



11261
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

7
24

AI SLA MIENTO DEL VIRUS SINCICIAL
RESPIRATORIO DE NIÑOS
HOSPITALIZADOS CON ENFERMEDAD
RESPIRATORIA AGUDA

TESIS CON
FALSA DE OR.GEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

B I O M E D I C A S

P R E S E N T A :

MA. EUGENIA MANJARREZ Z.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	11
OBJETIVOS E HIPOTESIS	30
MATERIALES Y METODOS	31
RESULTADOS	39
DISCUSION	57
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFIA	64

RESUMEN

En el presente trabajo se establecieron las condiciones óptimas para propagar, cuantificar y conservar al virus sincicial respiratorio (VSR), cepa Long. Lo cual se realizó en dos líneas celulares, HEp-2 y Vero a diversas multiplicidades de infección, se determinó la cinética del efecto citopático (formación del sincicio), se estableció la cinética de propagación viral y se probaron diferentes conservadores (sulfato de magnesio 1M y glicerol al 10 %) para mantener la infectividad viral.

Tanto la línea Vero como la HEp-2 permitieron la propagación del virus con la misma eficiencia, la multiplicidad de infección elegida fue de 0.01 UFP/cel, el efecto citopático se observó a las 48 h y la infectividad viral se mantuvo en un 78 % durante 224 días de almacenamiento a 4°C con sulfato de magnesio 1M.

Se estudiaron 34 muestras de exudado faríngeo de niños hospitalizados por infección respiratoria aguda (IRA) para confirmar la presencia del VSR por observación del efecto citopático y detección del antígeno viral en células infectadas, por la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

De las 34 muestras estudiadas, nueve (26.4%) fueron positivas para el VSR por los dos métodos.

INTRODUCCION

Las infecciones del tracto respiratorio son un problema mundial de salud pública, en los países en desarrollo presentan una alta tasa de morbilidad y mortalidad principalmente en niños pequeños. La morbilidad y mortalidad total estimada de estas infecciones es de 240 millones y de 10'850,000 casos anuales respectivamente (72). El agente causal más frecuente de estas infecciones es la bacteria Streptococcus pneumoniae, a la cual se le considera responsable de 100 millones de casos de morbilidad y de 100 millones de muertes al año (72). Sin embargo, los virus también presentan tasas altas de morbilidad y mortalidad, los más importantes son: virus del grupo de parainfluenza, se les considera responsables de 75 millones de casos de morbilidad y de 125,000 casos de mortalidad y el virus sincicial respiratorio (VSR) el cual se le asocia con 65 millones de casos anuales de morbilidad y con 160,000 casos anuales de mortalidad (72).

Las infecciones respiratorias originadas por virus pueden ser causadas por virus de 6 familias, clínicamente pueden agruparse en 8 síndromes de acuerdo al sitio anatómico afectado: resfriado común, rinitis, faringitis, laringitis, laringotraqueobronquitis ("croup"), traqueobronquitis, bronquiolitis y neumonía. Con frecuencia una misma infección involucra más de un sitio anatómico.

A grandes rasgos puede asignarse un síndrome específico a un virus determinado, aunque no siempre este criterio es válido ya que un mismo virus puede originar los 8 síndromes. Por lo que con base a manifestaciones clínicas no es posible identificar con certeza al agente etiológico. Virus de las seis diferentes familias pueden causar cuadros severos. Sin embargo, estudios realizados en niños menores de seis meses, muestran que el VSR es el agente etiológico del mayor número de bronquiolitis y neumonías que requieren hospitalización y, de la mayoría de las infecciones nosocomiales de las vías respiratorias en los pabellones infantiles (1, 16, 17, 38, 40, - 48). Aunque la infección por el VSR en niños es endémica, su incidencia se incrementa durante los meses de invierno y primavera, cuando alcanza niveles de brotes epidémicos (36, 40). La infección por este virus en personas mayores es frecuente y puede ser mortal (41, 44, 45), más aún en años recientes -- las infecciones por VSR en la niñez se han asociado a problemas pulmonares posteriores (44, 45, 76).

El virus se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, con excepción quizá del norte de la República Popular China, donde los adenovirus son responsables de la mayor parte de las infecciones respiratorias (72).

En todos los países donde se han realizado encuestas confiables, se ha encontrado que aproximadamente el 50% de los - infantes adquieren la infección en el primer año de vida y - para los dos años de edad casi el 100% de los niños tienen anticuerpos antivirales.

Las infecciones más severas se presentan en infantes de dos a seis meses; las reinfecciones son frecuentes en la niñez y en la adolescencia y se presentan a pesar de altos títulos de anticuerpos antivirales séricos (12, 38, 39, 57). De acuerdo a recientes observaciones, las infecciones causadas por el VSR pueden tratarse con ribavirina en aerosol (42, 43). Sin embargo, para mayor eficacia es necesario que la terapia se prescriba al inicio de la infección y para esto es necesario la pronta y confiable identificación del agente etiológico. Para tener la certeza de que el VSR es el agente etiológico de la infección se puede aislar el virus y en cultivos celulares confirmar el efecto citopático característico y la presencia del antígeno viral. Este método por aislamiento aunque laborioso y costoso es muy seguro y se utiliza como referencia (5, 10). También es posible detectar al virus por observación directa del espécimen, ya sea mediante el microscopio electrónico o por identificación con técnicas de inmunocitoquímica (3, 9, 47, 51), este criterio aunque menos estricto se utiliza con frecuencia por su facilidad para realizarlo y su rapidez para obtener resultados.

Los reportes de infecciones respiratorias en México, datan desde 1959 (11) en el cual, se menciona que, desde 1929 se consideraban tres síndromes respiratorios (neumonías, infecciones por virus de influenza y tuberculosis) como únicas enfermedades respiratorias, la bronquitis en cambio se incluye a partir de 1955. en el cuadro 1 se indica la mortalidad por estos síndromes.

Durante el período de 1929 a 1955 la mortalidad más elevada correspondió a las infecciones intestinales mientras que las infecciones respiratorias ocuparon diferentes lugares (del 3o. al 10o.). La información reportada durante 1929 a 1975 - se refiere únicamente a mortalidad causada por enfermedades infecciosas, sin embargo, a partir de 1976 se reporta la morbilidad, como puede observarse en el cuadro 2 y figura 1. Y desde 1978 el 1er. lugar de morbilidad lo ocupan las infecciones respiratorias con 46.8% del total de enfermedades infecciosas y - desde entonces se han mantenido en primer lugar aumentando el porcentaje cada año, mientras que la mortalidad por las mismas infecciones se ha mantenido (figura 1 y figura 2).

Además se observa un incremento en el número de padecimientos respiratorios de origen infeccioso por lo que se incluyen en un sólo grupo como infecciones respiratorias agudas - (IRA) (incluyen amigdalitis, resfriado común, rinitis, asma, faringitis, laringitis, laringotraqueobronquitis, bronquiolititis, bronquitis, neumonía, etc.) (18). En la mayor parte de los reportes, los padecimientos de las vías respiratorias se incluyen en IRA, no obstante en algunos reportes se especifica cuando se trata de bronconeumonía y neumonía o bronquitis.

El grupo más afectado por neumonías son los menores de un año (figura 3). En México las infecciones de las vías respiratorias bajas en niños menores de un año presentan la incidencia de mortalidad más alta (18, 28), quizá el agente etiológico más importante sea el VSR. No obstante, no hay estudios

al respecto; los únicos reportes sobre este virus son presentaciones en congresos nacionales y se refieren al aislamiento del virus en muestras clínicas y a técnicas de propagación y purificación de la cepa de referencia Long (83).

CUADRO 1

	DEFUNCIONES	TASA x 100 000 Hbs.
INFLUENZA Y NEUMONIAS	185 018	202.0
BRONQUITIS	29 009	31.7
TUBERCULOSIS	28 580	31.2

Padecimientos respiratorios causantes de mortalidad en la República Mexicana de 1955 a 1957.

Información obtenida de: Salud Pública en México (1959).

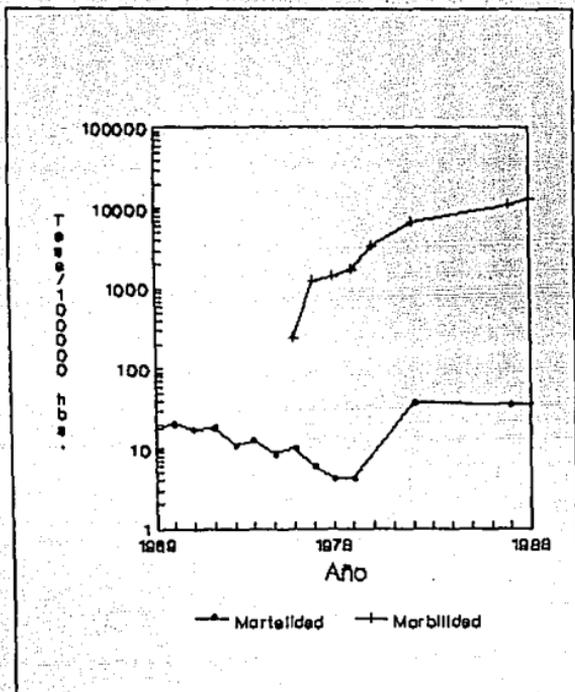
CUADRO 2

AÑO	TASA DE MORTALIDAD 100 000 Hbs.	TASA DE MORBILIDAD 100 000 Hbs.
1929-1931	476.0	- - -
1955-1957	2 200.0	- - -
1969	17.0	- - -
1970	20.7	- - -
1971	17.6	- - -
1972	17.8	- - -
1973	10.8	- - -
1974	12.5	- - -
1975	8.6	- - -
1976	9.9	235.9 (ya como-
1977	6.2	1 244.7 IRA).
1978	4.2	1 406.6
1979	4.2	1 681.0
1980	- - -	3 425.0
1982	36.88	6 627.0
1987	36.0	10 724.0
1988	36.0	13 017.35

Tasas de mortalidad y morbilidad de 1929 a 1988.

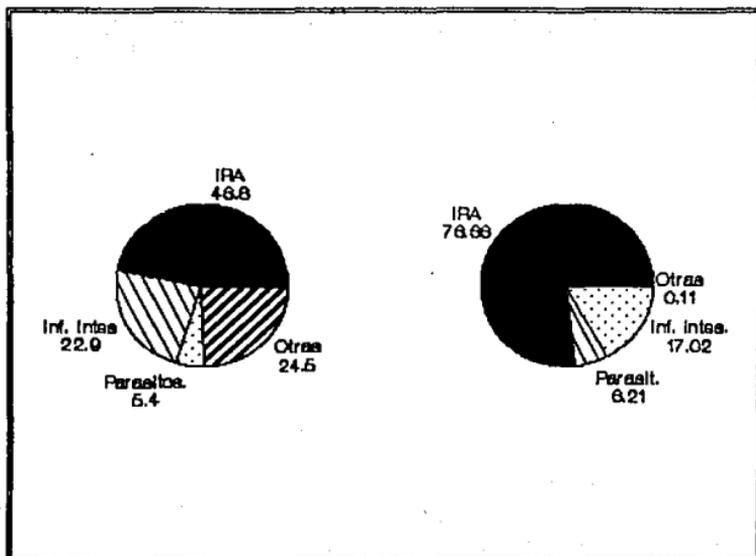
Información obtenida de: Salud Pública en México (1959) y Epidemiología (1979-1989).

FIGURA 1



Mortalidad y Morbilidad por infecciones respiratorias.
Información obtenida de: Salud Pública en México (1959);
Epidemiología (1979-1989).

FIGURA 2

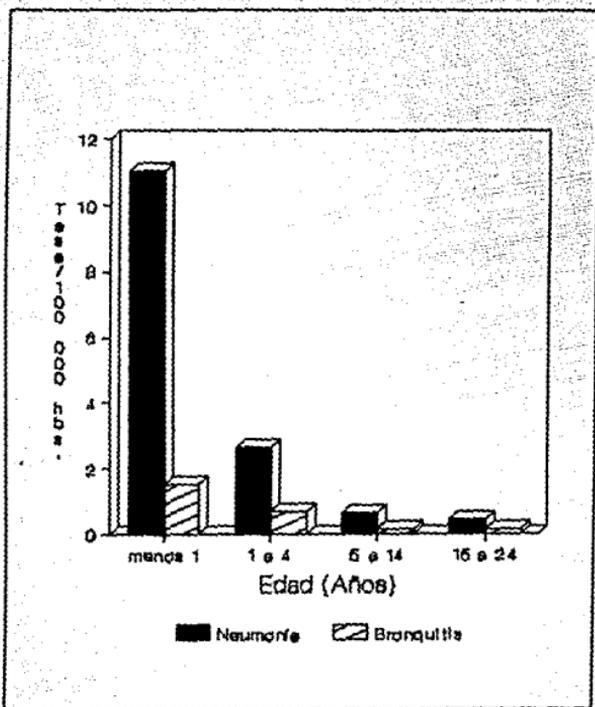


Causas principales de padecimientos transmisibles en el D. F.:

A) 1978; B) 1987.

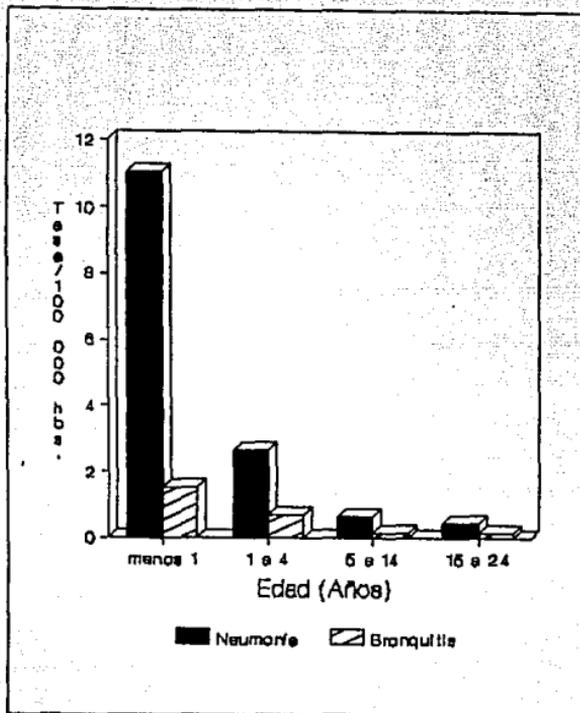
Información obtenida de: Epidemiología (1979-1989).

FIGURA 3



Mortalidad en 1987, por neumonías y bronquitis por grupo de edad. (Información obtenida de: Epidemiología 1979-1989).

FIGURA 3



Mortalidad en 1987, por neumonías y bronquitis por grupo de edad. (Información obtenida de: Epidemiología 1979-1989).

ANTECEDENTES.

CARACTERISTICAS DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO.

En 1956 se aisló de chimpancés y se le conoció como agente de la coriza (resfriado) de los chimpancés (63). En los años 60s al VSR se le asoció por primera vez con bronquiolitis y neumonías de humanos ya que Chanock y Fiudenberg (58, 59, 60 61.) lo aislaron de niños con infecciones del tracto respiratorio inferior.

La principal característica del virus es su capacidad de fusionar células produciendo sincicios o células multinucleadas en los cultivos. El virus ha sido incluido en la familia Paramyxoviridae, dentro del género Pneumovirus, ya que presenta semejanzas con los miembros de la familia como son: morfología, aspecto general de la nucleocápside y el proceso de maduración, aunque también presenta diferencias: el tamaño de la partícula, el diámetro de la nucleocápside, en el aspecto general de las inclusiones intracitoplasmáticas que produce en la infección y carece de hemaglutinina y neuraminidasa (59, 60, 61, 71). Por lo general, tiene una forma redondeada, mide de 150 a 300 nm (77), aunque a veces es pleomórfico, presenta envoltura, una nucleocápside helicoidal que mide 13.5 nm de diámetro y su genoma está constituido por una sola cadena lineal de ARN con polaridad negativa (no puede funcionar como ARNm) -- con un valor de sedimentación de 50s y un peso molecular de 5×10^3 Kilodaltones (KD).

La forma replicante del ARN, es de doble cadena y está -

constituido por una cadena positiva y otra negativa, la cadena positiva funciona como templado para duplicación de la cadena negativa del genoma y codifica proteínas de 9 500 a 200 000 D. (7, 29, 34, 55, 8) de las cuales 4 6 5 son proteínas estructurales y dos de éstas son glucoproteínas.

La proteína mayor (G) tiene un peso molecular de 79 a 90 KD. está glucosilada y se considera necesaria para la adsorción del virus a la célula huésped y se ha considerado análoga a la hemaglutinina-neuraminidasa de otros paramixovirus (7, 56, 71, 83, 88). Además se conoce la secuencia de aminoácidos de tal proteína.

La otra glucoproteína es la proteína de fusión (F) tiene un peso molecular de 60 a 68 KD. está compuesta por dos polipéptidos unidos por puentes disulfuro uno pesa 48 KD. y el otro 20 KD. esta glucoproteína es considerada como la responsable de la entrada del virus a la célula; provoca la fusión de la partícula viral a la membrana celular y en los cultivos celulares induce la formación de sincicios, es sensible a la tripsina (83, 87, 89, 90).

Estas dos glucoproteínas son las que inducen la formación de anticuerpos a los que se les ha asignado actividad protectora in vitro donde neutralizan la infectividad (85, 91) y son sensibles a los detergentes y a la tripsina por lo que se deduce que están localizadas en la superficie del virión (77).

Tres diferentes grupos de trabajo reportan otros pequeños polipéptidos uno de 10 y otro de 13 KD. cuya función y -

origen se desconocen, otro polipéptido con un peso molecular de 19 a 25 KD. ha sido encontrado con más frecuencia que los anteriores pero su función es también desconocida (12, 84).

La proteína de la membrana o de la matriz (M) tiene un -- peso molecular de 23 a 28 KD. está localizada en el interior -- del virión y no parece tener importancia como inmunógeno, su -- función principal es estabilizar la envoltura viral y partici- par en el ensamblaje, se sabe que contiene 256 aminoácidos, es relativamente básica y que puede interactuar con la membrana de la célula infectada (12, 55, 77).

La nucleoproteína (NP) tiene un peso molecular de 40 a 44 KD. está asociada con el ARN; se conoce la secuencia de sus ami- noácidos por estudios con plásmidos y está formada por 467 ami- noácidos, la mayoría son básicos y no está glucosilada (34, 59, 93).

Otra proteína viral descrita es una polimerasa (P) que -- tiene un peso molecular de 32 a 38 KD. está fosforilada y se ha sugerido que está asociada con la nucleocápside (12, 34, 52, - 59, 93).

Por último, también se ha descrito una proteína grande -- (L) con un peso molecular de 160 a 200 KD. esta proteína no ha sido caracterizada y no se conoce su función pero se piensa que está implicada en la transcripción y que está asociada con la - nucleocápside; se sugiere que es la ARN polimerasa del virión - (12, 59,).

La infectividad del virus es destruida por el éter, el cloroformo, la tripsina y en forma rápida por cambios de pH, es termolábil y su vida media a 56°C es de 0.5 a 2.8 min. y a 37°C es de 1 a 7 h. sin embargo, es estable por varios meses a -50°C (33, 54, 59). Algunas sales inorgánicas principalmente los cationes divalentes como el magnesio, calcio, o la glucosa y la sacarosa protegen al virus de la inactivación (33, 77, 82, 83). La densidad de flotación del VSR en el cloruro de cesio es de 1.21 a 1.24 mg/ml y en sacarosa es de 1.16 a 1.26 g/ml (54, 59, 77). En cuanto a su multiplicación se ha estudiado en líneas celulares humanas y animales, las más utilizadas son HEp-2, Vero y Hela (5, 10, 66, 67, 69, 87). Es resistente a la mitomicina C, en cambio la actinomicina D estimula su propagación (51), esto indica que el VSR se multiplica en el citoplasma y no es dependiente de la síntesis de ADN nuclear (77).

Después de la traducción algunos polipéptidos sufren modificaciones como son: la proteína P es fosforilada y una porción de la proteína F es sulfatada (13, 29, 51). Por examen al microscopio electrónico se ha podido observar que los antígenos virales aparecen en el citoplasma de las células infectadas a las 8 h. posinfección (p.i.), utilizando otras técnicas se ha observado algunos cuerpos de inclusión eosinófilos cerca del núcleo (77). En ciertos tipos de células aparecen filamentos de superficie que alteran la apariencia de las mismas, ésta es una característica única de los pneumovirus, otros paramixovirus no la presentan (77).

La característica típica de células infectadas con el VSR, es la formación de sincicios, últimamente se sabe que también se puede establecer infecciones persistentes en varias líneas celulares aunque los mecanismos no están del todo claros (6, 70).

VARIACION ANTIGENICA.

Respecto a la variación antigénica del virus, al utilizar sueros hiperinmunes en pruebas de neutralización con conejo, mono y cobayo se ha demostrado que presenta variación antigénica, aunque lo mismo no se ha podido demostrar con suero humano. Al utilizar anticuerpos monoclonales, se han observado cambios en epítomos de la glucoproteína G, - en cambio la proteína F se conserva, no se han detectado alteraciones antigénicas en esta proteína, así los anticuerpos dirigidos contra la proteína F de diferentes especies reconocen al VSR aislado de humanos (1, 60, 77, 84, 98). Sin embargo, al realizar otro tipo de pruebas como, fijación de complemento, inmunofluorescencia y radioinmunoprecipitación se presentan reacciones de cruce (64, 92).

En base a las diferencias antigénicas se ha sugerido que hay por lo menos dos o tres subtipos virales (1, 64).

PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad es más frecuente durante los primeros 6 meses de edad. El periodo de incubación es de 4 a 5 días -- (58, 59, 60). El virus se multiplica en la nasofaringe y -- por aspiración de las secreciones se disemina a vías inferiores. In vivo se ha podido detectar en células mononucleares y macrófagos circulantes (30, 32, 39) células en las cuales se puede multiplicar in vitro (80).

Los signos de la enfermedad en vías respiratorias bajas se presentan del primer al tercer día después de la rino rrea, por lo que se supone que ha invadido bronquios y bronquiolos.

Generalmente el virus es neutralizado por el anticuerpo pero la inmunidad celular es la encargada de la recuperación (58, 60), lo cual se confirma en observaciones hechas en niños con deficiencia inmune celular congénita o adquirida o con tratamientos inmunosupresores (38, 39).

Algunas observaciones sugieren que la enfermedad producida por el VSR es el resultado de una reacción inmunopatológica, esta interpretación se apoya en las siguientes observaciones:

- 1) La mayoría de las enfermedades severas se presentan en presencia del anticuerpo antiviral específico de origen materno (53).
- 2) Pacientes que fueron inmunizados con una vacuna de VSR inactivado con formalina, la cual indujo altos

títulos de anticuerpos séricos, no fueron protegidos de la infección, por el contrario presentaron una enfermedad más severa con respecto a los no - vacunados, (95).

Actualmente no se ha podido dar una explicación satisfactoria de la patogenia, sin embargo, se han propuesto varias hipótesis, en base principalmente: a la inmadurez inmunológica del infante (57, 80, 95) y en el hecho de que el anticuerpo sérico puede originar una reacción de hipersensibilidad retardada o mediada por IgE (57, 93, 94).

También se ha pensado en la posibilidad de que los infantes sean incapaces de montar una adecuada respuesta de anticuerpos IgG2 e IgG4 los cuales tienden a ser inducidos por antígenos carbohidratados (46, 47), y se tiene conocimiento de que en infantes de 6 a 12 meses de edad no se detecta una respuesta de IgG contra la proteína G en cambio sí contra la proteína F (57).

McIntosh y Chanock (59) sugieren que la enfermedad en niños pequeños se debe a una reacción de hipersensibilidad - de tipo III, como un resultado de la interacción del anticuerpo sérico con el virus.

Sin embargo, ni el título de anticuerpos séricos ni el complemento hemolítico circulante se correlacionan con la - severidad de la enfermedad en niños con la infección natural (77).

Otra explicación es que la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos cause la inflamación y el daño al tejido, sin la activación del complemento. Sin embargo, el título en el suero o en secreciones de los anticuerpos que median este fenómeno no se correlaciona con los síntomas de la enfermedad clínica (8, 49, 68, 79).

Se han diseñado modelos experimentales utilizando ratón y cobayo, con la finalidad de entender la patogenia de la infección y en particular estudiar la participación del anticuerpo antiviral (79, 85, 92), pero no se han logrado resultados satisfactorios.

Sieber observó que los complejos inmunes del VSR interactúan con neutrófilos in vitro produciendo superóxido, tromboxano A2 y otros factores capaces de causar broncoconstricción (77) y se ha observado que los neutrófilos de niños con la infección tienen un metabolismo hiperactivo in vitro y la interacción de estos complejos con los neutrófilos contribuyen a la patogénesis de la enfermedad (32, 59, 77).

De tal manera que algunos autores sugieren que los anticuerpos pueden contribuir a la patogénesis por permitir la dispersión viral en el organismo, de este modo el anticuerpo adquirido pasivamente (de la madre) bloquea la inducción de linfocitos T citotóxicos (TC) que pueden ser importantes en la limitación de una infección. Esto se ha podido observar en otras infecciones virales como en el dengue y otros flavo virus por lo que se puede suponer que también la infectividad

del VSR puede ser aumentada por los anticuerpos (48, 66, 68).

Por otro lado se ha observado que en pulmones de niños con bronquiolitis causada por el virus (77), no hay una distribución amplia de antígenos (Ags) virales en comparación con niños con neumonía. Esto hace pensar que la bronquiolitis tal vez sea el resultado de una reacción de hipersensibilidad mediada por IgE (tipo I). Quizá una primera infección eleva la producción de IgE y en una segunda infección estos Acs brinden poca protección o ninguna, pero en cambio provoquen una enfermedad severa (73, 76).

Estos fundamentos también explicarían la recurrencia de los ataques de tos que se observan después de una bronquitis por VSR (73).

También se ha demostrado la elevación de IgG4 en sueros de niños hospitalizados en fase aguda de la infección y en vista de esta clase IgG es capaz de mediar una respuesta de anafilaxis, se le atribuye que sea la causante del broncoespasmo que se presenta en la enfermedad (93, 94, 95).

Así entonces existe duda en el conocimiento de las fases de la patogenia de la enfermedad y hasta el momento se considera que los anticuerpos contra la proteína de fusión son el mecanismo más importante para limitar la infección.

INMUNIDAD.

No se conoce la importancia de los mecanismos -

inmunitarios en el control de la infección por el VSR y sólo se cuenta con pocas pruebas de su participación. Se ha sugerido que la respuesta celular es la encargada de limitar la enfermedad, se han mencionado varios tipos de mecanismos como la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (8), y la participación de los anticuerpos maternos.

Se ha observado que los anticuerpos maternos proporcionan cierta protección aunque parece que es incompleta, esto no está claro y se ha sugerido que depende de varios factores como: que los antígenos virales sean pobres inmunógenos en la primera infección, de manera que la respuesta inmune por parte de las subclases IgG2 e IgG4 es débil y que estos subtipos responden pobremente durante la infancia por lo tanto se necesitan varias exposiciones para inducir una buena respuesta (45, 46, 47, 53).

También se ha mencionado que en la infección primaria el título de anticuerpos, además de que es bajo, disminuye rápidamente hasta títulos no detectables y en una reinfección se producen títulos mayores y persisten por más tiempo, lo que permite que con el tiempo y de acuerdo a las reinfecciones los títulos se incrementen más y a la vez se presente un aumento en la resistencia a la enfermedad. Esto explicaría el por que las infecciones más severas se presentan en infantes que poseen bajos títulos de anticuerpos maternos (46, 47).

Por otro lado los anticuerpos fijadores de complemento (FC) y neutralizantes (NT) no se correlacionan con la severi-

dad de la enfermedad o con la resistencia a la infección, ya que cuando se utilizan vacunas que estimulan estos tipos de anticuerpos, no se logra una protección. Sin embargo, parece ser que los anticuerpos maternos si dan alguna protección, ya que en menores de 3 semanas con títulos de anticuerpos maternos elevados, los síntomas se confinan al tracto respiratorio alto, se produce poco virus y desaparece pronto (80). Estas observaciones sugieren que los anticuerpos maternos proporcionan una protección contra el virus aunque no detienen por completo la infección.

También se ha especulado si el anticuerpo puede ser el responsable de esta protección o si hay otros factores inmunes que participen como podrían ser la transferencia transplantaria de linfocitos, la lisis dependiente del complemento o la citotoxicidad mediada por anticuerpos (15, 45, 68).

Otros autores hacen hincapié en la importancia del anticuerpo local, ya que se han detectado por IF IgG e IgA específicas en secreciones nasales y se ha observado una síntesis acelerada de las mismas después de una reinfección (15, 17, 85).

VACUNAS.

Para prevenir la infección se han desarrollado algunas vacunas que hasta el momento no han sido efectivas y al igual que la infección natural no inducen una resistencia contra epidemias anuales de tal manera que las reinfecciones se siguen

presentado y son la causa principal de la hospitalización de niños pequeños (9, 77). Entre las vacunas probadas se encuentran:

- a) Vacuna de virus inactivado con formalina y concentrado, programada para administración parenteral - (97).
- b) Vacuna de mutantes sensibles a la temperatura, administrada por vía intranasal (96).
- c) Vacuna recombinante, donde se usa como vector el virus de vaccina (7, 31, 78).

Básicamente dos estudios se han realizado con vacunas inactivadas. Una se administró por vía intramúscular, se trabajó con dos grupos de niños de 5 a 11 años y de 3 a 5 años. Indujo una respuesta de Acs neutralizantes, pero éstos no protegieron.

En cambio, en otro estudio con un grupo formado por niños de 2 meses, se administraron tres dosis por vía intramúscular, y al igual que en los grupos anteriores, la vacuna indujo altos títulos de anticuerpos, tanto FC como NT, los cuales no protegieron, en cambio durante una reinfección se presentó un incremento en la frecuencia y la severidad de la enfermedad. Se ha tratado de aclarar tal comportamiento para lo que se han sugerido algunas posibles explicaciones. Se dice que los anticuerpos séricos en ausencia del anticuerpo nasal (local) son inmunopatógenos, este fundamento explicaría la contribución de los anticuerpos materno a la bronquitis ocasionada por el VSR; sin embargo, no se tienen datos al respecto

Otra explicación, basada en observaciones hechas con una vacuna semejante para el virus del sarampión, supone que el --tratamiento del virus con aluminio altera la protefina de fusión, en forma tal que la inmunogenicidad es baja o más bien nula (65).

Otra sugerencia es que el antígeno viral estimula una respuesta que puede llevar a la formación de complejos inmunes, los cuales activan el sistema de complemento causando -daño al tejido o inflamación (79, 95). Toda esta secuencia -de eventos son considerados para tratar de explicar la severidad de la enfermedad observada en niños vacunados. Otros autores sugieren que la vacuna provoca una reacción de hipersensibilidad retardada, ya que puede sensibilizar linfocitos (107, 147).

Con la vacuna de mutantes sensibles a la temperatura -tampoco se obtuvieron resultados alentadores, la inmunidad -obtenida no fue protectora y los niveles de anticuerpos alcanzados fueron bajos (95).

Los investigadores están probando ahora un virus recombinante en el cual tienen esperanza. Por el momento solo se ha probado en conejos y se observó que esta vacuna indujo títulos altos de anticuerpos y éstos neutralizaron la infectividad del virus. Esto mismo se probó en ratones con resultados similares (78).

DIAGNOSTICO.

El interés por el diagnóstico en el laboratorio de las enfermedades virales se ha incrementado en los últimos años, debido en parte, a que se dispone de algunos antivirales que facilitan el control de la infección en la fase temprana (35, 36).

Frecuentemente, infecciones causadas por diferentes virus presentan los mismos síntomas, imposibilitando así, el diagnóstico clínico diferencial. Quizá el caso más común lo presenten las infecciones respiratorias de origen viral, debido a que son causadas por diferentes familias de virus y todas ellas pueden ocasionar el mismo cuadro clínico.

Un diagnóstico oportuno es de gran utilidad, ya que -- posibilita la prescripción del tratamiento adecuado que debe dársele al paciente, así como las medidas de protección que deben implantarse al personal hospitalario y a la comunidad.

El diagnóstico viral rápido ofrece muchas ventajas, entre ellas:

- a) La identificación oportuna del agente viral responsable de una infección, ayuda a prevenir infecciones nosocomiales y su extensión por contacto, principalmente aquellas infecciones que son asintomáticas, o aquellas que presentan síntomas típicos como en el caso de las infecciones por hepatitis B, herpes, rubéola y VSR.

- b) El manejo apropiado del paciente, basado en el diagnóstico rápido de dichas enfermedades, permite una reducción en la morbilidad y mortalidad.

Las estrategias utilizadas en el diagnóstico de laboratorio en las infecciones virales son de dos tipos: métodos directos, en los cuales se efectúa el aislamiento e identificación del virus o de sus componentes y los métodos indirectos, en los cuales la identificación del agente infeccioso se hace determinando la respuesta inmune, que presenta el organismo a la infección viral.

MÉTODOS DIRECTOS.

- a) Aislamiento del virus. El aislamiento del virus de muestras clínicas se logra a través de su multiplicación en los sistemas biológicos de experimentación que pueden ser: cultivos celulares, embriones de pollo y animales de laboratorio.

En la actualidad, los animales al igual que los embriones de pollo, prácticamente han desaparecido de los laboratorios de diagnóstico, siendo los cultivos celulares los más utilizados por ser más fáciles de manejar y más versátiles.

- b) Visualización del virus. La microscopía electrónica (ME) ha proporcionado información acerca de la morfología viral, esto ha conducido al conocimiento de

nuevos virus y la asociación del reconocimiento de grupos virales con diferentes síntomas clínicos (3, 4).

La ME puede ser de transmisión, en la que la imagen se genera por el paso de los electrones a través de diferentes partes de la muestra. Dentro de este género se encuentra la tinción negativa, en la cual, los materiales se suspenden en sales metálicas de elevada densidad electrónica, como el fosfotungstato. Otra técnica es la de sombreado, utilizada para la revelación de la estructura superficial de los objetos y que ha sido muy utilizada en virología, en ésta se deposita con cierto ángulo un material electrónicamente denso, como el cromo o el platino y las muestras se colocan al vacío bajo un haz oblicuo de iones metálicos, de esta manera los objetos proyectan una sombra hacia el lado opuesto al haz, produciendo un efecto tridimensional.

También se ha introducido la microscopía inmunoelectrónica, la cual se basa en la visualización del complejo virus-Ac específico, la técnica ha sido muy utilizada en casos difíciles de diagnosticar, ya que puede establecer tanto la morfología viral como la determinación de los Ags virales (3, 4).

Otras técnicas desarrolladas recientemente son la inmunofluorescencia (IF) e inmunoperoxidasa (IP), que en la actualidad son muy utilizadas en el diag-

nóstico viral, con ayuda de la microscopía como -
fuente de información. La IF utiliza colorantes -
como la fluoresceína o auramina, que pueden unirse
a moléculas de anticuerpo, y por medio de la luz -
ultravioleta en el microscopio se puede observar la
fluorescencia. La IF puede ser directa, cuando el
anticuerpo marcado interactúa directamente con el -
antígeno a buscar. En la IF indirecta la reacción
es en dos etapas, antígeno-anticuerpo-anticuerpo --
marcado. Con frecuencia la IF indirecta es más sen-
sible.

- c) Determinación de la multiplicación viral por cambios
originados en la célula. Los virus pueden afectar
a las células en diferentes formas: infección cito-
tóxica, en la cual las células son muertas por el -
virus; infección no citotóxica de estado estaciona-
rio, en la cual, las células producen virus pero su
metabolismo no es afectado; la transformación celu-
lar, en la que el virus no mata a la célula pero al-
tera permanentemente sus características. Todos --
estos cambios en las células infectadas, se deben a
efectos bioquímicos de los productos virales. Los
cambios bioquímicos generalmente conducen a trans-
tornos funcionales y eventualmente a cambios cito-
patológicos. La apariencia citopatológica del da-
ño producido en cultivos celulares por determinados

virus es con frecuencia lo suficientemente característico como para que se pueda emplear como criterio de diagnóstico. Mientras algunos virus producen cambios en las membranas celulares, otros -- provocan fusión de células infectadas con sus vecinas no infectadas, formando sincicios (células gigantes multinucleadas) tal es el caso del VSR, - otros virus producen cuerpos de inclusión.

- d) Determinación de la presencia de componentes virales. La cuantificación de componentes virales en células, tejidos y fluidos corporales a diferentes tiempos después de la infección, pueden utilizarse en el diagnóstico de las infecciones virales. De los componentes virales que se han utilizado -- comúnmente en el diagnóstico del laboratorio son: proteínas virales, enzimas específicas y ácidos nucléicos. Las proteínas pueden ser detectadas en - células o fluidos corporales cuando se dispone de anticuerpos en contra de éstas. Las enzimas pueden identificarse midiendo la actividad enzimática. La presencia de los ácidos nucleicos se puede determinar por hibridación.

MÉTODOS INDIRECTOS.

Los métodos indirectos se basan en la respuesta inmune del huésped a la infección viral, se determina la concentración de las inmunoglobulinas antivirales.

Una primoinfección se diagnóstica midiendo la concentración de IgM, mientras que en una segunda infección se determina el incremento de la concentración de la IgG. La determinación de las inmunoglobulinas se hace por medio de la detección de la interacción antígeno-anticuerpo. Las técnicas comúnmente utilizadas son: la fijación de complemento (FC), neutralización (NT), inhibición de la hemaglutinación (IHA). La sensibilidad de dicha interacción se puede incrementar si a uno de los componentes de la reacción se le acopla un marcador que pueda determinarse a bajas concentraciones; los marcadores generalmente utilizados son: fluoresceína o isotiocianato de fluoresceína en el caso de la técnica de IF; isótopos radiactivos en el radioinmunoensayo (RIA) y enzimas en la técnica de inmunoensayo-enzimático (ELISA).

Para el diagnóstico de la infección causada por el VSR se han establecido algunas técnicas, sobretodo para la detección de anticuerpos séricos entre éstas están la NT, FC, IF, ELISA (5, 8, 10, 14). Sin embargo para poder realizar el diagnóstico preciso del virus, es necesario aislarlo, para lo cual se requiere propagarlo en cultivos celulares y observar el ECP.

OBJETIVOS.

- 1) Establecer las condiciones óptimas para propagar, cuantificar y conservar al virus de referencia, - cepa Long.
- 2) Identificar y confirmar la presencia del VSR en - infecciones respiratorias agudas en niños hospitalizados.

HIPOTESIS.

Si el VSR se encuentra con frecuencia como uno de los agentes etiológicos en infecciones respiratorias agudas y en México este tipo de infecciones son de alta incidencia; entonces el virus estará presente en algunas de estas infecciones.

MATERIALES BIOLÓGICOS Y MÉTODOS

A) MATERIALES BIOLÓGICOS.

LINEAS CELULARES.

Se utilizó la línea celular HEP-2 (células de carcinoma de laringe humana) (86) que fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Trudel (Instituto Armand/Frappier, Canadá) se recibieron en viales congelados de 2 ml. con medio esencial mínimo (MEM) y se conservaron a -196°C en tanque con nitrógeno -- líquido.

También se utilizaron las células Vero (células de riñón de mono verde africano) (77) provenientes del laboratorio de Virología, Facultad de Medicina, U.N.A.M.

VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO (VSR).

Se trabajó con la cepa Long (ATCC VR-26 American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.) también proporcionada por el Dr. Trudel. El virus se recibió en botellas de cultivo de 25 cm^2 . de células HEP-2 infectadas, en medio MEM.

EXUDADOS FARINGEOS.

Las muestras (tabla 5) se obtuvieron de dos centros -

hospitalarios: el Hospital General de Pediatría (13 muestras y el Instituto Nacional de Pediatría (21 muestras). Los exudados correspondieron a niños con una edad de 2 meses a 15 años con enfermedad respiratoria aguda de diferente diagnóstico, el tiempo de hospitalización en el que se tomó la muestra fue de 2 a 72 h.

Se incluyeron 10 exudados faríngeos de niños no hospitalizados y sin enfermedad respiratoria aparente, como testigos.

B) METODOS.

DESCONGELACION DE CELULAS.

Los viales de células congeladas de 2 ml. se desinfectaron con etanol al 70%. Se descongelaron en baño María a 37°C con agitación suave para homogenizar el contenido. Con una pipeta se transfirieron las células de cada vial a una botella de cultivo de 25 cm² (Lux, 5350), con 5 ml. de MEM -- adicionado con 5% de suero fetal de ternera (SFT) (Sigma F30 10) antibióticos (penicilina 100 UI/ml (Sigma PEN-NA) y estreptomycin (100 µg/ml) (Sigma-S6501) (en lo sucesivo este medio se referirá como medio completo). Se homogenizó el contenido de la botella y se incubó a 37°C en atmósfera húmeda -- con 5% de CO₂ hasta la formación de una monocapa confluyente -- (generalmente entre los dos y tres días de incubación).

PROPAGACION DE CELULAS.

Una vez que se hubo formado la monocapa confluyente, las células se desprendieron de la superficie de crecimiento con tripsina. Para esto primero se retiró el medio por succión y se lavó con buffer salino de fosfatos ("phosphate buffer saline") (PBS) (NaCl 0.8%, NaHPO_4 0.1% y KH_2PO_4 0.2% pH 7.2) - que también se retiró por succión, en seguida se agregó EDTA 0.025% en PBS (Dibco CTC-1327), después de retirar el EDTA - se agregó tripsina (Gibco CTC-1327) al 0.025% en PBS en cuanto se observó a simple vista el desprendimiento de la monocapa, se detuvo la reacción agregando 2 ml. de medio completo. Se homogeneizó la suspensión celular; se contaron las células viables en una cámara de Neubauer o hemocitómetro; se ajustaron a una concentración de 2×10^5 cel/ml y se distribuyeron 5 ml en cada botella de cultivo.

CONTEO DE CELULAS Y DETERMINACION DE LA VIABILIDAD.

La viabilidad se determinó por exclusión del azul de - tripano (15) de la siguiente manera. Las células obtenidas por desprendimiento con tripsina se diluyeron 1:10 en colorante al 0.2% en PBS, se llenó con la mezcla cada una de las cámaras del hemocitómetro, se contaron las células no teñidas - que son las que permanecen viables (las teñidas de azul son las muertas). Por cuadro de 1x1 mm cada área mide 1 mm^2 y el

cubreobjetos se encuentra a una altura de 0.1 mm el volumen corresponde a 0.1 mm^3 , se suman las cuentas obtenidas en 10 cuadrantes y se calculó la concentración celular de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$N \times 10 \times 1000 = \text{cel/ml}$$

N = número de células contadas.

10 = número de cuadrantes contados.

1000 = número de mm en 1 cm^3 (o en 1 ml).

CONGELACION DE CELULAS.

Para congelar las células, éstas se ajustaron a una -- concentración de 1×10^8 cel/ml y se depositó 0.8 ml. en criotubos de 2 ml (NUNC 368632) y se mezclaron con 0.8 ml. de medio para congelar (50% de medio completo, 10% de glicerol y 30% de SFT) todo esterilizado por filtración y se mantuvieron en la fase gaseosa del tanque de nitrógeno líquido (Unión -- Carbide tipo super 30) por lo menos durante 30 min. y posteriormente se colocaron en su sitio dentro de la fase líquida del nitrógeno (-196°C).

ALMACENAMIENTO DEL VSR.

Se cosechó el virus extracelular obtenido en las células HEP-2, se separó una alícuota para titularlo y el resto se congeló a -196°C .

PROPAGACION DEL VSR.

Para propagarlo, el virus se descongeló en baño María a 37°C e inmediatamente se transfirió a botellas de cultivo con monocapas de células HEP-2 o Vero. La infección se hizo a -- una multiplicidad de infección (m.d.i.) de 0.01. El virus se dejó adsorber a las células 1 h a 37°C en atmósfera húmeda; - el medio se retiró, las células se lavaron y se les adicionó medio incompleto (sin suero fetal), se incubó hasta que se -- observó el efecto citopático (ECP) que es la formación de sin cicios (generalmente del 3o. al 5o. día). El virus se cosechó y el sobrenadante se centrifugó a 450 g. durante 10 min. y se tituló y congeló a -196°C.

TITULACION DEL VSR.

Para titular el virus se prepararon placas de 24 pozos (Limbro 76-033-05) con monocapas confluentes de células HEP-2 y diluciones de 10 en 10 del virus en medio incompleto. De - cada dilución se tomó 0.6 ml. y se infectaron 3 pozos con 0.2 ml. en cada uno, se incubó a 37°C 60 min. Se retiró el - inóculo y se lavó para después agregar 0.5 ml. medio de metil celulosa (Sigma. M. 0512) al 1% en medio incompleto. Se incubó nuevamente de cuatro a cinco días para que apareciera el efecto citopático, después se retiró el medio para fijar con una mezcla de etanol 20% con 5% de éter o bien con formaldehído al 4% durante 10 min. para luego teñir con Giemsa - -

que contenían una solución de Hanks balanceada con 0.2% de albúmina bovina y antibióticos (penicilina 300 U/ml. y estreptomicina 300 µg/ml. (10, 81), después se retiró el hisopo, y el contenido del tubo se centrifugó a 450 g. durante 10 min.; el sobrenadante se utilizó para inocular botellas de cultivo que contenían células HEp-2, se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ hasta observar el efecto citopático, la incubación se prolongó 10 días. A las muestras que no presentaron efecto citopático se les dieron dos pases en células HEp-2, si después de estos pases no se observó el efecto citopático se consideraron negativas. Las muestras positivas se cosecharon y se centrifugaron a 450 g durante 10 min. y los sobrenadantes se conservaron a -196°C.

INMUNOFUORESCENCIA.

Para la realización de esta prueba se crecieron células Vero en placas de 96 pozos, una vez que se formaron las monocapas confluentes se infectaron con las muestras que resultaron positivas por efecto citopático, se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 48 horas, luego se lavaron con agua destilada o PBS y se fijaron con formaldehído al 4% durante 10 min. Una vez secas se cubrieron las células con el anticuerpo anti VSR (Dakopatts. B344) diluido 1:20 en PBS y se incubó 60 min. A continuación se les dieron dos lavados con PBS de 3 min. cada uno y un tercero con agua. Se cubrieron con la inmunoglobulina de carnero anti-conejo - -

(1:25 en PBS) 45 min. se lavó con agua de la llave y se contactaron las placas virales en el microscopio de inversión (SWIFT Mod. 8190059) y se calculó el título según el número de placas y la dilución, el título se expresó en unidades formadoras de placa (UFP) por ml. (UFP/ml) (en placas de 98 pozos se cuentan aproximadamente 30 placas virales en cada pozo y en placas de 24 pozos se pueden contar más de 100 placas virales). El título viral se calculó de la siguiente manera: se multiplicó el número de placas por el factor de dilución y por cinco (corrección para 0.2 ml. de inóculo).

CONSERVACION DEL VSR.

Para conservar el virus se utilizaron dos estabilizadores: $MgSO_4$, 1 M y glicerol 10%. El sobrenadante de un cultivo de células HEP-2 infectadas con el virus se cosechó el día 50. postinfección (p.i.), se centrifugó a 450 g por 10 min. y el sobrenadante libre de células se mezcló v/v con cada uno de los estabilizadores. Se hicieron alicuotas de 2.0 ml. que se guardaron a 4°C así como alicuotas del virus sin ningún estabilizador. Cada semana se determinó el título del virus. El virus se conservó durante 8 meses.

COLECCION DE LAS MUESTRAS CLINICAS.

 Los exudados faríngeos de niños con infección respiratoria aguda se tomaron con un hisopo y se colocaron en tubos

conjugada con isotiacinato de fluoresceína (Dakopatts F 205), diluida 1:40 en PBS y se incubó durante 30 min. en la oscuridad. Pasado este tiempo se lavó dos veces con PBS y un tercero con agua. Se observó en el microscopio de fluorescencia (Zeiss modelo III RS).

Los controles negativos consistieron en células sin infectar y células inoculadas con muestras de niños sin infección aparente, los controles positivos se realizaron con células Vero infectadas con el VSR cepa Long, que se tiñeron de la misma manera.

RESULTADOS

CINETICA DE FORMACION DEL SINCICIO.

El efecto citopático característico del virus no es fácil de visualizar y menos al empezar el trabajo, por tanto con el fin de poder observar y reconocer con mayor claridad el efecto se determinó la cinética de formación del sincicio.

Este rastreo se hizo a diferentes horas como se muestra en el cuadro 3. Los tiempos van de 24 h. p.i. a 84 h. p.i. Se contó el número de núcleos y se determinó el diámetro aproximado de la placa viral. Como se puede observar en la figura 4, el sincicio se visualizó con más claridad a partir de las 72 h. cuando se pueden contar perfectamente los núcleos, de 72 a 100 y se puede medir el diámetro de la placa, de 300 a 320 μ m; aunque a las 48 h. ya es posible distinguir las placas y se pueden contar hasta 36 placas por pozo en cajas múltiples de 96 pozos y hasta 100 placas en cajas múltiples de 24 pozos; el diámetro de las placas fue de 150 a 170 μ m. con 14 a 20 núcleos, las placas más grandes se presentan a las 84 h. con un tamaño de 350 μ m. y con alrededor de 100 núcleos.

CINETICA DE PROPAGACION DEL RSV.

La cinética de propagación del virus se determinó en dos líneas celulares (HEp-2 y Vero), para ésto se determinaron los siguientes parámetros: título viral, contenido protéico y -

actividad específica. El seguimiento se hizo desde el primer día p.i. hasta el día 7 en el caso de las células HEp-2 y -- hasta el día 4 para las células Vero. La multiplicidad de - infección utilizada fue de 0.01 UFP/cel.

La cinética de producción del VSR obtenido en las dos líneas celulares fue similar como puede observarse en la figura 5. Es decir no se observó diferencia significativa en el valor del título viral máximo obtenido en ambas líneas celulares. En las células HEp-2 el título viral máximo fue de 336 000 UFP/ml. la actividad específica (UFP/mg de proteína/ml) fue de 223 500 UFP/mg/ml. y se obtuvo al quinto día p.i. En cambio, en las células Vero el título viral máximo se obtuvo al tercer día p.i. y fue de 350 000 UFP/ml. y la actividad específica fue de 205 000 UFP/mg/ml. Aunque no se observó diferencia en los títulos y en la actividad específica -- obtenidas en ambas líneas celulares, sí hay diferencia con respecto al título por día y al día en que se obtuvo el título viral máximo, ya que en las células Vero el título desde el primer día fue elevado (13 000 UFP/ml) y al tercer día se alcanzó el título máximo y el descenso es más rápido como -- puede observarse en la figura 5 y en el cuadro 4, en las células HEp-2 el título inicial es muy bajo en el primer día p.i. pero fue incrementándose hasta el día 5 cuando se obtuvo el título máximo y cuando éste empezó a descender.

CUADRO 3

CINETICA DE FORMACION DE LA PLACA DEL VSR		
TIEMPO (H)	DIAMETRO DE LA PLACA. (μ m)	NUMERO DE NUCLEOS
24	70 - 80	7 - 10
48	150 - 170	14 - 35
60	200 - 250	41 - 70
72	300 - 320	72 - 100
84	350	100

A las 72 horas las placas se pueden distinguir con claridad y se pudieron contar hasta 300 placas por pozo (caja múltiple de 24 pozos).

CUADRO 4

CINETICA DE PRODUCCION VIRAL				
CÉLULAS	DIA p.i.	TITULO UFP/ml	CONT.PROT. mg/ml.	ACT.ESP. UFP/mg/ml
HEp-2	1	250	1.2	$.208 \times 10^3$
	2	2 500	1.2	2.083×10^3
	3	6 000	1.2	5.0×10^3
	4	26 000	1.67	15.5×10^3
	5	336 000	1.7	223.5×10^3
	6	29 000	.77	24.0×10^3
	7	1 000	.77	1.2×10^3
VERO	1	13 000	.93	13.0×10^3
	2	295 000	1.4	210.0×10^3
	3	350 000	1.7	205.0×10^3
	4	50 000	1.0	50.0×10^3

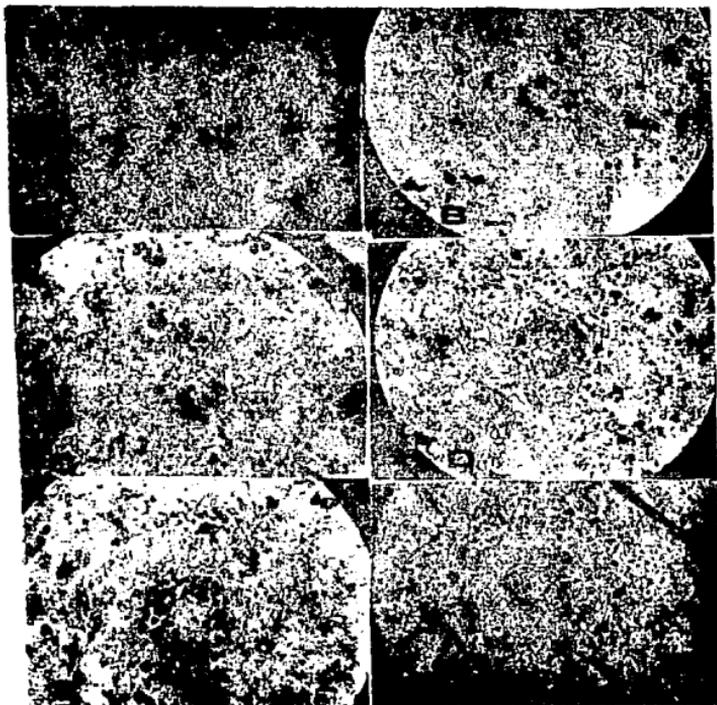
p.i. = Postinfección.

UFP/ml = Unidades Formadoras de Placa por mililitro.

CONT.PROT. = Contenido Protefco.

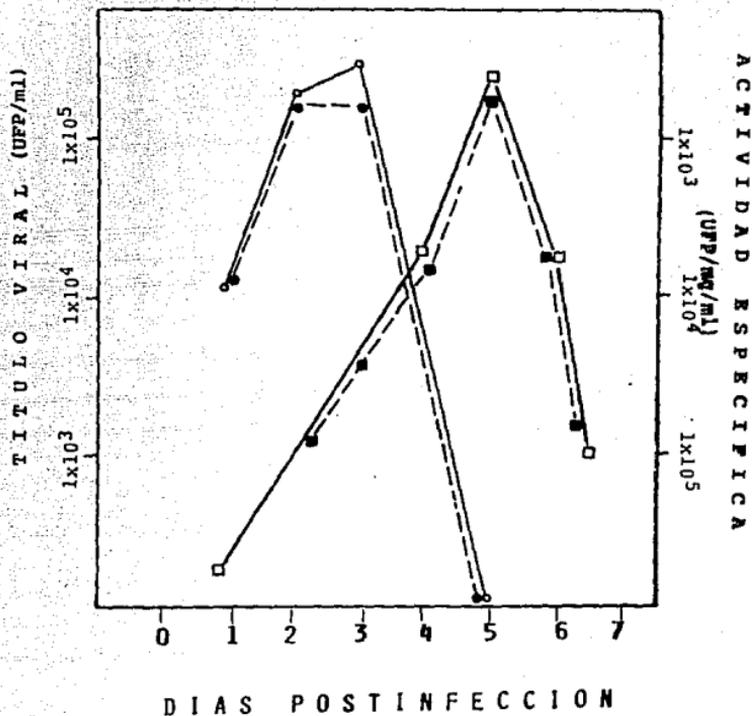
ACT. ESP. = Actividad Especifica.

FIGURA 4



Cinética de formación del sincicio por el VSR.
Se puede observar el número de núcleos a diferentes horas: A) células sin infectar; B) a las 24 horas p.i.; C) a las 48 horas p.i.; D) a las 72 horas p.i.; E) y F) a las 84 horas p.i.
A) y F) 40x y B, C), D), E) 100 x.

FIGURA 5



Cinética de producción del VSR en dos líneas celulares: □ título viral en células HEp-2; ■ actividad específica en células HEp-2; ○ título viral en células Vero; ● actividad específica en células Vero.

CONSERVACION DEL VSR.

Se intentó preservar la infectividad del virus a 4°C. - utilizando como conservadores sulfato de magnesio ($MgSO_4$) 1 M y glicerol al 10%. Se observó el efecto del tiempo de almacenamiento sobre el título viral, desde un tiempo cero hasta 32 semanas. El título con que se inició el experimento para los dos estabilizadores fue de 50 000 UFP/ml. Utilizando el sulfato de magnesio, a las 32 semanas se obtuvo un título de -- 39 000 UFP/ml mientras que con el glicerol en la semana 32 se encontró un título de 24 000 UFP/ml. En tanto que con el experimento testigo se empezó con 125 000 UFP/ml y a las 32 semanas el título solo era de 2 000 UFP/ml. Estos resultados se pueden observar en los cuadros 5 y 6 en la figura 6 en las que se observa la relación del tiempo de almacenamiento con el título viral y con el porcentaje de sobrevivencia (que se encuentra expresado en Log base 10). La infectividad en la semana 32 como se observa al utilizar el $MgSO_4$ se conservó en un 78% con glicerol 48%, en tanto que en el testigo fue solo del 1.6 %.

AISLAMIENTO DEL VSR EN MUESTRAS CLINICAS.

Se obtuvieron 34 muestras clínicas (exudados faríngeos) las cuales se inocularon en células HEp-2, se les dieron tres pases para confirmar el efecto citopático característico del

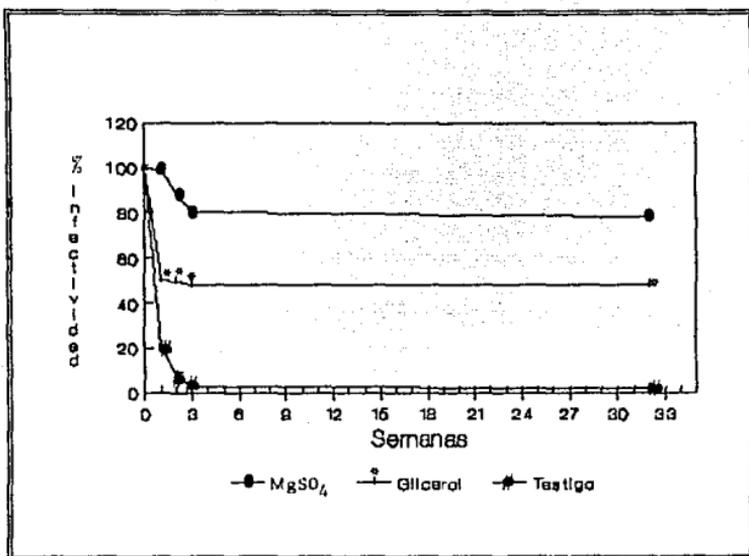
CUADRO 5

EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN EL TITULO VIRAL			
TIEMPO (semanas)	CONSERVADOR		
	MgSO ₄	GLICEROL	TESTIGO
TITULO VIRAL EN UFP/ml			
INICIAL	50 000 ± 0.00	50 000 ± 0.00	125 000 ± 0.00
1	49 500 ± 500	25 000 ± 4041	25 000 ± 1527
2	44 000 ± 1155	24 500 ± 4752	10 000 ± 578
3	40 000 ± 2117	24 000 ± 2646	3 200 ± 200
32	39 000 ± 2000	24 000 ± 3214	2 000 ± 115

CUADRO 6

EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN EL PORCENTAJE DE SOBREVIDA			
TIEMPO (semanas)	CONSERVADOR		
	MgSO ₄	GLICEROL	TESTIGO
PORCENTAJE			
INICIAL	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00
1	99 ± 1.00	50 ± 8.08	20 ± 1.22
2	88 ± 2.31	49 ± 9.50	8 ± 0.46
3	80 ± 4.23	48 ± 5.29	2.56 ± 0.16
32	78 ± 4.00	48 ± 6.43	1.60 ± 0.09

FIGURA 6



Conservación del VSR con dos estabilizadores:

se muestra el porcentaje de sobrevivencia.

● con MgSO₄; □ glicerol; ■ testigo.

VSR. En el primer pase 16 muestras fueron positivas pero al segundo y al tercero solo 9 se mantuvieron con un efecto citopático claro. Las edades y diagnóstico clínico de cada niño se muestran en el cuadro 7 donde se aprecia que estos datos fueron muy variables. El efecto citopático se puede observar en las figuras 7, 8, 9 y 10. Solo nueve muestras presentaron efecto citopático en los tres pases en células HEp-2, y 7 ya no lo volvieron a presentar. Las muestras positivas se agrupan en el cuadro 8.

INMUNOFLUORESCENCIA.

Para comprobar la presencia del antígeno viral en las células que mostraron ECP característico (sincicios), se buscó la presencia del antígeno viral por inmunofluorescencia en células Vero infectadas con el virus aislado después de tres pases. En las figuras 11, 12 y 13 se muestran algunas de las reacciones obtenidas por esta técnica, observadas con iluminación luz ultravioleta (U.V.) y normal, así como un testigo positivo y el negativo en células Vero. Las muestras probadas fueron las 9 positivas y algunas en las que no se presentó el efecto citopático, pero solo las que si habían desarrollado dicho efecto, presentaron la reacción de IFI positiva.

De los 10 testigos negativos ninguno presentó E.C.P. ni dio una reacción de IFI positiva.

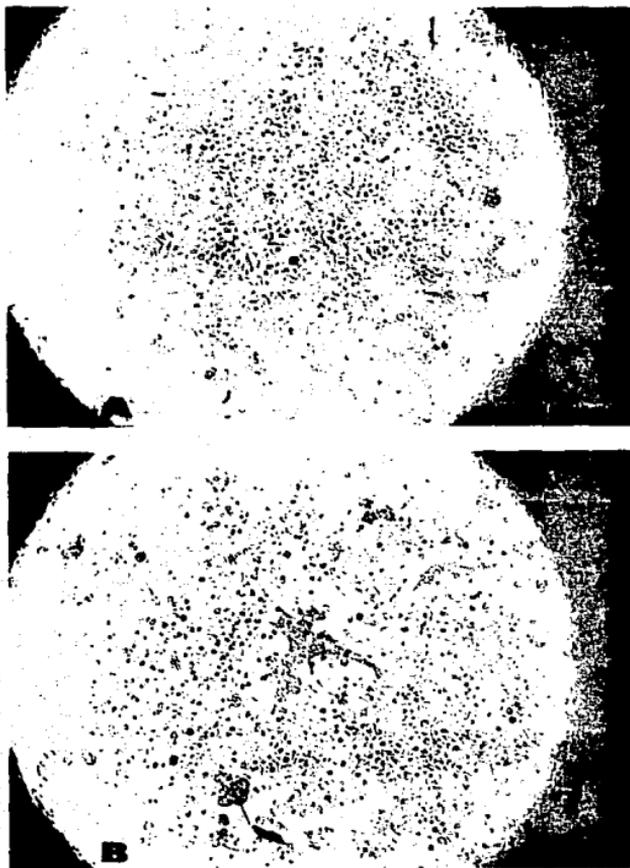
VSR. En el primer pase 16 muestras fueron positivas pero al segundo y al tercero solo 9 se mantuvieron con un efecto citopático claro. Las edades y diagnóstico clínico de cada niño se muestran en el cuadro 7 donde se aprecia que estos datos fueron muy variables. El efecto citopático se puede observar en las figuras 7, 8, 9 y 10. Solo nueve muestras presentaron efecto citopático en los tres pases en células HEp-2, y 7 ya no lo volvieron a presentar. Las muestras positivas se agrupan en el cuadro 8.

INMUNOFLUORESCENCIA.

Para comprobar la presencia del antígeno viral en las células que mostraron ECP característico (sincicios), se buscó la presencia del antígeno viral por inmunofluorescencia en células Vero infectadas con el virus aislado después de tres pases. En las figuras 11, 12 y 13 se muestran algunas de las reacciones obtenidas por esta técnica, observadas con iluminación luz ultravioleta (U.V.) y normal, así como un testigo positivo y el negativo en células Vero. Las muestras probadas fueron las 9 positivas y algunas en las que no se presentó el efecto citopático, pero solo las que si habían desarrollado dicho efecto, presentaron la reacción de IFI positiva.

De los 10 testigos negativos ninguno presentó E.C.P. ni dio una reacción de IFI positiva.

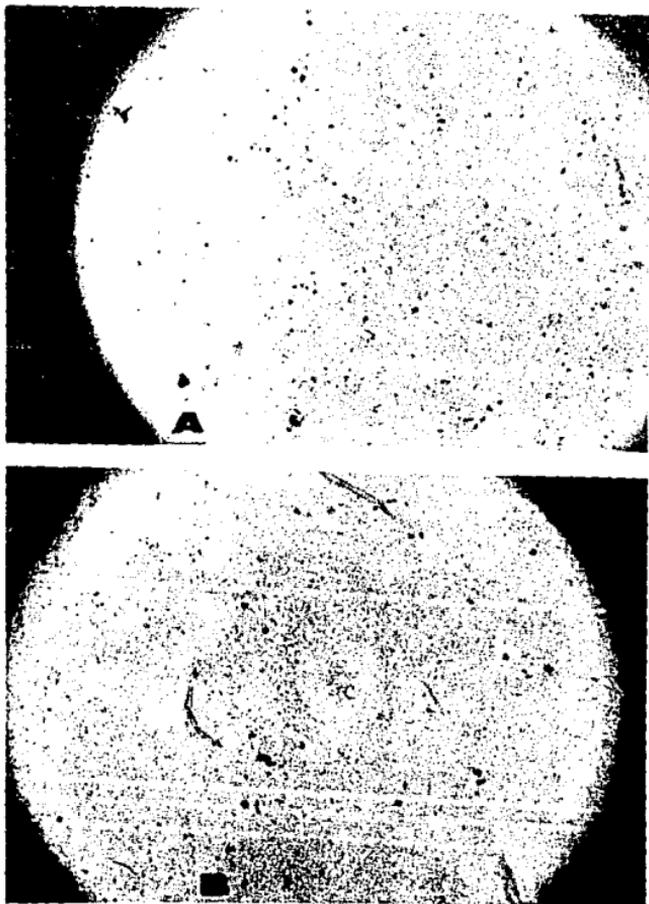
FIGURA 7



Efecto citopático del VSR en células HEp-2

(cepa Long): A) sin infectar; B) 40. día p.i.

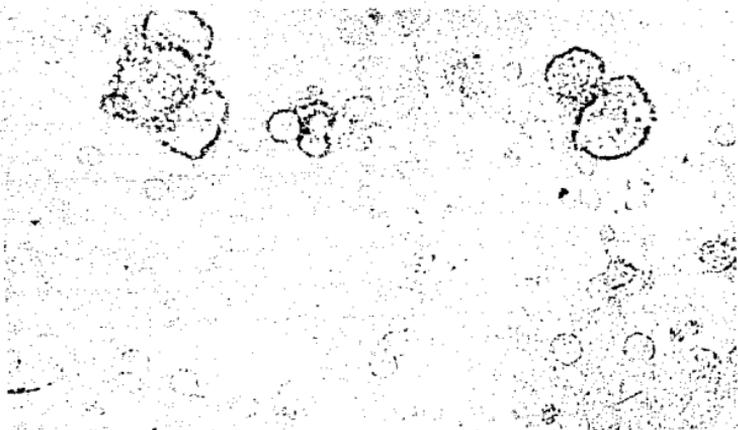
FIGURA 8



Efecto citopático del VSR en células Vero:

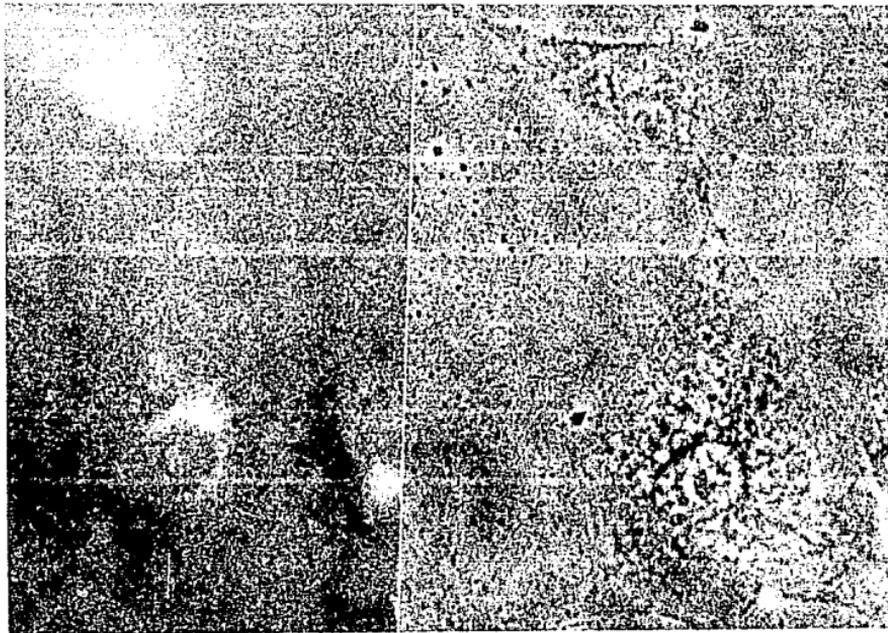
A) sin infectar; B) 40. dfa p.i.

FIGURA 10



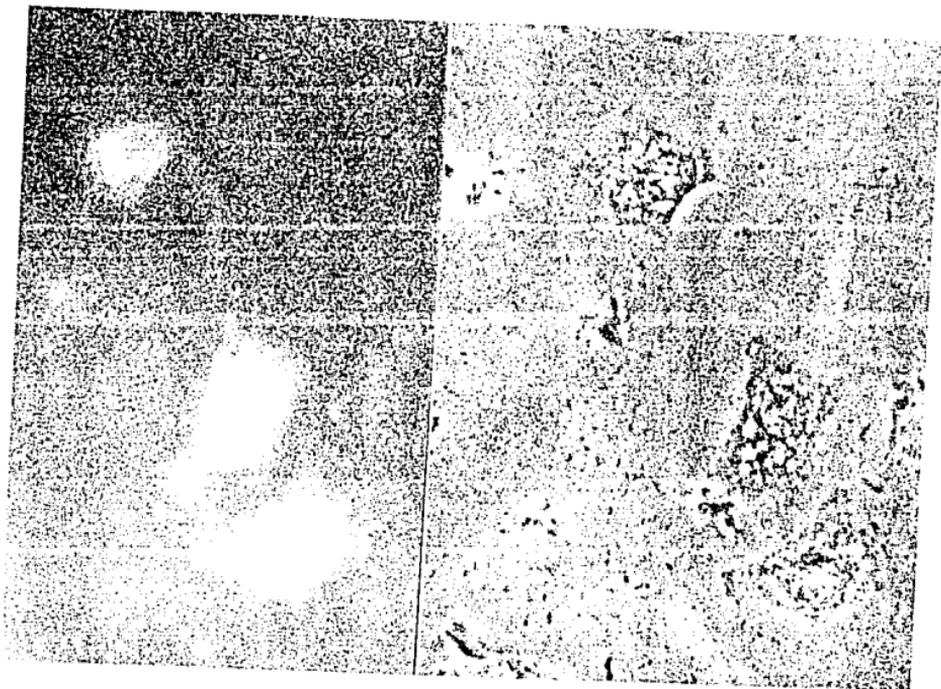
Efecto citopático del VSR aislado de una muestra de exudado faríngeo, en 3er. pase en células Vero al - 40. día p.i.

FIGURA 11



Inmunofluorescencia de los antígenos del VSR aislado de un exudado faríngeo: A) con luz U.V.; B) con - iluminación normal.

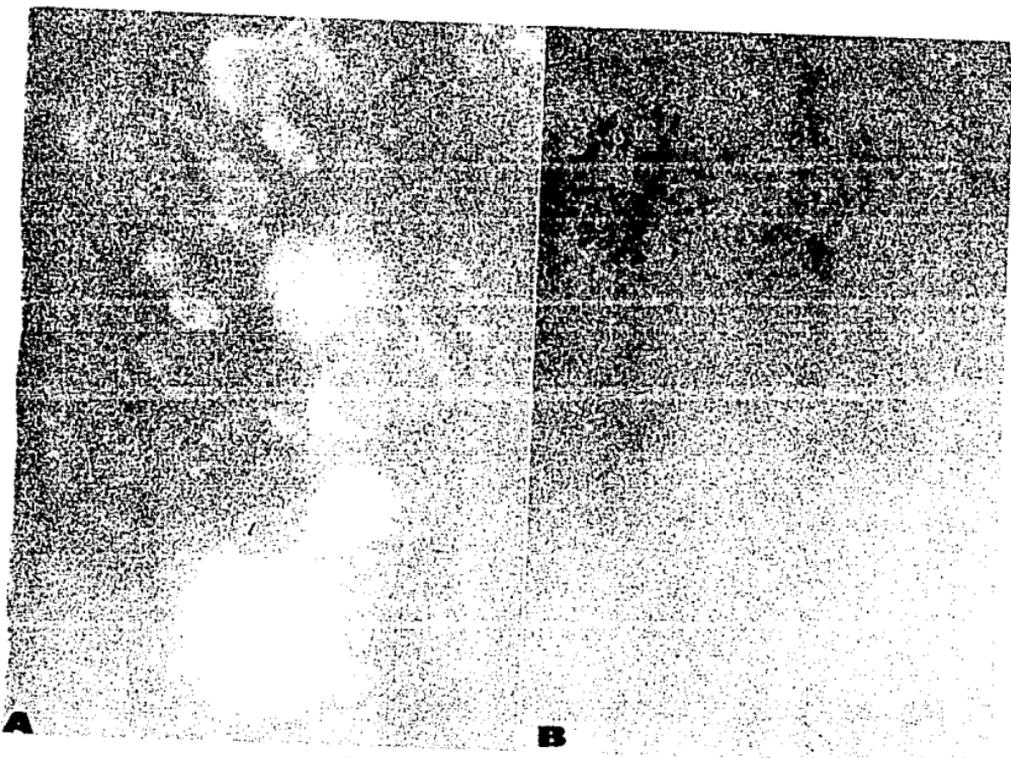
FIGURA 12



B

Imunofluorescencia de los antígenos del VSR cepa Long,
en células Vero: A) con luz U.V.; B) con iluminación
normal.

FIGURA 13



Inmunofluorescencia de los antígenos del VSR:
A) muestra positiva; -B) control negativo.

CUADRO 7

MUESTRAS OBTENIDAS
DE FEBRERO A DICIEMBRE DE 1986

MUESTRA	FUENTE	EDAD	DIAS DE HOSP.	DIAGNOSTICO	E.C.P.* (SINCICIO) 1,2,3.	** I.F.
1	H.G.P.	10 meses	5 días	Síndrome Coquiluchoide	- - -	-
2	H.G.P.	10 meses	48 horas	Bronquiolitis	- - -	-
3	H.G.P.	3 meses	3 horas	IRA	- - -	-
4	H.G.P.	3 meses	48 horas	IRA	- - -	-
5	H.G.P.	9 años	24 horas	IRA	- - -	-
6	H.G.P.	3 meses	24 horas	Bronquiolitis	+ + +	+
7	H.G.P.	6 meses	48 horas	IRA	+ - -	-
8	H.G.P.	7 meses	24 horas	Asma	+ - -	-
9	H.G.P.	2 meses	18 horas	Asma Bronquial	+ + +	+
10	H.G.P.	10 meses	24 horas	IRA	- - -	-
11	H.G.P.	10 meses	14 horas	IRA	- - -	-
12	H.G.P.	10 meses	18 horas	IRA	- - -	-
13	H.G.P.	10 meses	24 horas	IRA	- - -	-
14	I.N.P.	11 meses	24 horas	Chediack-Higashi	- - -	-
15	I.N.P.	1,3 años	24 horas	Síndrome de Wiskott Aldrich e infc.viral Jzregada.	+ + +	+
16	I.N.P.	15 años	24 horas	IRA	+ + +	+
17	I.N.P.	4 años	24 horas	Rinofaringitis viral	+ + +	+
18	I.N.P.	10 meses	24 horas	Bronquitis aguda.	+ + +	+
19	I.N.P.	12 meses	24 horas	Rinofaringitis viral	- - -	-
20	I.N.P.	3 años	24 horas	Bronquitis aguda.	+ + +	+
21	I.N.P.	4 años	18 horas	Bronquitis aguda	- - -	-
22	I.N.P.	6 años	48 horas	Rinofaringitis	- - -	-
23	I.N.P.	7 años	72 horas	Asma Bronquial Aguda	+ + +	+
24	I.N.P.	2,4 años	24 horas	Asma Bronquial Aguda	- - -	-
25	I.N.P.	6 años	24 horas	Asma	+ - -	-
26	I.N.P.	8 meses	24 horas	Bronquitis aguda	+ + +	+
27	I.N.P.	3 años	4 horas	Asma Bronquial Aguda	+ - -	-
28	I.N.P.	11 meses	2 horas	Asma Bronquial Aguda	- - -	-
29	I.N.P.	10 años	24 horas	Asma Bronquial Aguda	+ - -	-
30	I.N.P.	10 meses	24 horas	IRA	+ - -	-
31	I.N.P.	10 meses	3 horas	Asma	+ - -	-
32	I.N.P.	10 meses	24 horas	IRA	- - -	-
33	I.N.P.	7 meses	3 horas	IRA	- - -	-
34	I.N.P.	3 meses	24 horas	Bronquitis Aguda	- - -	-
GRUPO CONTROL						
1		6 meses			- - -	-
2		6 meses			- - -	-
3		5 meses			- - -	-
4		6 meses			- - -	-
5		12 meses			- - -	-
6		14 meses			- - -	-
7		8 meses			- - -	-
8		7 meses			- - -	-
9		7 meses			- - -	-
10		8 meses			- - -	-

H.G.P. = Hospital General - Unidad de Pediatría.

I.N.P. = Instituto Nacional de Pediatría.

* E.C.P. = Efecto Citopático.

** I.F. = Inmunofluorescencia.

1, 2, 3 = Número de pases.

CUADRO 8

MUESTRAS POSITIVAS POR E.C.P. Y POR I.F.

MUESTRA	EDAD (MESES)	DIAGNOSTICO
1	5	BRONQUIOLITIS.
2	2	ASMA BRONQUIAL.
3	15	SINDROME DE WISKOTT-ALDRICH.
4	180	IRA.
5	48	RINOFARINGITIS.
6	10	BRONQUITIS AGUDA.
7	60	BRONQUITIS AGUDA.
8	84	ASMA BRONQUIAL.
9	8	BRONQUITIS AGUDA.

DISCUSION

Un punto fundamental al inicio del trabajo fue establecer las condiciones óptimas para determinar la infectividad del VSR.

La infectividad se observó por la formación de sincicios a diferentes tiempos después de la infección.

El sincicio se pudo observar aproximadamente a las 48 h. p.i. sin embargo, a las 72 h. el sincicio se detecta de una manera muy clara, además a este tiempo se pueden contar con mayor facilidad los núcleos de las células fusionadas: de 72 a 100 células por sincicio.

En un principio el ECP no se observó con facilidad, -- pero una vez que el virus se adaptó a las condiciones de propagación, su replicación fue constante y la cinética de formación del sincicio se hizo reproducible.

Otro factor de relevancia para determinar el ECP fue la tinción de las células infectadas ya que si la observación se hace directamente, no se logra una buena determinación. Se eligió la tinción de Giemsa, pero fue necesario buscar un buen fijador de las células, para ésto se probaron tres tipos: 1) formaldehído al 4%; 2) una mezcla de etanol-éter (20% y 5% respectivamente) y 3) acetona fría. Los dos primeros dieron buenos resultados, mientras que con la acetona las células aparecían como cristalizadas. Por otro lado, la tinción de Giemsa dió buenos resultados, por lo que el fijador que se utilizó rutinariamente fue el formaldehído al 4%.

En cuanto a la propagación viral en las dos líneas celulares utilizadas, los resultados mostrados en la figura 5, nos indican que una vez adaptada la cepa viral a las líneas celulares, el virus se propaga con la misma eficiencia en ambas líneas. Sin embargo, la propagación fue más rápida en células Vero ya que entre el 2o. y 3o. día p.i. se obtiene el título más alto de virus infectivos, mientras que en las células HEp-2, esto se logra entre el 5o. y 6o. día p.i. Esto posiblemente refleje que la expresión viral así como la lisis celular y formación del sincicio es más lenta en células HEp-2. Cabe señalar, de manera interesante que en ambas líneas celulares se obtienen valores similares del título de infectividad y de actividad específica, más aún, el incremento en la actividad específica es simultáneo al de la infectividad, lo cual se observa en ambas líneas celulares.

Un problema adicional que presenta el trabajar con VSR es que la infectividad disminuye aproximadamente el 10% cada vez que el virus se congela y descongela, esta observación resulta congruente con las propiedades reportadas para el virus (59, 61), el cual es muy lábil a los cambios de temperatura. Por tal motivo se decidió buscar un conservador para almacenar el virus a 4°C.

Las sustancias utilizadas fueron el sulfato de magnesio 1 M y el glicerol al 10%; el sulfato de magnesio fue el más eficiente, ya que conservó la infectividad del virus en un 30% más que el glicerol y un 76% más con respecto al testigo en un periodo de 224 días. De esta forma, el utilizar

sulfato de magnesio al 1 M permite almacenar al VSR a 4°C. manteniendo su infectividad alrededor de un 78% por periodos largos.

Sin embargo, la alta concentración del sulfato de magnesio podría dañar a las células, por lo que se debe diluir el virus a una concentración menor que no dañe a las células y se pueda seguir manteniendo la infectividad del virus.

Ya que el objetivo principal del trabajo era confirmar la presencia del virus en muestras biológicas aisladas de niños con infecciones agudas del aparato respiratorio, una parte importante fue el aislamiento del virus.

La técnica de aislamiento se realizó a partir de exudados faríngeos, la técnica con estas muestras presenta baja eficiencia de aislamiento, en comparación al uso de aspiración nasofaríngea (59, 60, 61), sin embargo, por dificultades técnicas en los hospitales donde se recolectaban las muestras, el exudado faríngeo fue el método más apropiado.

La presencia del antígeno viral se determinó en un principio por inmunofluorescencia de manera directa sobre las células del exudado, de esta forma los resultados obtenidos no pudieron comprobarse por ECP, ya que resultados positivos por IF no eran confirmados por ECP, posiblemente la técnica de IF resultó inespecífica, es decir, determinó falsos positivos o tal vez la concentración del virus fue insuficiente para infectar el cultivo celular y mantener el ECP apreciable o el virus sufrió algún daño durante el transporte y así no produjo ECP.

Por tal motivo se decidió infectar con las muestras del exudado de manera directa a los cultivos celulares en presencia de altas concentraciones de antibióticos, con el propósito de realizar varios pases del virus y ver un mejor efecto. En siete casos se observó un efecto citopático en un primer pase, pero en pases sucesivos, este efecto desapareció, además al realizar la IF, no se observó la presencia del antígeno viral. Es posible que dicho efecto citopático inicial se debiera a toxinas bacterianas o bien, a otro virus que no se propagó en las líneas celulares utilizadas y que al realizar los pases subsecuentes, éstas toxinas o virus se fueron diluyendo. Cabe señalar que todas las muestras positivas por IF también lo fueron para ECP en más de dos pases, lo que -- muestra una correlación del 100%. Esto indica que el ECP se mejora al hacer pases sucesivos de la muestra, y que lo que se pensaba era inespecificidad de la técnica de IF, no era -- sino baja sensibilidad de la técnica para observar el ECP. Por otro lado el 66% de las muestras que fueron positivas -- tanto para IF como ECP, correspondieron a muestras de pacientes con infecciones de los bronquios, que es el sitio donde el virus se replica de mejor manera.

Además el 55% son pacientes menores de 24 meses, edad en que se presenta con mayor frecuencia la infección por VSR. Es interesante notar que en un paciente de 15 años presentó la infección y aquí podría tratarse de una reinfección, ya -- que se ha visto que niños que presentan la infección en los primeros meses de vida pueden tener reinfecciones recurrentes

a lo largo de su vida (44, 45).

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se podría estandarizar la técnica de detección del VSR por ECP, para eliminar en lo sucesivo compra de equipo y reactivos - poco accesibles a los laboratorios clínicos de nuestro país, sin embargo, para asegurar ésto, tendría que realizarse un estudio con un mayor número de muestras.

Otro dato interesante que se observa al ver los resultados, aunque se trata de una muestra pequeña, es que el 44% de los pacientes con problemas en bronquios, presentó infección con VSR, lo cual se aproxima a los resultados obtenidos por Kim y col. en Washington, D.C. (50), quienes reportan -- que un 54% de los pacientes con problemas en bronquios presentaron infección por VSR.

Tomando en cuenta la importancia que tiene la infección por VSR. es necesario hacer estudios epidemiológicos más amplios sobre este virus en nuestro país.

CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se llegó en este trabajo son las siguientes:

- 1) El virus se propagó en las células HEP-2 y Vero, - con altos títulos.
- 2) Las condiciones óptimas de propagación fueron: la multiplicidad de infección de 0.01 UFP/cél en las - dos líneas celulares; día indicado para cosechar - el virus: el 3o. cuando se crece en células Vero y el 5o. cuando se crece en células HEP-2.
- 3) En la conservación del virus, se encontró que el - sulfato de magnesio mantiene la infectividad por - largos periodos a 4°C.
- 4) Se encontró que de 34 muestras probadas, en nueve de ellas que es el 26.4% se logró aislar al virus y observar el efecto citopático característico.
- 5) Por medio de la inmunofluorescencia indirecta se - comprobó la presencia de antígenos virales, lo que verificó las muestras positivas.
- 6) El aislamiento del virus en cultivos celulares y la prueba de inmunofluorescencia son técnicas eficientes para el diagnóstico del VSR.
- 7) Por los resultados obtenidos, se concluye que el - VSR fue aislado de niños hospitalizados y es uno de los agentes causales de infecciones respiratorias - agudas en nuestro país.

De manera que utilizando las condiciones establecidas en este trabajo se puede aislar y propagar al VSR.

BIBLIOGRAFIA.

1. Akerlind, B., E. Norrby . 1986. Occurrence of respiratory syncytial virus subtypes A and B strains in Sweden . J. Med. Virol. 19 : 241-7.
2. Akerlind, B., E. Norrby., C. Orvell., M.A. Mufson. 1988. Respiratory syncytial virus: Heterogeneity of subgroup B strains. J. gen. Virol. 69: 2145-54.
3. Almeida, J. 1972. Practical aspects of diagnostic electron microbiology. J. of Biol. and Med. 53: 5-18.
4. Almeida, J. 1982. Rapid viral diagnosis by electron microscopy. Scand. J. Infect. Dis. 16: 117-20.
5. Arens, M. Q., Z. Swierkos. 1986. Enhanced Isolation of respiratory syncytial virus in cell culture. J. Clin. Microbiol. 23 (4): 800-2.
6. Baldrige, P., B. S. Laurence. 1976. Persistent Infection of cell in culture by respiratory syncytial virus. Proc Soc. Exp. Biol Med. 151: 684-8.
7. Ball, A., L. Young., K. Anderson., L. P. Collins., W. G. Werst. 1986. Expression of the major glycoprotein G of human respiratory syncytial virus from recombinant vaccinia virus vector. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 83: 246-50.
8. Bangham, C. R. 1975. Murine cytotoxic T cell specific to respiratory syncytial virus recognize different Ags subtypes of the virus. J. gen. Virol. 67: 623-9.
9. Belshe, R. B., L. Van Voris. 1982. Comparison of enzyme linked Immunoabsorbente assay and Neutralization techniques for measurement of antibodies to respiratory syncytial virus. Infect. and Immun. 37 (1): 160-5.
10. Bromberg, K., D. Bennett., 1984. Comparison of immediate and delayed inoculation of HEP-2 cells for isolation of respiratory syncytial virus. J. Clin. Microbiol. 20 (1): 123-4.
11. Bustamante, M. E., M. Bravo., I. Sanchez. 1959. Condiciones de la salud en México. Salud Pública en México. 1 (2): 33-53.
12. Cash, P., M. Wunner. C. R. Pringle. 1977. A comparison of the polipeptides of human and bovine respiratory syncytial viruses and Pneumonia Viruses. Virol. 82: 369-79
13. Cash, P., R. Pringle., C. Preston. 1979. The polypeptides of human respiratory syncytial virus: Products of cell-free protein synthesis and post-translation modifications. Virol. 92: 372-84.
14. Cradock, W., N. Quillin., P. S. Gardner. 1970. Rapid Diagnosis of respiratory syncytial virus infection in children by the immunofluorescent technique. J. Clin. Path. 24: 308-12.
15. Cranage, M., P. S. Gardner., K. McInthosh. 1981. In vitro cell-depent lysis of respiratory syncytial virus-infected cells mediated by antibody from local respiratory secretions. Clin. Expe. Immunol. 43: 28-35.

16. Crane, R., A. J. Kish,, R. Voravit., J. R. Merline., T. Raval. 1981. Fatal syncytial virus pneumonia in a laminar airflow room. *JAMA*. 246(4): 366-68.
17. De Silva, L. M., M. G. Hanlon. 1986. Respiratory syncytial virus: A report of a 5-year study at a childrens hospital. *J. Med. Virol.* 19: 299-305
18. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud y Asistencia. 1982. Panorama epidemiológico de los Estados Unidos Mexicanos. Incidencia de enfermedades transmisibles: infecciones respiratorias agudas. Informe epidemiológico de 1979. *Epidem.* 2(2, 3): 91-111
19. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud y Asistencia. 1983. Enfermedades transmisibles en los Estados Unidos Mexicanos. *Epidem.* 3(2): 7
20. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud y Asistencia. 1984. Informe estadístico sobre enfermedades transmisibles. *Epidem.* 4(6): 17-9.
21. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud y Asistencia. 1984. Informe estadístico sobre enfermedades transmisibles. *Epidem.* 4 (14-15): 70-3.
22. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud y Asistencia. 1986. Informe estadístico sobre enfermedades transmisibles. *Epidem.* 1(7): 85-90.
23. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud y Asistencia. 1987. Informe estadístico sobre enfermedades transmisibles. *Epidem.* 2(4): 44-7.
24. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud y Asistencia. 1987. Informe estadístico sobre enfermedades transmisibles. *Epidem.* FC 2(6): 68-71.
25. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud y Asistencia. 1987. Informe estadístico sobre enfermedades transmisibles. *Epidem.* 2(10): 120-3.
26. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud y Asistencia. 1988. Informe estadístico sobre enfermedades transmisibles. *Epidem.* 3(5): 52-5.
27. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud y Asistencia. 1988. Informe estadístico sobre enfermedades transmisibles. *Epidem.* 3(12): 160-3.
28. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud y Asistencia. 1989. Informe estadístico sobre enfermedades transmisibles. *Epidem.* 4(8): 119-22.
29. Dickens, L. E., P. L. Collins., G. W. Wertz. 1984. Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 52(2): 264-9.
30. Dumorat, F., J. Norber., J. Roberts., E. Walsh., D. Ron. 1985. Respiratory syncytial virus infection of human mononuclear leukocytes in vitro and in vivo. *J. Infect. Dis.* 152(5): 895-902.
31. Elango, N. G., A. Prince., B. R. Murphy., V. Sundararajan., R. Chanock., B. Moss. 1986. Resistance to human respiratory syncytial virus infection induced by immunization of cotton rats with a recombinant vaccinia virus expressing the RSV G glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 1906-10.

32. Faden, H., J. N. Kaul., P. Ogra. 1983. Activation of oxidative and arachidonic acid metabolism in neutrophils by respiratory syncytial virus antibody complex: Possible role in disease. *J. Infect. Dis.* 148(1): 110-16.
33. Fernie, F., J. Gerin. 1980. The stabilization and purification of respiratory syncytial virus using MgSO₄. *Virology* 106: 141-4.
34. Fernie, F., John Gerin. 1982. Immunochemical identification of viral and nonviral proteins of respiratory syncytial virus virion. *Infect. Immun.* 37(1): 243-9.
35. Freymuth, F. 1980. Rapid Diagnosis of respiratory syncytial virus infections in children. *Lancet.* 6: 539-40.
36. Friedman, H., M. Christine., B.F..M.S. 1982. Diagnosis of viral respiratory infections in the 1980s. *Symp. res. Infect. Clin. Lab. Med.* 2(2): 383-91.
37. Gruber, C., S. Levine., 1985. Respiratory syncytial virus polypeptides. The oligosaccharides of the glycoproteins. *J. gen. Virol.* 66: 417-32
38. Hall, C. B., R. D. Gordon. 1975. Neonatal respiratory syncytial virus infection. *N. Engl. J. Med.* 300(8): 393-6.
39. Hall, C. B., R. D. Gordon. 1975. Clinically useful method for isolation of a respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 131(1): 1-5.
40. Hall, C. B., R. D. Gordon. 1975. Nosocomial respiratory syncytial virus infections. *N. Engl. J. Med.* 293(26): 1343-6
41. Hall, C. B., M. Joyse. 1976. RSV Infections with families. *J. Med.* 294(8): 414-9.
42. Hall, C. B., E. Walsh., J. F. Hruska., R. F. Betts., W. J. Hall. 1983. Ribavirin treatment of experimental respiratory syncytial virus infection. *JAMA.* 249(19): 2666-70.
43. Hall, C. B., J. T. Bride., E. Walsh., D. Bell., C. Gala., S. Hildreth., L. Eyck.; J. W. Hall. 1983. Aerosolized ribavirin treatment of infants with respiratory syncytial viral infection. *N. Engl. J. Med.* 308(24): 1443- 7.
44. Hall, J. W., C. B. Hall. 1978. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Ann. Int. Med.* 88: 203-5
45. Henderson, F., A. Collier., A. Wallace., W. Floyd . 1979. Respiratory syncytial infections, reinfections and immunity. *New. Engl. J. Med.* 10: 530-4.
46. Hornsleth, A., B. Niels., B. Friis. 1985. Detection of respiratory syncytial virus IgG subclass specific antibodies: Variation according to age in infants and children and diagnostic value in RSV infected small infants. *J. Med. Virol.* 16: 329-35.
47. Hornsleth, A., B. Niels., B. Friis. 1985. Detection by ELISA of IgG-subclass specific antibodies in primary

- respiratory syncytial virus infections. *J. Med. Virol.* 16: 321-8.
48. Jacobs, J. W., D. F. Peacock. 1971. Respiratory syncytial virus and other viruses associated with Respiratory diseases in infants. *Lancet* 17(3):871-6.
 49. Kaul, A., R. Scott. . 1978. Respiratory syncytial virus infection. *Ann. J. Dis. Child.* 132: 1088-90.
 50. Kim, H. W. J. O. Arrobio., C. D. Brandt., B. C. Jeffries., G. Pyles., J. Reid., R.M Chanock. 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus in Washington. D. C. I. Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infection. *Am. J. Epidemiol.* 98: 216-25.
 51. Lambert, D., W. Pons., M. Marcel., M. Gustave., K. Dorschhasler . 1980. Nucleic acids of respiratory syncytial virus . *J. Virol.* 36(3): 837-46.
 52. Lamden, R. P. 1985. Nucleotide sequence of respiratory syncytial virus phosphoprotein gene. *J. gen. Virol.* 66: 1607-12.
 53. Lamprecht, C., E. H. Krause ., M. Mufson . 1976. Role of maternal antibodies in Pneumonia and Broncholitis due to respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 134(3): 211-7.
 54. Levine, S., A. Buthala., R. Hammlton. 1971. Late stage synchronization of respiratory syncytial virus replication. *Virol.* 45: 390-400.
 55. Levine, S. 1977. Polypeptides of respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 21(1): 427-31.
 56. Levine, S., R. K. Franco., R. Paradiso. 1987. Demonstration that glycoprotein is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J. gen. Virol.* 68: 2521-4.
 57. Levine, S., A. Dajani., R. K. Franco. 1988. The response of infants with Broncholitis to the proteins of respiratory syncytial virus. *J. gen. Virol.* 69: 1229-39.
 58. McIntosh, K., H. Masters., I. Orr. R. Chao., M. Barkin. 1978. The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants. *J. Infect. Dis.* 138(1):24-32.
 59. McIntosh, K., R. Chanock. 1985. Respiratory syncytial virus . En: *Virology. Cap. 54. pp. 1285-1304.*
 60. McIntosh, K., J. Clark. 1985. Parainfluenza and respiratory syncytial viruses. En *Manual of Clinical Microbiology. fourth edition. Cap. 73. Raven Press. p. 763-68.*
 61. McIntosh, K., J. Clark. 1990. Respiratory syncytial virus. En: *Virology. Cap. 38. 1045-72.*
 62. Minnich, L., G. Ray . 1980. Comparison of direct Immunofluorescent staining of clinical specimens for respiratory syncytial virus antigens with conventional

- isolation techniques. *J. Clin. Microbiol.* **12**(3): 391-4.
63. Morris, J. A., E. Blount., E. Savage., 1956. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc. Exp. Biol. Med.* **92**: 544-9
 64. Mufson, A. M., C. Orvell., B. Rafnar ., E. Norrby. 1985. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J. gen. Virol.* **66**: 2111-4.
 65. Norby, E., G. Enders., V. T. Meulen. 1975. Differences in the appearance of antibodies to structural components of measles virus after immunization with inactivated and live virus. *J. Virol.* **132**(3): 262-9
 66. Peiris, J., J. S. Porterfield. 1979. Antibody-mediated enhancement of flavivirus replication in macrophage like cell lines. *Nature.* **285**: 509-11.
 67. Peiris, J., S. Levine. 1980. Metabolic requirements for the maturation of respiratory syncytial virus. *Nature.* **285**: 509-11.
 68. Pemberton, R., M. J. Cannon., P. J. Openshaw., L. A. Ball., G. W. Wertz., B. A. Askonas. 1987. Cytotoxic cell specificity for respiratory syncytial virus proteins: Fusion protein is an important target antigen. *J. gen. Virol.* **68**: 2177-82.
 69. Pons, W. M., A. L. Lambert., D. M. Lambert., O. M. Rochovansky. 1983. Improvement of respiratory syncytial virus replication in actively growing HEp-2 cells. *J. Virol. Meth.* **7**: 217-21.
 70. Pringle, C. R., P. V. Shirodaria., P. Cash., D. J. Chiswell., P. Malloy. 1978. Initiation and Maintenance of persistent infection by respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **28**(1): 199-211.
 71. Ranjit, R., W. R. Ompan. 1986. Monoclonal antibodies reveal extensive antigenic differences between the hemagglutinin-neuroaminidase glycoprotein of human and bovine paraenfluenza tres virus. *Virol.* **148**: 232-6.
 72. Robbins, A., P. Freedman. 1988. Obstacles to developing vaccines for the third World. *Scient. Am.* **259**(5): 90-5.
 73. Rooney, J. C., H. E. Williams. 1971. The relationship between proved viral bronchiolitis and subsequent weezing. *J. Pediat.* **79**(5): 744-7.
 74. Sarkkinen, H. K., P. E Halonen., . P. Arstila., A. Salmi. 1981. Detection of respiratory syncytial ,parainfluenza type 2 and adenovirus antigens by radioimmunoassay and Enzyme immunoassay on nasopharyngeal specimens from children with acute respiratory disease . *J. Clinic. Microbiol.* **13**(2): 258-65.
 75. Scott, R., C. R. Pullan., M. Scott., J. McQuillin. 1984. Cell-Mediated immunity in respiratory syncytial virus discase. *J. Med. Virol.* **13**: 105-14.
 76. Sims, D. G., M. Downham., P. S. Gardner., J. K. Webb., D. Weightman . 1978. Study of 8 year old children with

- a history of respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy. *Brit. Med. J.* 12: 11-4.
77. Stott, E. J., G. Taylor. 1985. Respiratory syncytial virus brief review. *Archiv. Virol.* 84(1): 1-52.
 78. Stott, E. J., L. Ball., K. H. Young., J. Furze., G. W. Wertz. 1986. Human respiratory syncytial virus glycoprotein G expressed from a recombinant vaccinia vector protects mice against live- virus challenge. *J. Virol.* 60(2): 607-13.
 79. Sun, Chong Son., P. Wyde., V. Wilson., Z. Samuel., V. Knight . 1983. Cell mediated cytotoxic responses in lung of cotton rats infected with respiratory syncytial virus. *Ann. Rev. Resp. Dis.* 127: 460-4
 80. Suto, T., N. Yano ., M. Ikeda ., M. Miyamoto ., S. Shigeta ., Y. Hinuma ., N. Ishida. 1965. Respiratory syncytial virus infection and its serologic epidemiology. *J. Epidem.* 82(3): 211-24
 81. Tannock, A. G., C. J. Hierholser., A. D. Bryce ., F. Cheeching ., J. A. Paul. 1987. Freeze drying of respiratory syncytial virus for transportation and storage. *J. Clin. Microbiol.* 53: 1769-71.
 82. Trépanier, P., P. Payment., M. Trudel. 1981. Concentration of human respiratory syncytial virus using ammonium sulfate, polyethylene glycol or Hollow fiber ultrafiltration. *J. Virol. Meth.* 3: 201- 11.
 83. Trudel, M., F. Nadon., C. Séguin., S. Ghoubril., P. Payment., P. Trépanier. 1986. Immunovirological studies on human respiratory syncytial virus structural proteins. *Can. J. Microbiol.* 32(1): 15-21.
 84. Ulf, E. P., P. Ebert., A. Wenner. 1964. Respiratory syncytial virus. Observations on antigenic heterogeneity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115: 240-3.
 85. Wagner, D., B. S. Graham., P. F. Wright., E. Walsh., H. W. Kim., C. B. Reimer., D. L. Nelson., R. Chanock. 1986. Serum immunoglobulin G antibody subclass responses to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins after Primary infection. *J. Clin. Microbiol.* 24(2): 304-6.
 86. Wallace, T. H. 1954. Transplantable human neoplasms maintained in cortisone treated laboratory animals. *H. S. num. 1 ; HEP-2 num.1 ; HEP-2 num. 2; HEP-2 num. 3; and H: EMB. Rh. num.1. Cancer Res.* 9: 660-6.
 87. Walsh, E. E., J. Hruska. 1983. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: Identification of the fusion protein. *J. Virol.* 47(1): 171-7.
 88. Walsh, E. E., J. J. Schlesinger., M. W. Brandriss. 1984. Purification and characterization of PG90, one of the envelope glycoproteins of respiratory syncytial virus. *J. gen. Virol.* 65: 761- 67.
 89. Walsh, E. E., M. W. Brandriss., J. J. Schlesinger. 1985. Purification and characterization of respiratory syncytial virus fusion protein. *J: gen. Virol.* 66: 409-15.

90. Walsh, E. E., P. J. Cote., F. Bruce., J. J. Schlesinger., M. W. Brandriss. 1986. Analysis of the respiratory syncytial virus fusion protein using monoclonal and polyclonal antibodies. *J. gen. Virol.* 67: 505-13.
91. Walsh, E. E., M. W. Brandriss., J. J. Schlesinger. 1987. Immunological differences between the envelope glycoproteins of two strains of human respiratory syncytial virus. *J. gen. Virol.* 68: 2169-76.
92. Ward, K. A., O. R. Lambden., M. M. Ogilvie., P. J. Watt. 1983. Antibodies To respiratory syncytial virus polypeptides and their significance in human infection. *J. gen. Virol.* 6: 1867-76.
93. Welliver, C. R., T. N. Kaul., P. L. Ogra. 1980. The appearance of cell-bound IgE in respiratory-tract epithelium after respiratory syncytial virus infection. *New. Engl. J. Med.* 303(21): 1198-202.
94. Welliver, C., D. T. Wong., N. Sun., E. Middleton., R. S. Vaughan., P. L. Ogra. 1981. The development of respiratory syncytial virus specific IGE and the release of histamine in nasopharyngeal secretions after infection. *New. Engl. J. Med.* 305(15): 841-6.
95. Welliver, C. R., T. N. Kaul., M. Sun., . P. L. Ogra. 1984. Defective regulation of immune responses in respiratory syncytial virus infection. *J. Immun.* 133(4): 1925-30.
96. Wright, F. P., J. Mills., R. Chanock. 1971. Evaluation of a temperature-sensitive mutant of respiratory syncytial virus in adults. *J. Infect. Dis.* 124(5): 505-11
97. Wright, F. P., R. B. Belshe., H. W. Kim., L. P. Van Voris., M. Obert., R. Chanock. 1982. Administration of a highly attenuated live respiratory syncytial virus vaccine to adults and children. *Infect. and Immun.* 37(1): 397-400.
98. Wulff, H., E. A. Wenner. 1964. Respiratory syncytial virus: Observations on antigenic heterogeneity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115: 240-3.