 Reactivos y materiales biológicos.

4.1.0 Métodos (Inmunoserología).

#### 4.0.0

##### TRABAJO EXPERIMENTAL

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo el índice de morbilidad y mortalidad para las infecciones respiratorias causadas principalmente por el Virus Respiratorio Sincicial, es muy alta en niños cuya edad se encuentra entre 0 y 6 meses de edad, y ya que en nuestro país no se encuentran estudios seroepidemiológicos al respecto, se ha hecho el presente trabajo, el cual ha tenido como finalidad obtener algunos datos de frecuencia y potencial patogénico de este virus en nuestro medio.

Se estudió un grupo de niños menores de 5 años, de los cuales se obtuvo el material biológico necesario para determinar el título de anticuerpos específicos contra el VRS. El número de muestras obtenidas fué de 108.

#### 4.0.1

##### MATERIAL BIOLÓGICO

- a. Sangre total obtenida por punción venosa en aquellos niños cuya edad era superior a 6 meses de edad.
- b. En aquellos niños cuya edad era menor de 6 meses, la muestra fué obtenida por punción capilar, centrifugada después de la retracción del coágulo.

Los sueros así obtenidos se guardarón en congelación hasta el día de su procesamiento.

#### 4.0.2

##### MATERIAL DE LABORATORIO Y APARATOS.

- . Microdilutores de 0.025 ml
- . Tubos de ensayo de 13 X 100 ml
- . Pipetas graduadas de 1.0 ml
- . Pipetas graduadas de 5.0 ml
- . Pipetas graduadas de 10.0 ml
- . Pipetas pasteur
- . Bulbo para pipeta
- . Placas para microtitulación de fondo en U
- . Micropipetas de 0.025 ml
- . Micropipetas de 0.05 ml
- . Gradilla para tubos
- . Matrazes volumétricos de 100 ml y 1000 ml
- . Estufa de incubación a 37°C
- . Baño maria a 56°C
- . Refrigerador a 7°C
- . Congelador a -20°C
- . Refrigerador REVCO de -70°C
- . Tanque de nitrógeno líquido

#### 4.0.3

##### REACTIVOS Y MATERIALES BIOLÓGICOS.

1. Antígeno del Virus Respiratorio Sincicial.
2. Complemento (suero de cuy).
3. Glóbulos rojos de carnero.
4. Hemolisina.
5. Solución de Alsever.
6. Solución amortiguadora de Veronal (GBV).
7. Solución salina fisiológica (NaCl al 0.85%).
8. Control suero negativo.
9. Control suero positivo.

##### Preparación.

##### Antígeno de VRS.

Se obtiene en forma comercial preparado en células Hep-2.

##### Complemento.

Se encuentra en el suero de cobayo y para obtenerlo se deberá sangrar a varios cobayos y la sangre se recibirá en tubos de 13 X 100 mm, mantenerlos en hielo en espera a que se retraiga el coágulo, posteriormente se centrifuga duran

te 20 minutos a 3000 r.p.m. en una centrifuga refrigerada y se separa el suero repartiéndolo en alícuotas de 1.0 ml se titula y se guarda inmediatamente en congelación a --70°C hasta el momento de usarse.

#### Eritrocitos de carnero.

Para obtenerlos se sangra al carnero y se recibe la sangre (50 ml aprox.) en 100 ml de solución Alsever estéril; se guarda a 4°C y se dejan madurar aproximadamente una semana.

#### Hemolisina.

(Anticuerpos anti-eritrocitos de carnero), preparados de conejos y se prepara de la siguiente manera:

El conejo seleccionado se inócula durante 6 días consecutivos por vía intravenosa con 1.0 ml/Kg de peso (de una suspensión al 10% de eritrocitos de carnero). Al término de este período el conejo es sangrado y se obtiene el suero, cuyo título generalmente se encuentra entre 500 y 1 500 U. de hemolisis/ml. En este trabajo se utilizó hemolisina en glicerol al 50%, producida en México por Microlab.

#### Solución de Alsever.

La fórmula contiene:

|                  |             |
|------------------|-------------|
| Dextrosa         | 20.50 g     |
| Citrato de sodio | 8.00 g      |
| Acido cítrico    | 0.55 g      |
| Cloruro de sodio | 4.20 g      |
| Agua destilada   | 1 000.00 ml |

ajustar el pH a 6.2 adicionando ácido cítrico y proceder a esterilizar por filtración de membrana y guardar a 4°C.

Solución amortiguadora de Veronal (GLV)  
(solución stock 5x)

En un matraz de 2 litros agregar:

|                                   |          |    |
|-----------------------------------|----------|----|
| Agua destilada                    | 1 500.00 | ml |
| Cloruro de sodio                  | 83.00    | g  |
| 5,5-Dietilbarbiturato<br>de sodio | 10.19    | g  |
| Acido clorhídrico 1 N             | 34.58    | ml |
| Cloruro de magnesio $6H_2O$       | 1.02     | g  |
| Cloruro de calcio $2H_2O$         | 0.22     | g  |

esterilizar la solución utilizando el método de filtración por membrana (0.2 micras de porosidad), para usarse se usará a una dilución de 1:5.

Solución salina fisiológica.

(Cloruro de sodio a una concentración de 0.85%O.

esterilizar la solución en autoclave a 121°C por un lapso de 15 minutos y guardarse en refrigeración a 4°C hasta el momento antes de usarse y ponerse a temperatura ambiente.

Suero control negativo.

(producto adquirido comercialmente).

Suero control positivo.

(producto adquirido comercialmente.

**4.1.0 METODOS (IMUNOSEROLOGIA)**

## METODO DE FIJACION DE COMPLEMENTO.

La técnica de fijación de complemento descrita aquí representa un método bien estandarizado, utilizado ampliamente ya que es una técnica relativamente simple que permite el diagnóstico de una gran variedad de especies virales y de algunas rickesias.

Para un buen desarrollo de la metodología es importante tener un control estricto sobre los reactivos que se van a utilizar de la siguiente manera:

- Suspensión de eritrocitos.
- a. Lavar los eritrocitos con solución salina isotónica -- por centrifugación; los lavados se deberán realizar -- por un tiempo de 8 minutos a 2000 r.p.m 3 veces.
- b. Resuspender los eritrocitos con solución salina para -- obtener una suspensión al 2 %.
- c. Lisar 0.8 ml del paquete con 3.2 ml de agua destilada para obtener una solución estándar colorimétrica.
- d. Determinar la D.O de la hemoglobina liberada de 550 nm usando una cubeta de 12 X 75 mm.
- e. Ajustar la suspensión de células a 0.470 de D.O. Esto representa aproximadamente 17.2 ml de GVB + 0.25 ml del paquete celular.

- Hemolisina.

- a. Hacer la titulación en tubos de 13 X 100 mm de la siguiente manera:

| Tubo | Dil.final | GVE (ml) | Dilución | Volumen (ml) |
|------|-----------|----------|----------|--------------|
| 1    | 1:1000    | 4.5      | 1:100    | 0.5          |
| 2    | 1:6000    | 5.0      | 1:1000   | 1.0          |
| 3    | 1:8000    | 7.0      | 1:1000   | 1.0          |
| 4    | 1:10000   | 9.0      | 1:1000   | 1.0          |
| 5    | 1:15000   | 0.5      | 1:10000  | 1.0          |
| 6    | 1:20000   | 1.0      | 1:10000  | 1.0          |
| 7    | 1:25000   | 1.5      | 1:10000  | 1.0          |

- b. Hacer una dilución del complemento, 1:30 en GVB

- c. Hacer una suspensión de eritrocitos al 2%.

- d. Hacer un control de eritrocitos

| Tubo # | Hemolisina (ml) de C/dilución (1:6000 a 1:25000) | C' (1:30) (ml) | G.R al 2% (ml) | GVB (ml) |
|--------|--|----------------|----------------|----------|
| 1      | 0.2  | 0.1            | 0.2            | 0.5      |
| 2      | 0.2  | 0.1            | 0.2            | 0.5      |
| 3      | 0.2  | 0.1            | 0.2            | 0.5      |
| 4      | 0.2  | 0.1            | 0.2            | 0.5      |
| 5      | 0.2  | 0.1            | 0.2            | 0.5      |
| 6      | 0.2  | 0.1            | 0.2            | 0.5      |
| 7      | 0.2  | 0.1            | 0.2            | 0.5      |

mezclar e incubar en un baño a 37°C durante 30 minu-

tos y leer finalmente. La dilución más alta de hemolisis que presente hemólisis total, representa una unidad. La prueba se trabaja con 2 Unidades.

Para obtener las dos unidades se divide el título de máxima hemólisis entre dos.

ejemplo:

Si el título de máxima hemólisis es de 1:10000 esto equivale a una unidad.

$$\frac{1000}{2} = 5.000$$

esto nos indica que para utilizar la hemolisina será necesario hacer una dilución 1:5000 para tener dos - unidades.

- Titulación del complemento  
se realiza en tubos de 12 x 75 mm.
- a. Colocar 8 tubos identificados en una gradilla.
- b. Hacer una dilución del antígeno para tener 2 unidades ó sea el título reportado entre dos y realizar esta - dilución.

ejemplo:

sí el antígeno tiene un título de 1:64

$$\frac{64}{2} = 32$$

La dilución necesaria es de 1:32 ó sea una parte de - antígeno más 31 partes de GVB.

- c. Una vez realizada la dilución agregar a cada tubo - 0.2 ml de antígeno.
- d. Del complemento hacer una dilución inicial de 1:30 y agregarlos de la siguiente manera a cada tubo:

| Tubo     | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8        |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|----------|
| Ag (2 U) | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.2 (ml) |
| C (1:30) | 0.13 | 0.12 | 0.11 | 0.10 | 0.09 | 0.08 | 0.07 | 0.08(ml) |
| Buffer   | 0.27 | 0.28 | 0.29 | 0.30 | 0.31 | 0.32 | 0.33 | 0.34     |

Incubar 30 minutos a 37°C

GR 2%  
sensibilizados. 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 (ml)

- Sensibilización de los eritrocitos.
- a. Hacer una dilución correspondiente a 2 Unidades de - hemolisina.
- b. Preparar una suspensión de glóbulos rojos al 2%.
- c. Agregar un volumen de hemolisina y un volumen de la suspensión de eritrocitos. Agitar con cuidado e incubar durante 15 minutos a 37°C.

Nota:

La adición de la hemolisina se deberá hacer lentamente.

- Titulación del complemento.

Una vez descongelado el suero de cobayo a 37°C, reconstituido el antígeno y sensibilizados los eritrocitos, se procede de la siguiente manera:

- a. Colocar los 8 tubos de 13 X 100 mm las siguientes - cantidades de reactivos según lo indica la tabla:

| Tubo | Ag (2 U) ml | C' (1:60)ml | GVB ml |
|------|-------------|-------------|--------|
| 1    | 0.10        | 0.12        | 0.8    |
| 2    | 0.10        | 0.11        | 0.9    |
| 3    | 0.10        | 0.10        | 0.10   |
| 4    | 0.10        | 0.09        | 0.11   |
| 5    | 0.10        | 0.08        | 0.12   |
| 6    | 0.10        | 0.07        | 0.13   |
| 7    | 0.10        | 0.06        | 0.14   |
| 8    | 0.10        | 0.05        | 0.15   |

agitar los tubos e incubar a 37°. durante 30 minutos.

- b. Leer los tubos.

- c. Interpretación.

El tubo que contenga la menor cantidad (volumen) de complemento y que muestre hemólisis total, representa una unidad. En la prueba se emplean dos unidades, ejemplo:

Si el tubo con 0.09 ml de complemento diluido 1:60. - muestra hemólisis, esto equivale a una unidad. Por lo tanto 2 unidades serán:

$$2 U = 0.09 \times 2 = 0.18 \text{ de la dil. } 1:60$$

$$\frac{60}{0.18} \times 0.1 = 1:33$$

esto nos indica que se requiere hacer una dilución 1:33 para poder utilizar el complemento.

- Título del antígeno.

Se basa en mezclar diluciones seriadas del antígeno en tubos y diluciones seriadas del suero inmune (control positivo) para determinar la dilución óptima - del antígeno que produzca una buena fijación del complemento.

- a. Hacer diluciones seriadas del suero usando microdilutores de 0.025 ml.
- b. Preparar diluciones seriadas del antígeno en tubos - hasta una dilución 1:64; agregar 0.025 ml de cada dilución de antígeno a la cavidad correspondiente
- c. Se incluye un control de complemento para cada dilución del antígeno, agregando: 2.0 , 1.5 , 1.0 y 5.0 unidades de complemento.
- d. Agregar 0.025 ml de GVB a los eritrocitos del complemento.
- e. Agitar la placa, cubrir e incubar toda la noche a - 4°C.

- f. Dejar la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente, adicionar 0.05 ml de la suspensión de eritrocitos sensibilizados a cada cavidad.
- g. Agitar e incubar a 37°C de 15 a 30 minutos hasta que los controles del complemento estén hemolizados.
- h. Interpretación.

La placa deberá quedar como indica la siguiente figura. La máxima dilución de antígeno que muestre fijación de complemento 3<sup>+</sup> ó 4<sup>+</sup> con la mayor dilución del suero registrará una unidad, se ajusta a 2 U, agregando 0.025 ml de la dilución del antígeno.

| Dil. Ag | Diluciones suero |      |      |      |       | Controles |                |
|---------|------------------|------|------|------|-------|-----------|----------------|
|         | 1:8              | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | suero     | O <sub>1</sub> |
| 1:2     | ○                | ○    | ○    | ○    | ○     | ○         | ○              |
| 1:4     | ○                | ○    | ○    | ○    | ○     | ○         | ○              |
| 1:8     | ○                | ○    | ○    | ○    | ○     | ○         | ○              |
| 1:16    | ○                | ○    | ○    | ○    | ○     | ○         | ○              |
| 1:32    | ○                | ○    | ○    | ○    | ○     | ○         | ○              |
| 1:64    | ○                | ○    | ○    | ○    | ○     | ○         | ○              |

- Descomplementación de los sueros.
  - a. Descongelar los sueros a temperatura ambiente.
  - b. Colocar los tubos que contienen las muestras de suero en un baño de agua a 56°C durante 30 minutos.
  
- Prueba de fijación del complemento.
  - a. Colocar 0.025 ml de amortiguador en cada una de las cavidades.
  - b. Colocar 0.025 ml de la muestra de suero (previamente complementada) en la primera cavidad; correr por duplicado cada columna.
  - c. Hacer la dilución del suero con los microdilutores; - agitar y tomar de esta primera dilución, 0.025 ml para la siguiente cavidad (b) agitar nuevamente y tomar 0.025 ml para (c) y así sucesivamente hasta la cavidad final; de esta última tomar también 0.025 ml de la muestra y deshecharlos.
  - d. Agregar 0.025 ml de antígeno con 2 U a la primera columna de cada suero por columna (1,2,3,... etc.) al duplicado no agregar el antígeno (columna 1',2',3',... etc.) ya que es el control de anticomplementariedad.
  - e. Agregar 0.025 ml del complemento diluido a 2 U que en

nuestro caso es de 1:28.

- f. Agitar e incubar en refrigeración a 4°C, durante 24 - horas.
- g. Sensibilizar los eritrocitos con el método mencionado anteriormente.
- h. Agregar a cada cavidad 0.05 ml de la suspensión de -- eritrocitos sensibilizados.
- i. Incubar a 37°C durante 1 hora.
- j. Interpretación de la placa.

El título se obtendrá en la cavidad de mayor dilución donde no se presente hemólisis, y se expresa como la recíproca de esa dilución.

Nota;

La placa deberá mostrar un control para eritrocitos y otro para el complemento, así como un control de antígeno y otro del diluyente.

## 5.0.0 RESULTADOS

Se analizaron un total de 108 muestras, de niños cuyas edades oscilaban entre 1 y 5 años, de las cuales 60 muestras correspondieron a niños y 48 muestras a niñas. (Cuadro No. 1)

Las muestras fueron tomadas en el período comprendido del mes de mayo al mes de noviembre de 1988, de pacientes hospitalizados en el Servicio de Pediatría del Centro Médico Naval. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa cuando fue posible, dadas las características y edad del niño, o por punción capilar; las muestras así obtenidas fueron conservadas en congelación a 20°C hasta el momento de la prueba en el Laboratorio de Virología de la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Se realizó la titulación de los anticuerpos contra el VRS por la técnica de Fijación del complemento (RFC'), previamente estandarizada.

En el cuadro No. 1 se muestran los cuadros de los resultados de las 108 muestras analizadas, en un resumen porcentual de positivas.

El análisis de los títulos de anticuerpos contra el VRS - encontrados permitió calcular los porcentajes de seropositividad, obtenidos para cada grupo poblacional separados por sexo; en el cuadro No.2, se puede observar que no hay una diferencia significativa entre los porcentajes de seropositividad en uno y otro grupo.

Por otro lado se analizó también el porcentaje de casos -

que registrarón títulos de anticuerpos fijadores de complemento de 1:4 a 1:128; para fines prácticos, los títulos obtenidos de 1:2 ó menores, fuerón considerados negativos (cuadro No.3) pudiéndose observar que en general los títulos obtenidos fuerón bajos, ya que en sólo 4 casos se detectarón títulos superiores a 1:32; ésto pudo ser debido a que la población estudiada de niños no presentaba signos o síntomas característicos de la infección provocada por VRS, ya que las muestras correspondieron en su mayoría a niños que se encontraban sanos desde el punto de vista de aparato respiratorio, y la muestra les fué tomada únicamente para obtener un perfil inmunológico.

Con los datos obtenidos se calcularón los casos seropositivos encontrados para los meses de mayo, julio, septiembre y noviembre, con el objeto de estudiar un posible comportamiento estacional de la infección; sin embargo, con los resultados obtenidos no se puede de manera definitiva reportar algún resultado de frecuencia estacional, ya que el número de muestras analizadas en el período de estudio es insuficiente, pero de alguna manera brindan un panorama general del estado inmunológico en el que se encuentra la población infantil estudiada en nuestro medio (Cuadro No. 4).

A reserva de confirmación, tal parece que sí existe un aumento estacional durante el invierno, en base a la presencia de anticuerpos, lo cual no necesariamente refleja la frecuencia de enfermedad, esto es, la morbilidad.

|                                   | NIÑOS | NIÑAS | TOTAL |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|
| Número de muestras                | 60    | 48    | 108   |
| Número de muestras positivas.     | 20    | 14    | 34    |
| Porcentaje de muestras positivas. | 18.51 | 12.96 | 31.48 |

Cuadro No. 1

Continuación.

| No. | Sexo | Título | No. | Sexo | Título |
|-----|------|--------|-----|------|--------|
| 55  | F    | -      | 82  | M    | -      |
| 56  | F    | -      | 83  | M    | -      |
| 57  | M    | 1:8    | 84  | M    | -      |
| 58  | F    | -      | 85  | M    | 1:8    |
| 59  | F    | -      | 86  | F    | -      |
| 60  | M    | -      | 87  | F    | -      |
| 61  | F    | 1:4    | 88  | M    | 1:16   |
| 62  | M    | 1:8    | 89  | F    | -      |
| 63  | F    | -      | 90  | M    | -      |
| 64  | M    | -      | 91  | F    | -      |
| 65  | M    | -      | 92  | M    | -      |
| 66  | F    | -      | 93  | M    | 1:32   |
| 67  | M    | -      | 94  | M    | 1:16   |
| 68  | F    | -      | 95  | F    | -      |
| 69  | M    | -      | 96  | M    | -      |
| 70  | F    | 1:16   | 97  | F    | -      |
| 71  | F    | -      | 98  | M    | 1:8    |
| 72  | M    | -      | 99  | M    | 1:8    |
| 73  | M    | 1:8    | 100 | F    | -      |
| 74  | M    | -      | 101 | F    | -      |
| 75  | F    | 1:32   | 102 | F    | -      |
| 76  | F    | 1:16   | 103 | M    | -      |
| 77  | F    | -      | 104 | F    | 1:4    |
| 78  | M    | -      | 105 | F    | -      |
| 79  | F    | -      | 106 | F    | -      |
| 80  | M    | -      | 107 | F    | 1:8    |
| 81  | F    | 1:8    | 108 | F    | 1:8    |

Cuadro No. 2

| No. | Sexo | Título | No. | Sexo | Título |
|-----|------|--------|-----|------|--------|
| 1   | M    | -      | 28  | F    | -      |
| 2   | M    | -      | 29  | M    | 1:8    |
| 3   | F    | 1:4    | 30  | M    | -      |
| 4   | M    | 1:4    | 31  | F    | -      |
| 5   | F    | -      | 32  | F    | 1:8    |
| 6   | F    | 1:8    | 33  | F    | -      |
| 7   | M    | -      | 34  | M    | 1:64   |
| 8   | F    | -      | 35  | F    | -      |
| 9   | M    | 1:4    | 36  | M    | -      |
| 10  | M    | -      | 37  | M    | -      |
| 11  | F    | 1:16   | 38  | M    | -      |
| 12  | M    | 1:8    | 39  | M    | -      |
| 13  | M    | -      | 40  | M    | -      |
| 14  | M    | 1:32   | 41  | F    | -      |
| 15  | F    | -      | 42  | F    | -      |
| 16  | F    | -      | 43  | M    | -      |
| 17  | M    | -      | 44  | M    | 1:4    |
| 18  | M    | -      | 45  | M    | -      |
| 19  | F    | 1:8    | 46  | F    | -      |
| 20  | F    | -      | 47  | M    | -      |
| 21  | F    | 1:8    | 48  | M    | -      |
| 22  | M    | 1:16   | 49  | F    | 1:8    |
| 23  | M    | 1:8    | 50  | M    | -      |
| 24  | M    | 1:8    | 51  | F    | -      |
| 25  | F    | -      | 52  | M    | -      |
| 26  | M    | -      | 53  | M    | -      |
| 27  | M    | -      | 54  | M    | -      |

Cuadro No. 2

| Títulos | Muestra de niños | Muestrasde niñas |
|---------|------------------|------------------|
| 1:2     | -                | -                |
| 1:4     | 3                | 3                |
| 1:8     | 10               | 8                |
| 1:16    | 4                | 2                |
| 1:32    | 2                | 1                |
| 1:64    | 1                | 0                |
| 1:128   | -                | -                |

Cuadro No. 3

| Mes               | Niños      | Niñas      | Total       |
|-------------------|------------|------------|-------------|
| Abril-Mayo        | 9 (26.47%) | 6 (17.64%) | 15 (44.11%) |
| Junio-Julio       | 3 ( 8.82%) | 2 ( 5.88%) | 5 (14.70%)  |
| Agosto-Septiembre | 3 ( 8.82%) | 3 ( 8.82%) | 6 (17.64%)  |
| Octubre-Noviembre | 5 (14.70%) | 3 ( 8.82%) | 8 (23.52%)  |

Cuadro No. 4

## **6.0.0 DISCUSION DE RESULTADOS**

## 6.0.0

### DISCUSION DE RESULTADOS.

En las tablas de resultados que se presentarán en el capítulo anterior podemos observar que los títulos obtenidos durante la prueba experimental no muestran diferencias - significativas, como lo demuestra el análisis estadístico que se presenta en el Anexo No. 1 del presente capítulo.

De los datos obtenidos podemos decir que fueron insuficientes para que se llegará a resultados concluyentes, debido a algunas razones de tipo práctica como la dificultad para obtener muestras de niños menores de 5 años y, además, la dificultad que presentó la adquisición de reactivos -- biológicos, de los cuales algunos de ellos son de importación.

Los controles realizados durante la prueba no presentaron problemas en sus resultados.

### INTERPRETACION DE RESULTADOS.

Análisis estadístico.

Los resultados positivos obtenidos se dividen por sexo te niendo:

Grupo:

|   |    |                                |
|---|----|--------------------------------|
| A | 20 | Casos para el grupo masculino. |
| B | 14 | Casos para el grupo femenino.  |

En primer lugar los resultados expresados en título se cambian al sistema decimal (tabla I), posteriormente se hace un análisis en el que se encontró como más conveniente de aplicar el estadístico U de Mann-Whitney el cual se obtiene al ordenar todas las  $(n_1 + n_2)$  observaciones de acuerdo con su magnitud y al contar las observaciones en la muestra A, que preceden a cada una de las observaciones en la muestra B. El estadístico U es la suma de estos números.

La prueba U de Mann-Whitney.

Se basa en las siguientes observaciones:

1. Hipótesis nula  $H_0$ :  
Las distribuciones de frecuencias relativas de las poblaciones A y B son idénticas.
2. Hipótesis alternativa  $H_a$ :  
Las distribuciones de frecuencias relativas de las poblaciones están desfasadas con respecto a sus ubicaciones relativas (prueba de dos colas), o bien;  
Hipótesis alternativa  $H_a$ :  
La distribución de frecuencias relativas de la población A está desfasada hacia la derecha de la distribución de frecuencias relativas de la población B (véase prueba de una cola).
3. Estadístico de prueba.  
Para una prueba de dos colas utilice U, el valor más pequeño de.

$$U_A = n_1 n_2 + \frac{n_1 (n_1 + 1)}{2} = W_A .$$

y

$$U_B = n_1 n_2 + \frac{n_2 (n_2 + 1)}{2} = W_B .$$

En donde;

$W_A$  y  $W_B$  son las sumas de los rangos para las muestras A y B, respectivamente. Para una prueba unilateral utilice  $U_A$ .

#### 4. Región de rechazo.

- a. Para la prueba de dos colas y un valor dado de  $x$ , rechace  $H_0$  si  $U - U_0$ , en donde  $P(U - U_0) = x/2$ .

Nota:

Obsérvese que  $U_0$  es el valor tal que  $P(U - U_0) = x/2$ , es igual a la mitad de  $x$ .

- b. Para la prueba unilateral y un valor dado de  $x$ , rechace  $H_0$  si  $U_A - U_0$  en donde  $P(U_A - U_0) = x$ .

#### SUPUESTOS.

Se seleccionan las muestras aleatoriamente e independientemente de sus poblaciones respectivas. Los empates en las observaciones se pueden manejar promediando los rangos que se hubieran asignado a las observaciones empatadas y al adjudicar este promedio a cada una. Así, cuando tres observaciones empatan y presentan respectivamente rangos 3,4,5 se les asignaría a las tres el rango 4.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA I

Niños - 60

|    |      |      |
|----|------|------|
| 1  | 1:4  | 0.25 |
| 2  | 1:4  | 0.25 |
| 3  | 1:8  | 0.12 |
| 4  | 1:32 | 0.03 |
| 5  | 1:16 | 0.06 |
| 6  | 1:8  | 0.12 |
| 7  | 1:8  | 0.12 |
| 8  | 1:8  | 0.12 |
| 9  | 1:64 | 0.02 |
| 10 | 1:4  | 0.25 |
| 11 | 1:8  | 0.12 |
| 12 | 1:8  | 0.12 |
| 13 | 1:8  | 0.12 |
| 14 | 1:16 | 0.06 |
| 15 | 1:8  | 0.12 |
| 16 | 1:16 | 0.06 |
| 17 | 1:32 | 0.03 |
| 18 | 1:16 | 0.06 |
| 19 | 1:8  | 0.12 |
| 20 | 1:8  | 0.12 |

 $\bar{X} = 0.1135$  $S = 0.06$ 

TABLA II

Niñas - 48

Total = 108

|    |      |      |
|----|------|------|
| 1  | 1:4  | 0.25 |
| 2  | 1:8  | 0.12 |
| 3  | 1:16 | 0.12 |
| 4  | 1:8  | 0.12 |
| 5  | 1:8  | 0.12 |
| 6  | 1:8  | 0.12 |
| 7  | 1:8  | 0.12 |
| 8  | 1:4  | 0.25 |
| 9  | 1:16 | 0.06 |
| 10 | 1:36 | 0.03 |
| 11 | 1:8  | 0.12 |
| 12 | 1:4  | 0.25 |
| 13 | 1:8  | 0.12 |
| 14 | 1:8  | 0.12 |

 $\bar{X} = 0.1328$  $S = 0.069$ 

P = 0.41 Mann Whitney

P = 0.42 "t" dos colas

P = 0.20 Una cola

7.0.0

CONCLUSIONES

## 7.0.0

### CONCLUSIONES

De los datos obtenidos en general podemos establecer pocas conclusiones; las más importantes, según mi criterio, son las siguientes:

- Aunque las muestras analizadas fueron obtenidas de niños aparentemente sanos, existe un alto índice de datos positivos a la presencia de anticuerpos anti-VRS, lo que indica que es muy común el contacto de los niños con el VRS en la edad estudiada 0-5 años.
- Los títulos obtenidos no pueden ser considerados indicativos del tipo de padecimiento ocasionado, ya que -- como se mencionó anteriormente estos niños eran sanos a la infección por VRS.
- La predisposición de un sexo y otro no se puede precisar en base a los resultados obtenidos, ni tampoco -- fué posible definir su carácter estacional, que si ha sido establecido en otros estudios, según puede verse en algunas de la referencias bibliográficas incluidas en este trabajo.
- Se requieren más investigaciones de tipo sero-epidemiológico para conocer mejor el comportamiento clínico y el potencial infectante y patogénico del virus.

- Los datos obtenidos en el trabajo solo indican prevalencia de Anticuerpos que indirectamente reflejan la incidencia de infección por Virus Respiratorio Sincicial.
  
- Por último es importante mencionar que el trabajo originalmente se inició con vistas a abarcar el estudio de una manera más amplia, haciendo uso de algunos -- otros métodos de diagnóstico (cultivo celular de muestras biológicas para identificación directa o por medio de la técnica de inmunofluorescencia) que no pudieron llevarse a cabo, debido a dificultades de tipo económico y burocrático.

8.0.0

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. SCOTT R.; KAUL A.; GALLAGHER M.; et.al; Respiratory Syncytial Virus-Infection. Am. J. Dis. Child. 132; 1088-1090 (1978).
2. HALL B.C.; GELMAN J.M.; GIGGAR R.; et.al.; Respiratory Syncytial Virus Infections within families. N. Engl. J. Med. 19: 414-418 (1976).
3. MATHUR U.; BENTLEY D.W. and HALL B.C.: Concurrent - Respiratory Syncytial Virus and Influenza A Infections in the Institutionalized Elderly and Chronically III. Ann. Intern. Med. 93; 49-52 (1980).
4. HALL B.C.; HALL W.J.; SPEERS D.M; Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults. Ann. Intern. Med. 88 203-205 (1978).
5. POPOW KRAUFF T.; KERN G.; BINDER C. et.al.; Detection of Respiratory Syncytial Virus in Nasopharyngeal Secretions by Enzymelinked Immunosorbent Assay, Indirect Immunofluorescence, and Virus Isolation; J. - Med. Virol. 19 ; 123-134 (1986).
6. DE SILVA L.M. and HANLON H.G.; Respiratory Syncytial Virus ; A report of a 5-year Study at a Children's Hospital; J. Med. Virol 19 ; 299-305 (1986).

7. SWENSON P.D. and KAPLAN M.H.: Rapid detection of -- Respiratory Syncytial Virus in Nasopharyngeal: Aspirates by a Commercial Enzyme Immunoassay J. Clin. - Microb. 23 ; 485-488 (1986).
8. SMITH T.F.; MCINTOSH K.; FISHAUT M. and HENSON P.M. Activation of Complement by Cells Infected with Respiratory Syncytial Virus ; Infect. Immun. 33: 43-48 (1981).
9. LAMPRECHT C.L.; KRAUSE H.E.; MUFSON M.A.: Role of - Maternal Antibody in Pneumonia and Bronchiolitis - Due to Respiratory Syncytial Virus; J. Infect. Dis. 134 ; 211-216 (1976).
10. COLLIER A.M.; CLYDE W.A. Jr.; HENDERSON F.Q.; et.al. Respiratory Syncytial Virus Infections. Reinfections and Immunity; N. Engl. J. Med. 300 : 530-534 (1979).
11. JACCES J.W.; PEACOCK D.B.; CORNER B.D. et. al. ; - Respiratory Syncytial Virus and other viruses associated with Respiratory Disease in Infants; Lancet 1 ; 871-876 (1971).
12. KIM H.W.; ARROBIO J.O.; BRANDT C.D. et. al; Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus Infection in Washington, D.C. I.- Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of Infection; Am. J. Epidemiol. 98 : 216-225 (1973).

12. KIM. H.W.: ARROBIO J.O.: BRANDT C.D.: et.al; Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus Infection in Washington, D.C.; II.- Infection and disease with -- respect to age, Immunologic status, race and sex; - Am. J. Epidemiol. 98 ; 289-300 (1973).
13. INFECTION DISEASE REPORT OF A WHO SCIENTIFIC GROUP. Technical Report Series 642 ; World health Organization; Geneva 1980.
14. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD ; Infecciones Respiratorias agudas; Publicacion Cientufica No. 493 ; Organizacion Panamericana de la Salud ; Washington D.C. E.U.A. (1985).
15. SARKKINEN H.; RUUSKANEN O.: MEURMAN O. et.al.; Identification of Respiratory Virus Antigens in Middle Ear Fluids of Children with Acute Otitis Media; J. Infect. Dis. 151 : 444-448 (1985).
16. HALL C.B.; DOUGLAS G.R. Jr.; GELMAN J.M. et.al. : Nosocomial Respiratory Syncytial Virus Infections : N. Engl. J. Med. 293 : 1343-1346 (1975).
17. FENNER F. ; WHITE DAVID O. : Virologua Medica ; 2a. Edicion : Editorial La Prensa Medica Mexicana S.A.; Mexico (1981).
18. LENNETTE E.H. and ACHILMIDT N.J. ; Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections, New York 4a. Edicion: American Public Health Association.

19. LURIA S.E.; DARNELL JAMESE Jr.; Virología General ; 1a Edición: Ediciones Omega S.A. : España (1977).
20. JAWETZ, MELNICK, ADELBERE : Microbiología Médica ; 11a. Edición: Editorial El Manual Moderno: México (1985).
21. DAVIS, DULBECCO, EISEN, GINSBERG, WOOD: Tratado de Microbiología: 2a. Edición: SALVAT Editores, S.A. - 1372-1376 (1985).
22. MURPHY B.R.; PRINCE G.A.; WALSH E.E. et.al.: Dissociation between Serum Neutralizing and Glycoprotein Antibody Responses of Infants and children Who Received Inactivated Respiratory Syncytial Virus Vaccine J. Clin. Microbiol. 24 : 197-202 (1986).
23. WAGNER D.K.; GRAHAM B.S.; WRIGHT P.F.; et.al.: Serum Immoglobulin G Antibody Subclass Responses to Respiratory Syncytial Virus F and G Glycoproteins after primary Infection.; J. Clin. Microbiol. 24 : 304-306 (1986).
24. BELSHE R.B.; VAN VORIS L.P. and MUFSON M.A.: Impact of Viral Respiratory Diseases on Infants and young children in a rural and urban area of Southern West Virginia. : Am. J. Epidemiol. 117 : 467-474 (1983).
25. PONS M.W. ; LAMBERT A.L.; LAMBERT D.M. and ROCHOVANSKY O.M.: Improvement of Respiratory Syncytial Virus Replication in Actively growing HEp-2 Cells. : J. Virol. Meth. 7 : 217-221 (1983).

26. MEGURO H.; BRYANT J.D.; TORRENCE A.E. and WRIGHT P. F. : Canine kidney Cell Line for Isolation of Respiratory Viruses.: J. Clin. Microbiol. 9 : 175-179 - (1979).
27. BROMBERG K.; DAIDONE B.; CLARKE L. and SIERRA M.F.: Comparison of Immediate and Delayed Inoculation of HEp-2 Cells for Isolation of Respiratory Syncytial Virus : J. Clin. Microbiol. 20 : 123-124 (1984).
28. GREWAL A.S.; ROUSE B.T. and BABIUK L.A.: Mechanisms of Recovery from Viral Infection of Infected Cells by Neutrophils and Complement. : J. Immun. 124 : - 312-319 (1980).
29. ARENS H.Q.; SWIERKOSZ E.M.; SCHMIDT R.F. et. al. : Enhanced Isolation of Respiratory Syncytial Virus - in Cells Culture.: J. Clin. Microbiol. 23 : 800-802 (1986).
30. FADEW H.; KAUL T.N.; and OGRA P.L.: Activation of - Oxidative and Arachidonic Acid Metabolism in Neutrophils by Respiratory Syncytial Virus Antibody Complexes : Possible Role in Disease.: J. Infect. Dis. 146 : 110-116 (1983).
31. WANER J.L.; WHITERHURST N.J.; JONAS S. et. al.: Isolation of Viruses from Specimens submitted for direct Immunofluorescence test for Respiratory Syncytial Virus.: J. Pediat. 108 : 249-250 (1986).

32. CHEESEMAN S.H.; PIERIK L.T.; LECOMBRUNO D. et. al : Evaluation of a Comercially Available Direct Immung fluorescent Stainig Reagent for the detection of - Respiratory Syncytial Virus in Respiratory Secretions : J. Clin. Microbiol. 24 : 155-156 (1986).
33. HORNSLETH A.; FRIIS B. and KRASILNIKOF P.A.: Detection of Respiratory Syncytial Virus in Nasopharyngeal Secretions by a Biotin-Avidin ELISA more sensitive than thr fluorescent antibody technique :J. Med. Virol. 18 : 113-117 (1986).
34. POTHIER P.; NICOLAS J.C.; DE SAINT MAUR G.P.; et. - al.: Monoclonal Antibodies Against Respiratory Syncytial Virus and their use for Rapid Detection of - Virus in Nasopharyngeal Secretions : J. Clin. Microbiol. 21 : 286-287 (1985).
35. TAYLOR B.; ABBOTT G.D.; KERR M.M. and FERGUSSON -- D.M.: Amoxycillin and co-trimoxazole in presumed vi ral respiratory Infections of childhood : placebo- - controlled trial; D. Med. J. 2: 552-554 (1977).
36. KOBAYASHI N.; NOGUCHI Y.; KOHIMA M. and MATUMOTO M.; Immune Adherence Hemagglutination Test for Detection of Antibody to Respiratory Syncytial Virus. : Arch. Virol. 82 : 95-100 (1984).
37. WELLLIVER R.C.; WONG D.T.; SUM E. et. al.: The Deve- lopment of Respiratory Syncytial Virus-Specific IgE and release of Histamine in Nasopharyngeal secretions after infection.: N. Engl. J. Med. 305 : 841-846 -- (1981).

38. CHAPMAN R.S.; Virus specific IgE and Histamine release in Nasopharyngeal secretions.: N. Engl. J. -- Med. 306 ; 111. (1982).
39. PRINCE C.A.; FORSWOOD R.L.; KOENIG D.W. and CHANOCK R.M.: Antigenic Analysis of a Putative New Strain - of Respiratory Syncytial Virus.: J. Infect. Dis. 151: 634-637 (1985).
40. PANUSARN C.; STANLEY E.D.; DIRDA V.; et. al.: Prevention of Illness from Rhinovirus Infection by a - topical Interferon inducer.: N. Engl. J. Med. 291 : 57-61 (1974).
41. MERIGAN T.C.; HALL T.S.; REED S.E. and TYRRELL D.A. J.; Inhibition of Respiratory Virus Infection by locally applied interferon.: Lancet 17 : 1342-1344 - (1981).
42. PHILLPOTTS R.J.; DELONG D.; WALLACE J. et. al.: The activity of enviroxime against Rhinovirus Infection in man.: Lancet 20 : 1342-1344 (1981).
43. CUNNINGHAM CHARLES H.; Virología Práctica, Traducción 6a. Edición: Editorial Acribia: Zaragoza (1971).

BIBLIOGRAFIA ADICIONAL.

44. DOWHAN M.A.; GARDNER P.S.; SIMS D.G. et. al.: Study of 8 year-old children with a History of Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis in Infancy.: B. -- Med. J.: 1 : 11-14 (1978).
45. KAUL T.N.; WELLLIVER R.C.; WONG D.T. et. al.: Secretory Antibody Responce to Respiratory Syncytial -- Virus Infection.: Am. J. Dis. child. 135 : 1013-1016 (1981).
46. MILLS B.G.; SINGER F.R.; WEINER L.P. and HOLST P.A.: Immunohistological demonstration of Respiratory Syn- cytial Virus Antigens in Paget Disease of bone.: -- Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 1209-1213 (1981).
47. KAUL T.N.; WELLLIVER R.C. and OGRA P.L.: Appearance of complement and Immunoglobulins on nasopharyngeal epithelial cells following naturally acquired infec- tion with Resiratory Syncytial Virus.: J. Med.Virol. 9 : 149-158 (1982).
48. NANDAPALAN N.; TAYLOR C.E.; GREENWELL J. et. al.: Seasonal Variations in Maternal Serum and Mamary -- Immunity to RS Virus: J. Med. Virol. 20 : 79-87 -- (1986).
49. WELLLIVER R.C.; KAUL A. and OGRA P.I.: Cells-media- ted immuns response to Respiratory Syncytial Virus Infection: Relationship to thr development of reac- tive airway disease : J. Pediatr. 94 : 370-375 -- (1979).