

98  
2y

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**DETECCION Y ANALISIS DE LA VARIABILIDAD  
GENETICA DEL VIRUS SINCIETAL RESPIRATORIO  
POR TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR**

**TESIS MANCOMUNADA  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A N  
ANGEL RAVIZE CHAVEZ  
MIRZA GABRIELA ROMERO VALDOVINOS**

MEXICO D. F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

Jurado asignado:

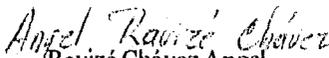
Presidente:	Prof. María Leonila De La O Maese
Vocal:	Prof. Marisol López López
Secretario:	Prof. Beatriz Gómez García
1er suplente:	Prof. Aida Navaz Pérez
2do suplente:	Prof. Enrique Ortega Soto

Sitio donde se desarrolló el tema:  
Laboratorio de Virología  
del departamento de Microbiología y Parasitología  
de la Facultad De Medicina de la UNAM.

Asesor del Tema

  
Dra Beatriz Gómez García

Sustentantes:

  
/Ravizé Chávez Angel

  
Romero Valdovinos Mirza Gabriela.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología del  
Departamento de Microbiología y Parasitología en la  
Facultad de Medicina, UNAM

Este trabajo fue posible gracias al apoyo de:

La dirección General de Asuntos del Personal Académico  
(DGAPA) proyecto IN 200894

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al  
proyecto 0476-M9108

Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS) al  
proyecto 2211

### **AGRADECIMIENTOS:**

A la Dra Beatriz Gómez García por su valiosa y acertada dirección en el desarrollo de este proyecto y por la confianza y comprensión brindadas durante el mismo.

Al Dr. Rogelio Alosó Morales por sus enseñanzas y ayuda incondicional en nuestro aprendizaje de las técnicas de biología molecular.

A Los miembros del jurado por su amable colaboración.

A los compañeros del laboratorio: Roció y Rosa Elena por su dedicación y ayuda en el desarrollo del trabajo experimental; a Jesús Nuñez e Ignacio Palacios porque sin ellos sería imposible el trabajo en el laboratorio; a Antonieta y Enrique por su valiosa amistad.

AGRADECIMIENTOS:

Angel:

*Agradezco a Dios y a mis padres Angelo  
Ravizé y Rosa Chávez.*

AGRADECIMIENTOS:

Mirza:

A Pablo por todo el amor que das.  
A la familia Maravilla Campillo por su  
amistad y cariño.  
A Susi, Maru, Caty, Laura y Olivia  
porque siempre me han brindado su  
amistad.

Dedicatorias:

Angel

*A la temporalidad*

Mirza

*A la memoria de mi padre Eduardo Romero Saucedo*

*A mi Madre Nohemí Valdovinos y a mis hermanos  
Noemí y Eduardo*

## INDICE:

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
ANTECEDENTES	2
ASPECTOS BIOQUÍMICOS	2
INMUNIDAD	5
VARIACIÓN ANTIGÉNICA	7
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	8
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	9
DIAGNOSTICO	11
<b>OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>13</b>
<b>FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS DE RT-PCR</b>	<b>14</b>
<b>ESTRATEGIA DE TRABAJO</b>	<b>15</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>17</b>
PROPAGACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES	20
PROPAGACIÓN DEL VIRUS	20
TITULACIÓN DEL VIRUS	20
EXTRACCIÓN DE ARN CELULAR TOTAL	21
DIGESTIÓN CON NUCLEASAS ADNasa Y ARNasa	22
SÍNTESIS DE ADNc	22
AMPLIFICACIÓN	22
DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	23
<b>RESULTADOS:</b>	<b>24</b>
PROPAGACIÓN DE LAS CEPAS VIRALES	24
OBTENCIÓN DE ARN CELULAR TOTAL	24
ANÁLISIS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS	26
OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MAGNESIO	28
CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE Taq POLIMERASA	29
DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO	
POSTINFECCIÓN PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN	31
DISCRIMINACIÓN POR PESO MOLECULAR DE LOS SUBGRUPOS DE VSR POR PCR-SUBGRUPO ESPECÍFICA PARA LAS CEPAS LONG Y B8/60	32
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	33
OBTENCIÓN Y COMPARACIÓN DE LOS PATRONES DE RESTRICCIÓN PARA LAS CEPAS LONG Y B 8/60	34
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>45</b>

## INTRODUCCIÓN

El virus sincitial respiratorio (VSR) es considerado mundialmente el principal agente causal de infecciones agudas del tracto respiratorio en niños y ancianos. En áreas con climas templados causa epidemias anuales en los meses invernales y tiende a desaparecer en verano (1).

En países desarrollados aproximadamente la mitad de los niños se infectan en su primer estación invernal y casi la totalidad de ellos han sido infectados a los dos años. La mortalidad en niños sanos es aproximadamente del 1% pero se incrementa hasta el 3% en aquellos niños con situaciones agravantes como: cardiopatías, enfermedades pulmonares congénitas, prematurez o inmunosupresión (2, 3).

A nivel mundial el VSR es el agente etiológico del mayor número de casos de bronquitis y neumonías severas que requieren hospitalización en niños de cero a doce meses de edad y de las infecciones nosocomiales de las vías respiratorias en pabellones infantiles (4)

En México las enfermedades de vías respiratorias inferiores ocupan el primer lugar en morbilidad infantil, en el año de 1989 la tasa de morbilidad correspondió a 2985.04 en niños de 1 a 4 años y de 1 300.46 en menores de un año por cada 100 000 niños nacidos vivos respectivamente. Estos reportes no especifican el agente causal sin embargo es posible que el VSR este involucrado ya que la mortalidad por neumonía y bronquitis aumenta en los meses de septiembre a marzo que es el periodo donde se reportan las epidemias (5).

## ANTECEDENTES

### ASPECTOS BIOQUÍMICOS

La principal características del virus es su capacidad de fusionar células produciendo sincicios, células multinucleadas en cultivo. El virus ha sido incluido en la familia *Paramixoviridae*, dentro del género *Pneumovirus*, debido que presenta semejanzas con los miembros de la familia como son: a) forma de la nucleocápside; b) la envoltura que consiste de una bicapa lipídica que proviene de la membrana de la célula huésped que contiene proteínas virales transmembranales y glicoproteínas de superficie, y c) su mecanismo de maduración. Aunque también presenta diferencias: a) el diámetro de la nucleocápside es de 12 a 15 nm en lugar de 18nm, b) su genoma codifica para un mayor número de proteínas, que otros paramixovirus (10 en comparación con seis o siete) c) el aspecto general de las inclusiones intracitoplasmáticas que produce en la infección presentan un aspecto diferente al de otros paramixovirus y d) finalmente no presenta hemaglutinina ni neuraminidasa (6).

Es un virus pleomórfico, mide 150 a 300 nm de diámetro pero partículas de mayor tamaño así como filamentos son comunes cuando se observa al microscopio electrónico.

Presenta una envoltura lipoproteica, su nucleocápside es helicoidal mide 13.5 nm de diámetro y su genoma está constituido por una sola cadena lineal de ARN con polaridad negativa, con valor de sedimentación de 50s y un peso molecular de aproximadamente de 5 000 KD (6).

De las proteínas estructurales (F, G, SH, N, P, L, M Y M2) presentes en el virión de VSR, cuatro están expresadas en la superficie de las células infectadas (F, G, SH, M2). Las proteínas no

estructurales, designadas NS1 (1C) y NS2 (1B), se encuentran en células infectadas pero no en los viriones.

La proteína matriz M es una proteína cuya función principal es estabilizar la envoltura viral y participar en el ensamblaje, se sabe que contiene 256 aminoácidos, es relativamente básica y puede interactuar con la membrana de la célula infectada.

La función y localización exactas de una segunda proteína de matriz (M2) no están claras pero mientras M es hidrofóbica M2 es muy básica e hidrofílica.

La glucoproteína mayor (G) tiene un peso molecular de 70 a 90 KD, se considera necesaria para la adsorción del virus a la célula huésped y se ha considerado análoga a la hemaglutinina-neuraminidasa de otros paramixovirus.

La glucoproteína de fusión (F), tiene un peso molecular de 60-68 KD. Está compuesta por dos polipéptidos unidos por puentes disulfuro. Esta glucoproteína es considerada como la responsable de la entrada del virus a la célula mediante la fusión de la envoltura viral con la membrana celular, y la diseminación directa del virus por fusión de membranas entre células infectadas y no infectadas produciendo sincicios en cultivo celular.

Las glicoproteínas F y G son las que inducen principalmente la formación de anticuerpos a los que se ha asignado actividad neutralizante *in vitro* y son sensibles a los detergentes y a la tripsina por lo que se deduce que están localizadas en la superficie del virión (6,8).

Las proteínas asociadas a la nucleocápside N, P y L tienen funciones de transcripción y replicación del ARN viral, a la proteína L se le asigna el papel de ARN polimerasa dependiente

de ARN, mientras que a las proteínas N y P se les considera factores solubles necesarios para la replicación (Chaperonas) (6,9).

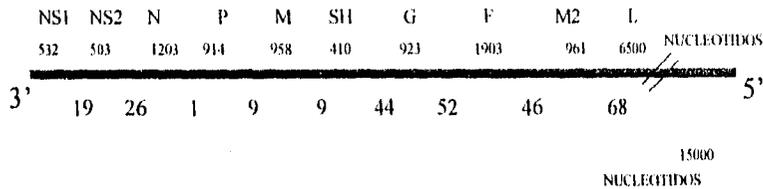
La secuencia genética del VSR en orden 3' a 5' es:

3' NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L 5' que es el mismo orden de transcripción. Según se ha comprobado con experimentos de inhibición de la transcripción con luz U.V. y la homología que presenta el genoma viral con los mensajeros mono y policistronicos .(7)

El VSR al igual que otros paramixovirus contiene secuencias de inicio y término conservadas para la mayoría de los genes que las conforman, pero sus regiones intergénicas varían tanto en tamaño como en secuencia . Estas regiones intergenicas varían en longitud desde uno a 54 nucleótidos ( ver figura 1).

El mecanismo de replicación es similar al de otros paramixovirus (10), donde el ARN de sentido negativo debe ser transcrito a un intermediario positivo (ARN antigenómico) que sirve como molde para la síntesis de la progenie del virión; requiere para su síntesis de las proteínas N, P y L, las cuales bloquean las señales de paro intergénicas, no siendo reconocidas estas, por la ARN polimerasa (9).

### A) MAPA GENETICO DEL VSR



### B)

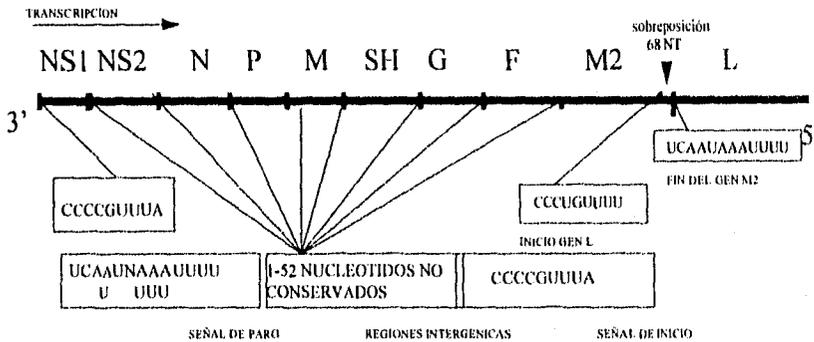


FIGURA 1: El mapa genético del VSR donde se muestra: A) el orden de los genes, su longitud en nucleótidos y las regiones intergenicas entre cada gen. B) señales de inicio y término de los genes (modificado de Kennet y McIntosh ) (6).

### INMUNIDAD

El VSR es altamente inmunogénico y produce una variedad de anticuerpos, sin embargo, las vacunas obtenidas en forma tradicional (atenuadas e inactivadas ) no han resultado efectivas.

En los años sesentas se realizaron campañas masivas de vacunación sin buenos resultados ya que al reinfectarse los niños que habían sido vacunados presentaron los cuadros más graves (12,14).

Respecto a la inmunidad humoral, los reportes indican que la protección que ofrecen los anticuerpos maternos es parcial. En la infección de niños menores de tres semanas de edad, con títulos elevados de anticuerpos maternos los síntomas se confinan al tracto respiratorio alto, se producen pocos virus y la infección desaparece pronto. Sin embargo, estos anticuerpos no evitan la infección; 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 estos subtipos responden pobremente durante la infancia por lo tanto se necesitan varias exposiciones para inducir una buena respuesta (15, 16).

Observaciones en modelos animales, sugieren que los anticuerpos contra la proteína de fusión son el mecanismo más importante para limitar la infección. Sin embargo, hay autores que hacen hincapié en la importancia del anticuerpo local, ya que se han detectado por inmunofluorescencia IgG e IgA específicos en secreciones nasales y se ha observado una síntesis acelerada de las mismas después de la reinfección (17, 18).

Con respecto a la inmunidad celular parece ser muy importante para limitar la infección ya que la producción viral es prolongada en individuos con deficiencias en inmunidad celular, sin embargo estos individuos no presentan cuadros clínicos más graves, y no hay reportes acerca de que la inmunidad celular evite la infección (6).

## VARIACIÓN ANTIGENICA.

El virus sincitial respiratorio se aisló en 1967, inicialmente las cepas aisladas mostraron homogeneidad antigénica. Sin embargo, al utilizar sueros hiperinmunes y anticuerpos monoclonales se observaron diferencias antigénicas en las cepas circulantes (6, 12 ).

Los virus se han clasificado en dos grupos, designados A y B, con base a la reacción con anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas estructurales. Los grupos no son homogéneos, virus clasificados en un mismo grupo difieren entre sí genéticamente (12).

Cuando cepas prototipo del grupo A (A2) y del grupo B (CH18537) son comparadas, la proteína G muestra sólo 53% de identidad de aminoácidos, mientras que la homología para otras proteínas es mucho mayor (SH, 76%; 1C, 87%; F, 89% y N, 96%). La comparación de cepas del mismo grupo, muestra una variación menor: 94% de identidad de aminoácidos para la proteína G, 97 a 98% de identidad para la proteína F y 98 a 99% para la fosfoproteína P (19).

Entre miembros de un mismo grupo se han observado diferencias genéticas por lo que se han definido genotipos o subtipos. Cane y Pringle (20) utilizaron tres criterios para el estudio de variabilidad: mapeo por restricción del gen N, secuencia del gen SH y secuencia y mapeo por restricción de la proteína G. Con base a ellos encontraron para el grupo A, seis genotipos (o líneas), designados SHL1 a SHL6 y dos para el subgrupo B designados NP1 y NP3.

En cambio Sullender y colaboradores utilizando RT-PCR y RFLP de la región comprendida entre los genes F y G y la región intergénica que las separa; han reportado 7 genotipos para el grupo A y tres para el grupo B después de hacer un estudio de 34 cepas aisladas entre 1959 y 1989 (21).

## ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Las enfermedades infecciosas y parasitarias son un problema serio de salud a nivel mundial, durante 1990 se estima que ocurrieron 50 millones de muertes en el mundo, y que más de 16 millones de ellas fueron por enfermedades infecciosas o parasitarias. Una tercera parte de las defunciones fueron en menores de cinco años, la mayor parte (93%) ocurrieron en países en vías de desarrollo. De las defunciones ocurridas en menores de cinco años en 1990, (33%) 4.3 millones, se debieron a infecciones respiratorias agudas (IRAs), principalmente neumonía (22).

En México, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud (1987-1988) se estima que aproximadamente ocurrieron 280 millones de IRAs al año, de las cuales la incidencia en niños menores de un año es cinco episodios de IRA, en niños de 1 a 4 años es de 7 episodios, mientras que en los niños de 5 a 14 años es de cuatro, en individuos de 15 a 64 se presentan tres episodios al año y los mayores de 65 años presentan más de dos (5).

Para 1992 las IRAs representaron en México la segunda causa de defunciones en menores de un año, (tasa de 374 por cien mil nacidos vivos registrados), la tercera causa en niños de 1 a 4 años (una tasa 17 por cien mil habitantes) y la quinta causa en mayores de 65 años (tasa de 218 por cien mil habitantes).

Del total de muertes por IRA en 1992, 47%, (9,597) ocurrieron en menores de cinco años, 40% (8,127) en menores de un año entre 1989 y 1992, muestra que la proporción correspondiente a defunciones por neumonía e influenza permaneció estable (1989 13.9%, 1992: 13.3%) (22, 23).

En EUA se estiman 91 000 hospitalizaciones y 4500 muertes anuales debidas al VSR (13).

El impacto de la variación antigénica en la epidemiología de VSR no está claro. Los infantes que padecen una infección primaria con VSR desarrollan una respuesta de anticuerpos séricos neutralizantes relativamente amplia. El dimorfismo antigénico probablemente contribuye a la alta incidencia de reinfecciones durante la niñez, pero este efecto parece ser modesto; a este respecto cabe añadir que muchas reinfecciones involucran virus del mismo grupo, aún en la infancia (6).

#### **CARACTERISTICAS CLÍNICAS**

La primoinfección con VSR ocurre generalmente entre las seis semanas y los seis meses de edad, esta causa comúnmente síntomas del tracto respiratorio superior como son flujo nasal, estornudo, faringitis y malestar general.

Si el cuadro es leve los síntomas no rebasan esta etapa. En los casos severos el VSR puede causar bronquitis y neumonía (6).

El periodo de incubación es de 4 a 5 días para VSR. El virus se multiplica en la nasofaringe y por aspiración de secreciones se disemina a vías inferiores.

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

La edad de más alta incidencia de bronquitis, es también el tiempo durante el cual los anticuerpos maternos anti-VSR persisten en el infante, sugiriendo que estos anticuerpos pueden

contribuir al proceso de la enfermedad. Algunos estudios han demostrado también que altos títulos de anticuerpos maternos neutralizantes algunas veces protegen contra cuadros serios.(23)

Actualmente no se ha podido dar una explicación satisfactoria de la patogenia, sin embargo, se han propuesto varias hipótesis.

Uno de los mecanismos que se ha propuesto para explicar el hecho de que los niños que presentan títulos de anticuerpos maternos por debajo del título neutralizante presentan un cuadro más grave es el aumento de la infección mediado por anticuerpos (AME). Los anticuerpos unidos a la partícula viral favorecen su entrada a células con receptores para la fracción cristalizante (Fc) de las inmunoglobulinas, aumentando de esta forma el número de células infectadas (24, 25, 26).

El AME puede contribuir a la enfermedad por mecanismos diferentes a los de la infección lítica de células. Una posibilidad es que el virus o el complejo virus y anticuerpo, cuando interactúan con la célula huésped, estimulen la liberación de mediadores de la inflamación o citocinas que pueden contribuir al proceso de la enfermedad (27, 28, 29).

Welliver (30) sugiere que anticuerpos IgE específicos presentes en pacientes con bronquiolitis causada por VSR podrían estar provocando la patogenia de la enfermedad a través de reacciones de hipersensibilidad.

Faden y colaboradores (31) encontraron que los complejos inmunes con VSR estimulan a los neutrófilos a producir tromboxanos, causantes de la contracción del músculo liso de vías respiratorias.

También se ha encontrado que la concentración de leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) en secreciones respiratorias está asociado a bronquiolitis con VSR (32). Los leucotrienos son productos

metabólicos del ácido araquidónico y son potentes mediadores de respuestas alérgicas e inflamatorias y pueden causar constricción de las pequeñas vías aéreas del pulmón produciendo cuadros asmáticos y asfíxia. Complejos inmunes insolubles de IgE y agregados de IgG han mostrado estimular la producción de LTC<sub>4</sub> en macrófagos, eosinófilos y basófilos (33).

Estos factores podrían explicar la severidad de las infecciones por RSV, en las bronquiolitis y neumonías en infantes, donde las vías aéreas del pulmón se encuentran aún en estado de desarrollo lo que les confiere vulnerabilidad (32, 33).

#### **DIAGNOSTICO**

El desarrollo de agentes antivirales efectivos en el tratamiento de las infecciones vírales ha impulsado el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido, en particular del RSV, ya que el tratamiento con ribavirina ha sido útil sólo si se aplica durante los primeros 4 días de la infección (32, 33).

Puesto que el cuadro clínico que produce el virus sincitial respiratorio es indistinguible del de infecciones del tracto respiratorio inferior con distintas etiologías, bacterianas o vírales, es importante disponer de técnicas de diagnóstico rápidas y sensibles (2, 36).

Tradicionalmente el diagnóstico de las infecciones con VSR se ha centrado en la técnica de cultivo, aislando el virus de secreciones nasofaríngeas. Sin embargo, los métodos de cultivo celular son generalmente lentos. Puede llevar hasta una semana el tener el resultado listo, y la sensibilidad puede ser afectada por la labilidad del virus y la susceptibilidad de la línea celular utilizada. (2, 6)

El desarrollo de técnicas inmunoquímicas para la detección directa del virus, tales como la inmunofluorescencia indirecta y los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) han tenido gran auge debido a que el virus representa un serio problema en pabellones infantiles y en áreas de cuidado intensivo.

Estos métodos son mucho más rápidos que los cultivos celulares, dan resultados el mismo día, pero su sensibilidad y especificidad se reporta como variables (37, 38, 39, 40).

Una alternativa que acelera el diagnóstico para VSR involucra métodos de centrifugación en una placa para facilitar la unión de células infectadas y virus a monocapas, y detectando después por métodos inmunoquímicos antígenos virales. Estos métodos toman de 48 a 96 horas en su realización y tienen aproximadamente el 94% de sensibilidad y 97.3% de especificidad comparados con el aislamiento del agente (41).

En la actualidad, se han desarrollado métodos rápidos basados en la transcripción reversa (RT) y en la amplificación de las secuencias del ácido nucleico del virus por la reacción de la polimerización en cadena (PCR) (42, 43, 44), técnicas que son realizables en un máximo de seis horas.

Paton y cols. están una sensibilidad de 94.6% y una especificidad mayor al 97% para ensayos de RT-PCR cuando se compara con técnicas inmunoenzimáticas y cultivo celular (45).

**OBJETIVOS:**

a) Establecer las técnicas de transcripción reversa (RT), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) para el Virus Sincitial Respiratorio (VSR).

b) Diferenciar las cepas A y B por el tamaño en los fragmentos obtenidos de PCR.

c) Comparar los patrones de restricción teóricos con los obtenidos experimentalmente.

**HIPOTESIS:**

Por medio de las técnicas de PCR y RFLP es posible estudiar la variabilidad genética de las cepas del Virus Sincitial Respiratorio.

## FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS DE RT-PCR

La reacción de polimerización en cadena (PCR) es un método *in vitro* para la síntesis y amplificación enzimática de secuencias definidas de ADN. La reacción utiliza dos oligonucleótidos (Iniciadores) que hibridan con las cadenas opuestas y flanquean la secuencia diana de ADN que va a ser amplificada. La elongación de los iniciadores es catalizada por la *Taq* DNA polimerasa, una ADN polimerasa termoestable (46) que fue aislada originalmente de la cubacteria *Thermus aquaticus*. Los fragmentos son definidos por los extremos 5' de los iniciadores. Debido a que los productos de extensión del iniciador en un ciclo sirven de templado al ciclo siguiente, el número de copias de ADN diana es teóricamente duplicado en cada ciclo; de esta manera, 20 ciclos de PCR generan alrededor de un millón de copias de la secuencia de ADN elegida. Una amplificación de tal magnitud facilita procedimientos posteriores como secuenciación directa de los fragmentos amplificados, clonación de genes, obtención de sondas etc (43).

El ARN no puede ser templado para la PCR, la transcripción reversa ha permitido la síntesis de ARN complementario (ADNc) adecuado para la amplificación enzimática.

La adaptación de la metodología de transcripción reversa (RT del inglés "reverse transcription" ) a la PCR para la investigación de secuencias de ARN provee de una herramienta que ofrece rapidez, eficacia, especificidad y sensibilidad.

La combinación de ambas técnicas es comúnmente llamada RT-PCR. Las transcriptasas reversas que existen comercialmente son: la que se purificó del Virus de mieloblastoma aviar (AMV) y la que se clonó en *E. coli* del virus de leucemia murina Moloney; ambas enzimas tienen

actividad de ADN polimerasa 5' → 3' usando como molde una molécula de ARN o de ADN de una sola cadena y han perdido su actividad de ADN exonucleasa 3' → 5' cada enzima presenta su mayor actividad a pH y temperatura determinado. La transcripción reversa se ha usado ampliamente para obtener ADNc de ARNm y poderlo insertar en vectores procarióticos sin embargo esta técnica puede usarse también para obtener sondas de diferentes moléculas de ARN o ADN (47).

### ESTRATEGIA DE TRABAJO

Dentro de los objetivos de este trabajo se planteó el establecimiento de las técnicas de RT-PCR y RFLP para las cepas Long y B8/60 del VSR que se usan como referencia. Sullender (21) reportó una técnica que nos permiten distinguir entre las cepas de grupos diferentes y si hay diferencias en la secuencia de cepas de un mismo grupo, se amplifica la región comprendida entre las proteínas F y G. Estas glicoproteínas son las de superficie de ellas se ha observado que la proteína G es la más variable entre las cepas de diferentes grupos (44) con sólo el 53% de identidad en secuencias de aminoácidos.

Se utilizaron los oligonucleótidos: 3' F164, complementario a las bases 164 a 186 del mRNA de la proteína F de: CH 18537 (virus del grupo B), A2 y Long (virus del grupo A) (43,48). Este iniciador nos permitirá obtener el ADNc del intermediario replicativo del genoma del VSR, de sentido positivo, o de los policistronicos. Los oligonucleótidos 5' G32 que corresponde a las bases 10 a 30 del mRNA de la proteína G B 8/60 y el 5' G267 que corresponde a las bases 247 a 267 del

mRNA de la proteína G del virus A2 y de long (43, 49, 50); que son grupo específicos y se unen en diferentes sitios de la proteína G del ADNc (51).

De la proteína G para el grupo A se abarcan las regiones que codifican para los ectodominios que incluyen las regiones variables descritas por Cane (51). Para el grupo B se incluyen las regiones que codifican para la región citoplasmática, el dominio transmembranal y el ectodominios enteros adicionalmente la región intergénica de aproximadamente 52 nucleótidos y parte del gen F (186 nucleótidos) (52).

La amplificación de esta región nos permitirá por el tamaño de los fragmentos a amplificar diferenciar cepas virales. Para el grupo A se amplificará un segmento de 0.9Kb y para el grupo B de 1.1 Kb.

La digestión restrictiva de los productos de amplificación hace posible valorar la variabilidad genética entre las cepas virales en estudio, esta técnica ofrece ventajas sobre la secuenciación directa de los fragmentos que puede ser más laboriosa y costosa, además evita el uso de material radioactivo. Las enzimas: *Ahi I*, *Hind II*, *Rsa I*, *Pst I* se eligieron con base al análisis de las secuencias reportadas para las cepas A2 y CH 18537, se tomó en cuenta que tuvieran pocos puntos de corte, lo que nos permitira resolver los fragmentos obtenidos en geles de agarosa y que estuvieran disponibles comercialmente.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### MATERIAL DESECHABLE

Botellas de cultivo marca COSTAR 75 cm (3275)

Placas de cultivo celular de 24 pozos COSTAR (3594)

Placas de cultivo celular de 96 pozos COSTAR (3594)

Tubos Eppendorf presiliconizados 1.5, 0.6 ml COSTAR (3208,3210)

Raspadores (gendarmes) COSTAR (3008), (3010)

Puntas para micropipeta con filtro y probadas contra RNAsas y DNAsas GIBCO 200-1000  $\mu$ l (14868-012) y de 20-200  $\mu$ l (14867-014)

### REACTIVOS QUÍMICOS:

Agarosa certificada para biología molecular BIO-RAD

Alcohol isoamílico SIGMA 1-9392

Azul de bromofenol. BIO RAD Cat. 161-0404

Antibióticos.

Estreptomicina SIGMA Chemical Co. Cat S-6501

Penicilina SIGMA Chemical Co. cat PEN-NA

Bromuro de etidio BIO-RAD 161-0430

Carbonato de sodio J. T. Baker Cat 790

Citrato de sodio J.T. Baker Cat 3646

Cloruro de potasio Merck Cat. 6404 y # L 10657ON

Cloruro de sodio Merck cat 6404 y # L 206160r

Diethyl pirocarbonato SIGMA D5758

EDTA (etilén diaminoacetato de sodio dibásico) J. T. Baker 8993

EDTA 99.9 % de pureza SIGMA Co 808370

Fenol GIBCO Cat. L 1 5509011 100g

Ficoll SIGMA F4375

Fosfato monobásico de potasio J.T. Baker Cat 790  
Fosfato dibásico de sodio anhidro ANALIT Quimico Dinamia.  
Glicógeno Baehringer Mannheim 1901-393  
Isotiocianato de guanidina GIBCO 15535-016  
Estuche Gene Amp. RNA PCR (PERKIN ELMER N808-0017)  
N-Lauril sarcosilato de sodio. SIGMA L-5125  
D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) GIBCO BRL  
2 Mercapto etanol BIO RAD 21277  
2-Propanol MERK 215882  
Tripsina de páncreas bovino SIGMA Chemical Co. 1989  
Trizma SIGMA T-7149

#### **REACTIVOS BIOLÓGICOS**

Inhibidor de RNAsa 20 000 U Boehringer Mannheim Cat. 799,017  
Transcriptasa reversa. Monoloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLTV RT)  
GIBCO BRL  
Taq polimerasa donada por el Dr. Rogelio Alonso jefe del laboratorio de Genética Molecular de  
la Facultad de Medicina de la UNAM.(AMPLIFICASA, BOTECSA-MÉXICO)  
dATP Trifosfato de desoxiadenosina GIBCO BLR Cat. 8252SA  
dCTP Trifosfato desoxicitidina GIBCO BLR Cat. 18253-013  
dGTP Trifosfato desoxiguanosina GIBCO BLR Cat. 18254-011  
dTTP Trifosfato desoxi timidina GIBCO BLR Cat. 28025-013  
Mareadores de peso molecular  $\phi$ X174 RF DNA/ Hae III GIBCCO Cat 5611SA  
 $\lambda$  y PBR 322-Msp Y Donadas por el Dr. Rogelio Alonso Morales  
Iniciadores: F164 5' CCAACCATATGGTCACAGTATTG 3'  
G267 5' GAACTAGACCGAACAACGTGA 3'  
G32 5' GAACACAAACCTGTACCAACG 3'  
Sintetizados en el Instituto de Biología Celular de la UNAM.



## MÉTODOS:

### PROPAGACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES:

Las células HEp 2 y VERO se mantuvieron con D-MEM complementado con suero fetal bovino al 10% inactivado a 56° C por 20 minutos y 100 UI/ml de penicilina G sódica, 100 µg de estreptomina y 1% de glutamina. Se subcultivaron 2 veces por semana.

### PROPAGACIÓN DEL VIRUS:

Monocapas de células HEp-2 semiconfluentes se infectaron con el virus sincitial respiratorio de las diferentes cepas, a una multiplicidad de 0.2 en D-MEM suplementado con 1% de suero fetal se dejaron absorber por una hora a 37°C posteriormente se retiraron los sobrenadantes y se adicionó medio fresco, se incubaron por 48 hs más o hasta que el efecto citopático fuera evidente (en ocasiones hasta ocho días) se rasparon las células y se sonicaron 10 minutos, posteriormente se tituló el virus obtenido (53).

### TITULACIÓN DEL VIRUS:

El virus se tituló por dosis infectiva 50 (TCID<sub>50</sub>)

Para ello se sembraron en una placa de 96 pozos células HEp 2, se incubaron a 35° y 5% de CO<sub>2</sub>, y una vez que estuvieron confluentes se infectaron con las diluciones seriadas (1:4), en D-MEM al 1% de suero fetal, de la suspensión de virus que se desea titular, Se utilizaron cuatro pozos por dilución.

El título se calculó por el método de Kärber:

$$TCID_{50} = -\Delta -\delta(S-1/2)$$

Donde:

$A$ : es el log 10 de la última dilución donde el 100% de los pozos presentaron efecto citopático

$\delta$ : es el log10 del factor de dilución

$S$ : es la suma de los pozos que presentaron efecto citopático por dilución incluyendo aquella donde el porcentaje es 100%, dando a ésta última el valor de uno y las otras la fracción correspondiente ( $1/4=0.25$ ) (53).

**EXTRACCIÓN DE ARN CELULAR TOTAL** de acuerdo al método de Chomezynski y Sacchi con modificaciones (54).

- 1.- Se rasparon las células de una botella de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con efecto citopático claro (48 a 72 hs) y se lavaron con PBS tres veces .
- 2.- A las células obtenidas se les agregaron 250  $\mu$ l de solución D (4M Isotiocianato de Guanidinio, 0.5% N-laurilsarcosil sódico, 2 mM Citrato de sodio pH 7.0. Se adiciona 1 mM de 2-mercaptoetanol en el momento de su uso).
- 3.- Se agregaron 500  $\mu$ l de fenol saturado en agua, 50  $\mu$ l de acetato de sodio 2 M (pH 4) y 100  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isoamílico 25:1. Se agitó durante diez segundos, posteriormente se centrifugó entre 10 y 15 minutos en centrífuga Eppendorf 15 000 rpm a temperatura ambiente.
- 4.-Se obtuvo el sobrenadante y se adicionó 1  $\mu$ l de glucógeno (10  $\mu$ g) y 500  $\mu$ l de isopropanol frío. Se enfría durante 1 hr. a -20 °C
- 4.-Se centrifugó a 15 000 rpm durante diez minutos en centrífuga Eppendorf.

5.-Se lavó la pastilla con 200  $\mu$ l de etanol al 75% y se disgregó el precipitado con ayuda de la micropipeta.

6.-Se centrifugó 10 minutos en Eppendorf a 15 000 rpm.

7.- Se obtuvo el precipitado y se secó al vacío .

8.-La pastilla se resuspendió en 20 $\mu$ l de agua tratada con dietil pirocarbonato (agua-DPC para eliminar las posibles ARNsas ). Guardar a -20°C.

#### **DIGESTION CON NUCLEASAS ADNASA Y ARNASES**

En tubos Eppendorf de 0.65ml se adicionó el amortiguador de reacción 3 $\mu$ l (0.1M acetato de sodio pH 5.0 5mM; MgCl<sub>2</sub>; 50 $\mu$ g/g ADN de fimo de ternera), 3 $\mu$ l de ARN o ADN del fago lambda, y agua tratada con dietil pirocarbonato ebp 30  $\mu$ l, se incubó a 37°C por 30 min. Se adicionó 40 U de inhibidor de RNAsas.

#### **SINTESIS DE ADNC.**

En un tubo Eppendorf de 0.65ml se colocaron: 4 $\mu$ l amortiguador de reacción ( 50mM tris HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 10 mM de DTT, 3mM MgCl<sub>2</sub> ), 2mM de cada forfato de desoxiribonucleótido, 30 pM del iniciador F<sub>164</sub>, 3  $\mu$ l de RNA de células infectadas con VSR, 20 U de inhibidor de ARNsas y se agregaron 200 U de la enzima transcriptasa reversa. El volumen de reacción se completó a 20  $\mu$ l, y se incubó a 37° por una hora.

#### **AMPLIFICACIÓN**

Al tubo de la reacción anterior se le agregó el amortiguador de amplificación (50mM de KCl, 10mM de tris HCl, 1.5 Mg Cl<sub>2</sub>), 60pM de cada iniciador, (F<sub>164</sub> y G<sub>32 o 267</sub>) 2.5U de *Taq* ADN polimerasa, y se agregó agua dietil pirocarbonatada para un volumen final de 100 $\mu$ l. Se

calentó a 99°C por un minuto para eliminar la transcriptasa remanente y que puede actuar como inhibidor de la polimerasa. La amplificación se llevó a cabo en 30 ciclos: una temperatura de desnaturalización del ADN de 94°C por un minuto, una temperatura de unión de los iniciadores de 60°C por un minuto y una temperatura de extensión de 72°C por un minuto.

Una vez que se llevaron a cabo los 30 ciclos, se dejó un periodo de extensión de 7 minutos a 72°C y posteriormente se mantuvieron a 4°.

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio se utilizó como marcador de peso molecular ADN del fago  $\phi$  174 digerido con la enzima *Hae III*.

#### **DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.**

Los productos de PCR se pasaron por una columna de Sephadex G 50 para eliminar las sales que contenían, y productos secundarios que pudieran estar presentes. Se colocan 20  $\mu$ l de este material en tubos Eppendorf y se agregó el amortiguador específico de cada enzima 5 U de cada enzima 1mM de espermidina y se ajustó el volumen de reacción a 50  $\mu$ l y se incubó a 37 °C por 3 horas. Los fragmentos obtenidos se observaron en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio y su tamaño se evaluó por comparación con el marcador de peso molecular PBR 322-*Msp I*.

## **RESULTADOS**

### **PROPAGACIÓN DE LAS CEPAS VIRALES.**

Las cepas virales Long y B8/60 se propagaron en células HEp2 y VERO. Después de los primeros intentos de extracción de ARN se decidió trabajar con células VERO porque se observó que son susceptibles a la infección por el virus, se propagan mas rápido y permanecen vivas por más tiempo despues de la infección y esto facilitó la extracción de ARN obteniéndose mejor rendimiento. Para los experimentos de síntesis de ADNc y PCR, se infectaron las células a multiplicidades de infección (MOI) bajas 0.2 a 0.4 y se incubaron durante tiempos que variaron de 24 a 96 horas, hasta que el efecto citopático fuera evidente, (la formación de sincicios grandes ).

### **OBTENCIÓN DE ARN CELULAR TOTAL**

a) La naturaleza del extracto obtenido de células infectadas se analizó, confirmandose que se trataba de ARN. Para ello se expuso una alcuota de la muestra a digestión con ADNasa y ARNasa. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2; el material obtenido se degradó totalmente con ARNasa (carril 4), pero no fue susceptible a la acción de la ADNasa (carril 3). En cambio el control de ADN si fue susceptible a la acción de la ADNasa lo que comprueba que la muestra efectivamente es ARN.

## CONTROL DE EXTRACCIÓN DE ARN OBTENIDO DE CELULAS INFECTADAS

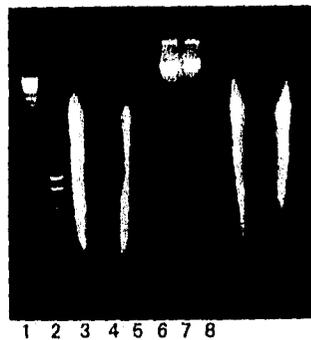


FIGURA 2: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. El ARN extraído de células Vero infectadas con VSR se sometió a tratamiento con nucleasas. Se usó como control ADN del fago lambda. Carril 1, Marcador de peso molecular ADN lambda-*Bst E II*; Carril 2, marcador de peso molecular pBR 322-*Msp I*; Carril 3, ARN + ADNasa; Carril 4, ARN + ARNasa; Carril 5, ARN; Carril 6, ADN + ADNasa; Carril 7, ADN + ARNasa; Carril 8, ADN.

b) Se analizó el tamaño de las diferentes bandas que se observaron en el gel provenientes de diferentes extracciones de ARN de células VERO sin infectar (carriles 1 a 3 de la figura 3), y células infectadas (carriles 3 a 6) en las que esperábamos observar una banda de 15 000 pares de bases correspondiente al genoma del virión. Sin embargo no se encontró diferencia entre ambas, esto indica que el ARN celular es más abundante que el viral.

### EXTRACTOS DE ARN OBTENIDOS DE CÉLULAS INFECTADAS

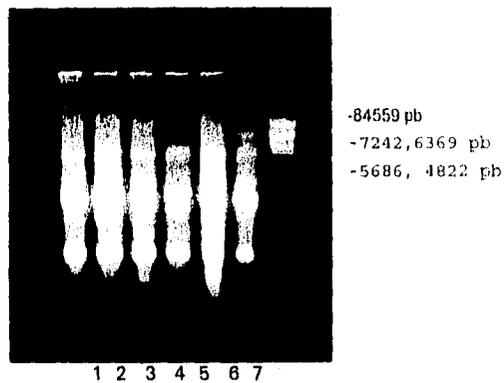


FIGURA 3: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Los carriles 1 a 3 corresponden a extractos de células VERO no infectadas. Los carriles 4 a 6 corresponden a extractos de células infectadas con VSR (1e6 células infectadas aun MOI de 0.23). El carril 7 corresponde al marcador de pesos moleculares ADN de lambda-*Bst E II*.

#### ANÁLISIS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS.

La concentración, el tamaño y la pureza de los oligonucleótidos se analizaron de la siguiente manera:

A) Se determinó la concentración por espectrofotometría; considerando que una D. O. equivale a 20 µg de ARN por ml (46), se encontró que la concentración reportada por el proveedor era mayor que la que nosotros encontramos experimentalmente. Las lecturas y las concentraciones se muestran en la tabla No 1.

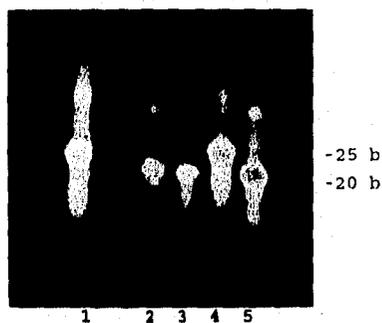
**TABLA No 1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS INICIADORES POR DENSIDAD ÓPTICA A 260nm**

NUCLEÓTIDO	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN ENCONTRADA	CONCENTRACION REPORTADA POR EL PROVEEDOR
F164	0.683	184 pmol/ml	499 pmol/ml
G32	0.462	192 pmol/ml	469 pmol/ml
G267	0.654	136.7 pmol/ml	295 pmol/ml

Considerando los resultados obtenidos la concentración fue ajustada a 20 pmol / $\mu$ l con agua dietil pirocarbonatada para los ensayos de transcripcion reversa y amplificación enzimática (RT-PCR).

La electroforesis en gel de poliacrilamida mostró que el tamaño de los iniciadores era el esperado: F164, 23 bases; G 267, 21 bases; G32, 21 bases sin productos de degradación, se observa una sola banda (figura 4).

**DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS**



**FIGURA 4 :** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 19% teñido con bromuro de etidio. Se usaron como marcadores dos oligonucleótidos de tamaño conocido: 1040 MMV (25 bases), RVS 235 (20 bases). 1) Oligo F164, 2) oligo G32, 3)oligo G267, 4)1040 MMV, 5) RVS 235.

#### **OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MAGNESIO.**

La obtención del ADNc se realizó utilizando inicialmente un estuche comercial (PERKIN ELMER), siguiendo las condiciones especificadas por el proveedor. Al cambiar el estuche por la enzima comercial TR (GIBCO) de menor costo también se siguieron las recomendaciones del proveedor pero, antes de agregar la enzima se llevaron a cabo dos periodos de incubación: uno de 5 minutos a 80°C para desnaturalizar el ARN sumergiendolo enseguida en hielo, y otro periodo de incubación de 10 minutos a 60°C para facilitar la unión del iniciador.

La concentración de magnesio puede afectar el apareamiento de los oligonucleótidos, las temperaturas de disociación de las cadenas tanto del templado como de los productos de PCR, y la especificidad, actividad y fidelidad de la enzima.

Se ensayaron cuatro diferentes concentraciones de  $MgCl_2$ , para las reacciones de las cepas Long y B 8/60: 1.0, 1.25, 1.5, 2.0; mM. Todos los demás reactivos se mantuvieron a una concentración constante e igual a las especificadas en Material y Métodos. La figura 5 muestra los resultados de este ensayo. Se observan bandas que corresponden al tamaño esperado para los productos, pero se aprecian también otras bandas de menor peso molecular que se supone son debidas a productos de la unión inespecifica de los iniciadores. A concentraciones menores de 1.5 mM (carriles 2 a 5 en la figura 5) la eficiencia de la reacción se abate y la cantidad de producto de la cepa Long disminuye. La reacción para la cepa B 8/60 muestra inespecificidad a concentraciones de 1.5 a 2 (carriles 7 y 9), aumentando la cantidad de producto en función del aumento de concentración de  $MgCl_2$ . Con base a los resultados obtenidos decidimos trabajar a una

concentración de 1.5 mM de  $MgCl_2$  y modificar otro factor crítico: la concentración de *Taq* ADN polimerasa.

#### ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DEL IÓN MAGNESIO EN LA ESPECIFICIDAD DE LA PCR

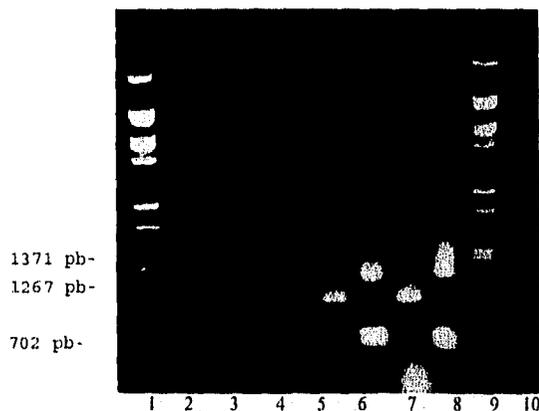


FIGURA 5 : Electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. Los carriles 1 y 10 corresponde al marcador de pesos moleculares DNA lambda-*Bst* *E*II. Los líneas enumeradas del 2 al 9 corresponden a ensayos en los cuales se han conjugado las variables cepa viral (Long o B 8/60) y concentración de magnesio ( $MgCl_2$ ). La concentración de *Taq* polimerasa permaneció constante en 5 U por 100  $\mu$ l de volumen de reacción. 2) Long, 1.0mM; 3)B8/60, 1.0mM; 4)Long, 1.25mM; 5) B8/60, 1.25mM; 6)Long, 1.5mM; 7)B8/60, 1.5mM; 8)Long, 2.0mM; 9)B8/80, 2.0mM.

#### CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE *Taq* POLIMERASA.

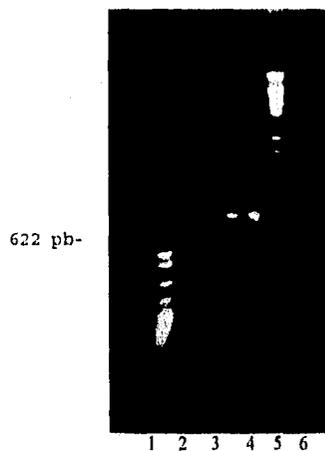
La concentración de *Taq* polimerasa que se recomienda probar está en un rango de 0.5 a 50 unidades por 100  $\mu$ l de reacción.

Si la concentración de enzima es muy alta, los productos de inespecificidad se acumulan, y si la concentración es muy baja, se obtiene baja concentración del ADN amplificado. La cantidad de enzima que se probó inicialmente fue de 5 U por reacción y posteriormente se disminuyó a la

mitad. La concentración de magnesio se mantuvo a 1.5 mM ya que como se mostró en el experimento anterior es la concentración óptima para la síntesis de ADN. La concentración de 2.5 U/100µl de *Taq* polimerasa resultó satisfactoria ya que desaparecen los productos inespecíficos de menor tamaño (carriles 4 y 5; figura 6)

Simultáneamente a la búsqueda de la concentración óptima de *Taq* DNA polimerasa, se trató de comprobar que las bandas de inespecificidad que se obtuvieron no eran debidas a reacción cruzada con ARN celular. Para descartar esta posibilidad se extrajo ARN de células no infectadas y los resultados se muestran en la figura 6, (carriles 2 y 3) en los cuales no hay amplificación, a 1.5 mM de cloruro de magnesio y 2.5 U/100 µl de *Taq* polimerasa.

#### ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DE LA CEPA LONG



**FIGURA 6 :** Electroforesis en gel de agarosa al 0.9% . Se sometieron a RT-PCR extractos de ARN de células Vero sin infectar (carriles 2 y 3) y Células Infectadas con VSR cepa Long, a concentraciones de 1.5mM de Cloruro de magnesio y 2.5 U de *Taq* polimerasa por 100µl de reacción. Los pesos moleculares son: carril 1, pBR 322-*Msp* I; carril 6, ADN lambda *Bst* E II.

#### DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO POSTINFECCIÓN PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de PCR se procedió a determinar el tiempo adecuado para la recolección de las células infectadas con el virus. El tiempo postinfección fue un parámetro crítico para el éxito del ensayo. El efecto citopático mostró no ser un indicador suficiente. Se observó que células infectadas a tiempos mayores de 96 h post infección (pi) a pesar de mostrar efecto citopático evidente no dieron resultados positivos en la amplificación. El tiempo óptimo postinfección que se determinó para la cepa B 8/60, utilizando dos marcas comerciales de transcriptasa reversa, fué de 72 h. (carril 7, figura 7). A menor tiempo (48h) la cantidad de producto es menor (carriles 2 y 6, figura 7) y 96 h se observa inespecificidad y disminución del producto (carriles 4 y 8 figura 7). Los resultados obtenidos son iguales para ambas transcriptasas (GIBCO y PERKIN ELMER).

#### DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO POSTINFECCION (pi) PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN.



FIGURA. 7: La cepa B 8/60 fué propagada en células Vero. Los extractos fueron sometidos a RT-PCR usando dos transcriptasas: A (Gene Amp Kit, Cetus Perkin Elmer) y B (GIBCO/BRL, Life Technologies Inc). Los productos de amplificación obtenidos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las designaciones de los ADN amplificados son las siguientes: 2) 48 h pi; 3) 72 h pi; 4) 96 h pi; 5) control de experimentación (300 paras de bases); 6) 48 h pi; 7) 72 h pi; 8) 96 h pi. Las líneas 1 y 9 corresponden a ADN  $\lambda$ -*Bst EII*.

El estuche comercial (PERKIN ELMER) además de las enzimas para RT-PCR contiene ARN transcrito de pAW109 y los cebadores adecuados para usarlo como control positivo; se muestra en la figura 7 en el carril 5. el tamaño de la secuencia amplificada es de 300 pb.

#### DISCRIMINACIÓN POR PESO MOLECULAR DE LOS SUBGRUPOS DE VSR POR PCR-SUBGRUPO ESPECÍFICA PARA LAS CEPAS LONG Y B 8/60

Por el tamaño de los productos de PCR en electroforesis en gel de agarosa, se puede distinguir entre las cepas de referencia de los dos subgrupos virales. La figura 8 muestra los ensayos hechos para las cepas Long (carriles 2 y 3) y B 8/60 (carriles 5 y 8). El tamaño de los fragmentos amplificado es de 900 pb y 1102 pb respectivamente.

#### DISCRIMINACIÓN DE LOS SUBGRUPOS DE RSV POR PCR- SUBGRUPO ESPECIFICA PARA LAS CEPAS LONG Y B8/60.

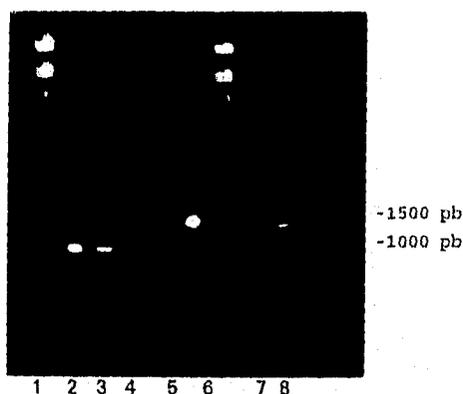


FIGURA 8: Electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. El marcador de pesos moleculares utilizado en los carriles 1 y 6 corresponden a ADN lambda- *Bst* *E*II. Los ensayos realizados con ARN extraído de células VERO infectadas con la cepa Long fueron colocadas en los carriles 2, 3 y 4. En los carriles 5 y 8 se resolvieron los ensayos realizados con ARN extraído de células infectadas con la cepa B 8/60.

#### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Antes de establecer los patrones de restricción del material obtenido por PCR se confirmó que las enzimas estuvieran activas para ello se utilizó ADN del bacteriofago lambda como sustrato, lo que además nos permitió establecer las condiciones de reacción. Siguiendo las indicaciones del proveedor (amortiguador para cada enzima, ADN e incubar por 3 hr a 37°) se obtuvo un corte incompleto, por lo que se decidió aumentar el tiempo de digestión a toda la noche y agregar espermidina a una concentración 1mM. Los resultados de la digestión con las enzimas *Alu I*, *Pst I*, *Hind II* y *Rsa I*, respectivamente se muestran en la figura 9

#### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN



FIGURA 9 : Electroforesis en gel de agarosa al 3%. El ADN del fago lambda fue utilizado como control para la confirmación del adecuado funcionamiento de las enzimas de *Alu I*, *Pst I*, *Hind II* y *Rsa I* (carriles 3, 4, 5 y 6 respectivamente). En el carril 2 se colocó el ADN sin tratamiento con enzima. Los marcadores de pesos moleculares  $\phi$ X 174 RF-*Hae III* y lambda-*Bst E II* se encuentran en las líneas 1 y 7 respectivamente.

**OBTENCIÓN Y COMPARACIÓN DE LOS PATRONES DE RESTRICCIÓN PARA LAS CEPAS LONG Y B 8/60.**

Los productos de PCR se intentaron reamplificar sin éxito por lo que fué necesario juntar el material amplificado de varios experimentos y estos se sometieron a digestión con enzimas de restricción en las mismas condiciones que el fago lambda y los resultados obtenidos son los siguientes.

TABLA No 2 FRAGMENTOS OBTENIDOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (Pares de Bases)		
ENZIMA	Long	B 8/60
<i>Alu I</i>	819	333, 874
<i>Pst I</i>	124, 293, 524	S.C*
<i>Hind II</i>	889	311, 854,
<i>Rsa I</i>	159, 276, 489	106, 1045

\* S.C: sin corte

(1) Los pesos moleculares de los fragmentos obtenidos se calcularon con el programa GWBASIC alimentado con los pesos moleculares del marcador y la distancia recorrida.. (Las fotografías de los fragmentos obtenidos se muestran en las figuras 9 y 10.)

De los resultados anteriores podemos observar que los cortes para las dos cepas son diferentes. En todos los casos, los fragmentos obtenidos con las enzimas de restricción son diferentes para la cepa Long y para la cepa B8/60, quizá el más notorio es para la enzima *Pst I*, ya que para la cepa A corta en dos partes observándose tres fragmentos de 124, 293 y 524 pares de bases mientras que en B8/60 no se observan cortes.

PATRON DE RESTRICCIÓN DE LA CEPA LONG

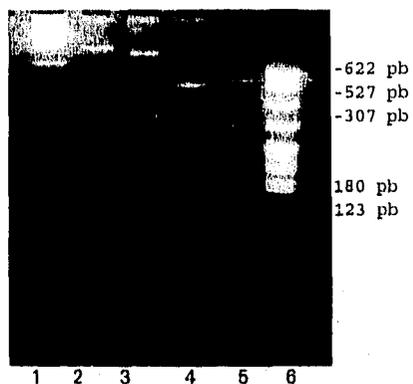


FIG 10: Análisis de los fragmentos de restricción del cDNA amplificado de la cepa Long. El producto de RT-PCR fue digerido con *Hind II* (carril 2), *Alu I* (carril 3), *Rsa I* (carril 4) , y *Pst I* (carril 5), y fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 3.0%. Los carriles 1 y 6 corresponden respectivamente a los marcadores de pesos moleculares de *Lambda-BstE II* y pBR 322-*Msp I*.

PATRÓN DE RESTRICCIÓN DE LA CEPA B 8/60

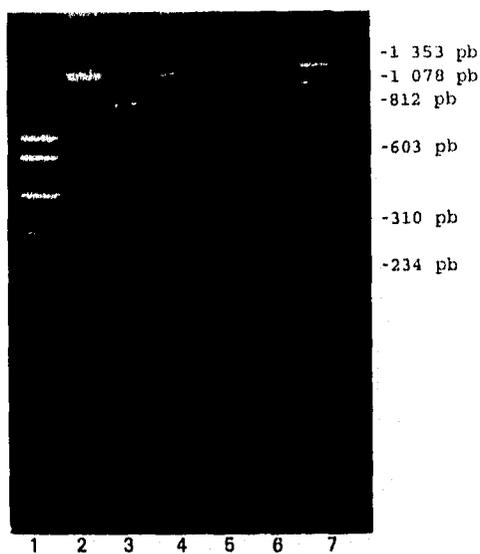


FIG 11: Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los fragmentos de restricción del ADN amplificado del virus B 8/60. El producto de PCR fue digerido con *Alu I* (carril 3), *Pst I* (carril 4), *Hind II* (carril 5), *Rsa I* (línea 6). El carril 2 corresponde al ADN sin digerir y los carriles 1 y 7 corresponden respectivamente, a los marcadores de pesos moleculares de pBR 322-*MspI* y  $\phi$ X174 RF-*Hae III*.

MAPA DE RESTRICCIÓN TEÓRICO DE LA CEPA  
CH 18537

(1158 pb)

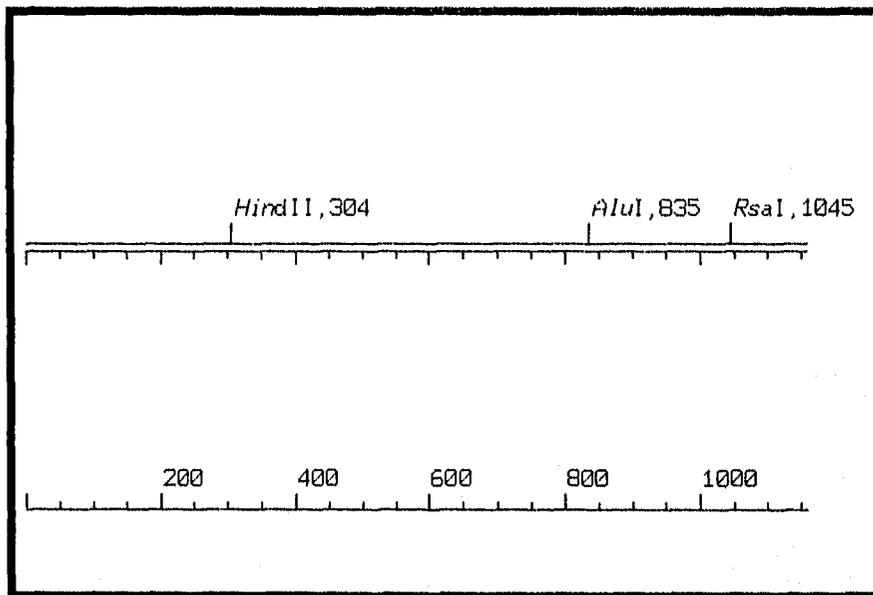


Figura 12: CORTE TEÓRICO CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN *Alu I*, *Pst I*, *Rsa I* Y *Hind II*, PARA EL PRODUCTO DE RT-PCR DE LA CEPA CH 18537.

MAPA DE RESTRICCIÓN TEÓRICO DE LA CEPA A2

(916 pb)

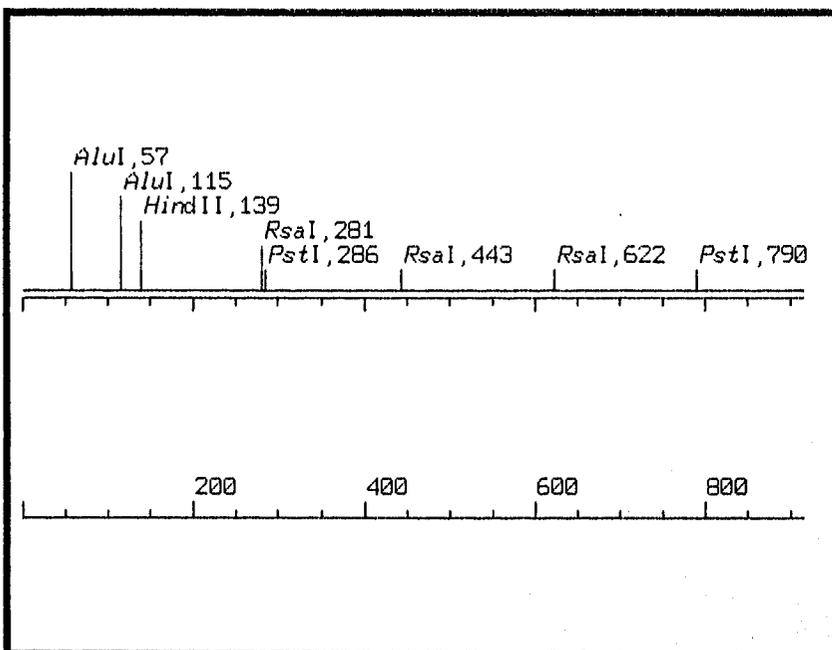


FIGURA 13: CORTE TEÓRICO CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN: *Alu I*, *Pst I*, *Rsa I* Y *Hind II*, PARA EL PRODUCTO DE RT-PCR DE LA CEPA A2

## DISCUSIÓN

La estrategia de este trabajo consistió en utilizar una técnica de transcripción reversa y amplificación que nos permitiera clasificar las cepas del grupo A o B del virus sincitial respiratorio en base al tamaño del fragmento amplificado.

La elección de los iniciadores permitió la amplificación de ARN de sentido positivo (ARN+) que se encuentra en las células infectadas con VSR y puede ser: el intermediario replicativo, necesario para la síntesis del genoma viral, o bien mensajeros dicistrónicos. Sin embargo estos últimos se han reportado en muy bajas cantidades (55) por lo que es probable que sea el intermediario replicativo el que sirvió de molde para la síntesis de ADNc. La síntesis de ADNc depende de la cantidad de ARN+ en la célula infectada, lo cual no está correlacionado con la presencia de efecto citopático, ya que de células que presentaban sincitios grandes después de 96 h no se obtuvo amplificación, esto hizo necesario realizar una cinética en la cual el tiempo óptimo post infección fue entre las 48 y las 72 horas. Esto nos sugirió que probablemente el intermediario replicativo se sintetiza antes de que se presente el efecto citopático o que en este momento tenemos mayor cantidad de un mensajero dicistrónico lo cual es poco probable como lo han demostrado intentos de clonación, en que los mensajeros dicistrónicos son muy raros (55)

Una vez determinado el tiempo al cual el ARN está en mayor cantidad, la obtención del ADNc se realizó de acuerdo al protocolo del proveedor, en un principio se utilizó el estuche comercial (Perkin Elmer) sin ninguna modificación obteniéndose buenos resultados; pero debido al costo y la mayor disponibilidad de la Transcriptasa reversa de GIBCO se decidió utilizar esta

aunque se requirieron incubaciones adicionales para obtener un mejor rendimiento en la transcripción.

La amplificación del ADNc presentó algunas dificultades por lo que se requirió optimizar la concentración de magnesio y *Taq* polimerasa. Como el fragmento que se eligió es largo hay muchos productos secundarios que fue necesario eliminar y así obtener ADN suficiente y homogéneo, es decir que no presentara barridos o bandas inespecíficas que pudieran interferir en la digestión con enzimas de restricción.

Una vez que el ADNc se amplificó se reintentaron reamplificaciones como lo reportan en la literatura: ya sea tomando alícuotas de la amplificación previa o tomando las bandas obtenidas del gel de agarosa, en estos intentos de reamplificación se obtuvieron barridos inespecíficos por lo que se decidió hacer más estricta la reacción de amplificación modificando las temperaturas de unión de los iniciadores, hasta donde lo permiten las temperaturas de fusión de los mismos, calculadas por el contenido de guanina-citocina y adenina-timina presentes en cada iniciador, y disminuyendo la concentración de iniciadores de 60 hasta 30 pM por reacción sin obtener éxito. Para los ensayos de digestión con las enzimas de restricción se requiere que el ADN esté libre de moléculas de bajo peso molecular, es decir se necesita una población homogénea de ADN del tamaño especificado para cada cepa. Puesto que los ensayos de reamplificación no dieron buenos resultados fue necesario juntar varias muestras de ADN obtenido por transcripción y amplificación de ARN de células infectadas.

Los fragmentos de amplificación para la cepa Long y B8/60 son de diferente tamaño por lo que la digestión con las enzimas de restricción también muestra diferencias, Una forma de

valorar si hay diferencias no sólo entre los grupos sino aún entre cepas de un mismo grupo fue comparándolas con los cortes teóricos hechos sobre las secuencias reportadas par A2 y CH18537. Los datos se muestran en la tabla No 3.

TABLA No 3 FRAGMENTOS OBTENIDOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (Pares de Bases)				
ENZIMA	Long	A2	B 8/60	CH 18537
	*(1) EXPERIMENTAL	*(2) TEÓRICO	EXPERIMENTAL	TEÓRICO
<i>Alu I</i>	819,	57, 58, 800	333, 874	322, 833,
<i>Pst I</i>	124, 293, 524	122, 299, 494,	S.C*	S.C.*
<i>Hind II</i>	889	140, 775	311, 854,	303, 852
<i>Rsa I</i>	159, 276, 489	162, 179, 281, 293	106, 1045	112, 1043

\* S.C: sin corte

\*11) Los pesos moleculares de los fragmentos obtenidos se calcularon con el programa GWBASIC alimentado con los pesos moleculares del marcador y la distancia recorrida.. (Las fotografías de los geles en los que se resolvieron los fragmentos obtenidos se muestran en las figuras 10 y 11.). Los pesos moleculares experimentales varían un poco de los esperados debido al ajuste que realiza el programa, estas pequeñas diferencias no pueden interpretarse como un cambio en la secuencia sino más bien como una falta de precisión al medir las distancias recorridas, además los fragmentos pequeños de menos de 100 pares de bases no se detectan en el gel.

\*12) Los cortes de restricción teóricos se obtuvieron con el programa S clone alimentado con las secuencias a amplificar obtenidas de una base de datos (Gene Bank).(Los mapas genéticos de las regiones a amplificar y los cortes teóricos se muestran en las figuras 12 a 13)

Analizando la digestión con endonucleasas de las secuencias teóricas con los resultados experimentales observamos que la variabilidad genética entre cepas de un mismo grupo es mínima. Entre B8/60 y CH 18537 se puede considerar que al menos con las enzimas que utilizamos no se logró distinguir entre ellas por lo que que ambas cepas son muy semejantes.

Para el grupo A notamos cambios: la enzima *Rsa I* corta dos veces en Long mientras que en A2 corta 3 veces, esto lo dedujimos por la presencia de un fragmento de 489 pb que no se encuentra en el teórico y puesto que la digestión fue exhaustiva (por lo menos 12 h) no puede ser la suma de dos fragmentos, esto nos indica un cambio en la secuencia de estas dos cepas.

Comparando los fragmentos de restricción predichos para A2 y de obtenidos experimentalmente para Long el corte que cambia es el que se encuentra en el nucleótido 622 de la región amplificada y que corresponde al nucleótido 868 de la proteína G que se encuentra cercano al extremo amino terminal de la proteína y que es uno de los dominios hidrofílicos de la misma. En las secuencias reportadas por Cane (51) para la proteína G observamos un cambio de T a C, lo que ocasiona que la enzima no corte porque su secuencia de reconocimiento es GTAC y en el caso de la cepa Long la timidina cambia a una citocina.

Perspectivas a futuro: Estas técnicas nos permiten valorar la variabilidad genética de virus aislados de pacientes con la finalidad de hacer estudios de epidemiología molecular. Sin embargo no pueden aplicarse para el diagnóstico directo del agente causal por la selección de los iniciadores se requiere en ARN de sentido positivo que sólo se encuentra en células infectadas. Una posibilidad para el diagnóstico es utilizar estas técnicas para amplificar mensajeros de los

genes que se encuentran hacia el extremo 3' que son los que se encuentran en mayor cantidad

(11) y además seleccionar fragmentos más pequeños que sean fáciles de amplificar.

## CONCLUSIONES :

La técnica de RT-PCR nos permitió diferenciar entre las cepas de los grupos A y B del virus sincitial respiratorio por el tamaño de los fragmentos amplificados: Para cepas del grupo A 0.9 Kb y 1.1 Kb para el B.

La técnica de RFLP nos permitió observar diferencias entre cepas de los distintos grupos así como entre cepas de un mismo grupo.

Los cortes con las enzimas de restricción para cepas del grupo B comparadas con los esperados son idénticos, sin embargo para el grupo A observamos un cambio en la secuencia de la cepa long digerido con la enzima *Rsa* I.

## REFERENCIAS:

- 1) Schaechter M, Medoff G., Eisenstein B.I. (1993). Mechanisms of Microbial Diseases; Williams y Wilkins, Eds. USA.
- 2) McIntosh K. Halonen P.(1993) Report of a Workshop on Respiratory viral Infections: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Clin. Inf. Dis.* 16:151-164.
- 3) Tristram and Welliver. (1993) Respiratory Syncytial virus vaccines, can we improve on Nature? *Pediatric Annals* 22:715-718
- 4) McIntosh K. and Masters H. (1978). The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants. I. *Infect. Dis.* 138(1):24-34
- 5) Boletín semanal de la dirección general de epidemiología, SSA 1979-1996
- 6) McIntosh K and Chanock R. M. (1990). Respiratory syncytial virus In: BN. Fields , DM. Knipe et al.,eds. *Virology*. Raven Press, New York. pp. 1045-1072,
- 7) Collis and Dickens (1986) Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc Natl Acad Sci Usa.* 85:4594-4598
- 8) Stott E. and Taylor G. (1985) Respiratory syncytial virus brief review *Archiv.Virolo.* 84 (1): 1-52
- 9) Collins D. L., and Wertz G.W.. (1983) cDNA cloning and transcriptional mapping of nine poly adenylated RNAs encoded by genome of human respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2208-3212.
- 10) Yu Q, Hardy R. W, and Wertz G.W.. (1985) Functional cDNA clones of the human respiratory syncytial virus N,P and L Proteins support replication of respiratory syncytial virus genomic RNA analogs and define minimal trans-acting requirements for RNA replication. *J. virol.* 69 (4): 2412-2419
- 11) Kingsbury D:W: (1990). Paramyxoviridae and their replication In Fiels B.N, and Knipe D. M. (2a ed), *Virology* Raven Press, New York pp507-524

- 12) **Cane A. P. Pingle R:C** (1995) Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus. *Seminars in Virology* 6: 371-378
- 13) **Breese Hall** (1994) Prospects for a respiratory syncytial virus vaccine 205:1393-1394.
- 14) **Karzon D:T** (1991) Control of acute lower respiratory illness in the developing world: An assessment of vaccine intervention. *Reviews of Infections Diseases* 13 supp 16 S571-S577.
- 15) **Hornsleth A, Niels B, Friis B.** (1985) Detection of respiratory syncytial virus IgG subclass specific antibodies: Variation according to age in infants and children and diagnostic value RSV infected small infants. *J. Med virol.* 16:329-335.
- 16) **Hornsleth A., Niels B., Friis B.** (1985) Detection by ELISA of IgG subclass specific antibodies in primary respiratory syncytial virus infections *J. Med. virol.* 16:321-329
- 17) **Breese, Hall Wals E.** (1998) Immunity and Frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis* 163: 693-698
- 18) **Yamazaki H, Tsutsumi H. Matsuda K, Nagai K. Pearay L. Ogra and Chiba.** (1994) Effect of maternal antibody response in nasopharyngeal secretions in infants and children during primary respiratory syncytial virus infection, *J.Gen Virol.* 75: 2115-2119
- 19) **García B.B., Palomo C and Peñas C.** (1989). Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J. Virol.* 63(2):925-932
- 20) **Cane P.A. and Pringle C. R.** (1995) Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: Evidence for progressive accumulation of aminoacid changes in the attachment protein. *J. Virol.* 69 (5):2918-2925.
- 21) **Sullender W M;, Sun L. and Anderson L. J.** (1993) Analysis of respiratory syncytial virus genetic variability with amplified cDNAs. *J. Clin Microbiol.* 31 (5): 1224-1231.
- 22) **Velázquez O, Sil A.A., Rodríguez F. RamírezG., y Tapia R.** Mortalidad infantil en México. (1993) *Boletín mensual de Epidemiología SSA* 812:177.185.
- 23) **Valdespino J.L. Garcia M.L.,** (1994). Consideraciones clinicoepidemiológicas de las infecciones respiratorias agudas y crónicas, P 3-31. En: Garcia M.L. Giono S., Pacheco c. R. Escobar A. y Valdespino J.L. (eds). *Infecciones y respiratorias agudas y crónicas.* INDRE, México.

- 24) Glezem W P., Paredes A., Allison J. R., Taber L.H. and Frank A.L. (1981) Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low income families in relationship to age, sex ethnic group, and maternal antibody level. *J. Pediatr.* 98: 708-715.
- 25) Gimenez H. B., Keir H.M. and Cash P. (1989) In vitro enhancement of respiratory syncytial virus infection of U937 cell by human sera. *J. Gen Virol* 70:89-96.
- 26) Krilov L. R., Anderson L. J., Maroux L. and Bunagura V. R. (1989) Antibody-mediated enhancement of respiratory syncytial virus infection in two monocyte/macrophage cell lines. *J. Infect Dis.* 160:777-782
- 27) Becker S., Koren H. A. and Henke D.C. (1993) Interleukin expression in normal nasal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial viurs and cytokines tumor necrosis factor, Interleukin 1, and Interleukin 6. *Am. J Respir. Cell Mol.Biol.* 8:2027
- 28) Becker S., Quay J., and Soukup J.. (1991) Cytokine (tumor necrosis factor, Il-6, and Il-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages *J. S. Immunol* 147 (12):4307-4312
- 29) Arnold R., Werner F., HwbertB., Werchaw H., And kenig w. (1994) Effect of respiratory syncytial virus antibody complexes on cytokine (Il-8, Il-6, TNF-alfa) relase and respiratory burst in human granulocytes. *Immunology* 82:184-191
- 30) Welliver R. C., Sun M., Rinaldo D., and Ogra P.L. (1985). Respiratory syncytial virus specific IgE responses following infection: evidence for a predominantly mucosal response. *Pediatric. Res.* 19: 420-424.
- 31) Fuden H., Kaul T.N. and Ogra P.I. (1983) Activation of oxidative and arachidonic acid metabolism in neutrophils by respiratory syncytial virus antibody complexes: possible role in disease *J. Infect. Dis.* 148:110-116
- 32) Yalovitz B., Welliver R.C., Castro G., and Krytofik D.A.. (1988) The release of leukotrienes in the respiratory tract during infection with respiratory syncytial viurs: role in obstructive airway disease. *Pediatric Res.* 24 504-507

- 33) **Ananaba G.A. , and Anderson L.J.** (1991) Antibody enhancement. of respiratory syncytial virus stimulation of leukotriene production by a macrophage like cell line. *G. Virol.* 65(9): 5052-5060.
- 34) **Breese H. C. McBride, T. J. Walsh E.E. Bell M D. Ilala L. C. Hildreth S, Eyck T. G. Hall J.W.** (1983) Aerosolized Ribavirin treatment of infants with respiratory syncytial viral infection *N Engl J. M.* 308 (24): 1443-1447.
- 35) **Breese H. C., Walsh E:E: Jerome F. Hruska J. Betts F. Hall J. W.** (1983) Ribavirin treatment of experimental respiratory syncytial viral infection. *JAMA* 249 (19) 2666-2670
- 36) **Cerqueiro M.c., Murtag P. Hulac A. Weissenbacher M.** (1990) Epidemiology of acute respiratory tract infection in Buenos Aires Argentina, *Rev. Infect. Dis.* 12 supp 8: S1021-S219
- 37) **Johnston S. and Sregel C..** (1990) Evaluation of direct Immunofluorescence, Enzyme immunoassay, centrifugación culture, and conventional culture for the detection of respiratory syncytial virus. *J. Clin Microbiol.* 28(11):2394-2397.
- 38) **Takimotos., Gardien M., Ishida M.A. Pereira M.S., and cols.** (1991) Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect immuno fluorescence assay, and virus isolation for detection of respiratory viruses in nasopharyngeal secretions *J. Clin Microbiol* 29 (3):470-474.
- 39) **Rothbarth P, Hermus M.C. Schrijnemakers P.** (1991) Reliability of two new test kits for rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 29 (2):824-826
- 40) **Thomas E. and Book L.** (1991) Comparison of two rapid methods for detection of respiratory syncytial virus (RSV) Test Pack RSV and Ortho RSV ELISA) with direct immunofluorescence and virus isolation for the diagnosis of pediatric RSV infection. *J. Clin. Microbiol.* 29 (3): 632-635.
- 41) **Matthey S., Nicholson D. Ruhs S., Alden Beth, Knock M., Schultz, and Schmuckler A.** (1992) Rapid Detection of Respiratory Visuses By Shell Vial Culture and direct Staining by using pooled an individual Monoclonal antibodies. *J Clin. Microbiol* 30 (3): 540-544
- 42) **Cane P. A., and Pringle C. R.** (1992) Molecular epidentiology of respiratory syncytial virus rapid identification of subgroup A lineages. *J. Virol Methods.* 40: 297-306.

- 43) Sullender W. M., Sun L. And Anderson L. J. (1993). Analysis of respiratory syncytial virus genetic variability with amplified cDNAs. *J. Clin. Microbiol* 31(5):1224-1231.
- 44) Meteyaril J. D. and young D.R. (1994) Optimization of PCR and automated sequencing of clinical isolates of respiratory syncytial virus. *J. Virol Methods*. 50: 335-342.
- 45) Paton A.W., Paton J.C., Laurence A. J. Goldwater P.N., and Harris R.J. (1992) Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by reverse transcription and polimerase chain reaction amplification. *J. Clin Microbiol* 30 (4) 901-904.
- 46) Saiki R. K., Gelfand D.H, Stoffel, Sharf S.J, Higuchi R. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-492.
- 47) Sambrook J. Fritsch E. T., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press U.S.A. Second edition E.5 14.5-14.12
- 48) López J. A., Villanueva N., Melero J. A., Portela A. (1988) Nucleotide sequence of the fusion and phosphoprotein genes of human respiratory syncytial (RS) virus Long strain: Evidence of suptype genetic heterogeneity. *Virus Res*. 10:249-267
- 49) Sullender W.M., and Wertz G.M.. (1991) Synthetic oligonucleotide probes differentiate respiratory syncytial virus subgroups in a nucleic acid hybridization assay. *J. Clin Microbiol* 29:1255-1257.
- 50) Johnson P. R., springgs M. L., Olmsted R.A., and Collins P. L. (1987) The G glycoprotein of human respiratory syncytial viuruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5625-5629.
- 51) Cane p.A., Muthews D:A., Pringle C:R(1991) Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial virus. *J. Gen Virol*. 72: 2091-2096
- 52) Sullender, W. M, Mufson M. A., Anderson L.A., Wertz G. W. (1991) Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J. Virol* 65:5425-5434
- 53) Payment P y Trudel M *Methods and techiques in Virology* (1993) Marcel Dekker Inc New York
- 54) Chomzaynsky P., Sacchi N., (1987) Single-step metod of RNA isolation by acid guanidinium Thioeyonate-phenol-Chloroform extraction; *Anal Biochem*, 162: 156-159

2010  
 2011  
 2012  
 2013  
 2014  
 2015  
 2016  
 2017  
 2018  
 2019  
 2020  
 2021  
 2022  
 2023  
 2024  
 2025  
 2026  
 2027  
 2028  
 2029  
 2030  
 2031  
 2032  
 2033  
 2034  
 2035  
 2036  
 2037  
 2038  
 2039  
 2040  
 2041  
 2042  
 2043  
 2044  
 2045  
 2046  
 2047  
 2048  
 2049  
 2050

55) **Zamora M. Samal S.** (1992) Sequence analysis of M2 mRNA of bovine respiratory syncytial virus obtained from an F-M2 dicistronic mRNA suggest structural homology with that of human respiratory syncytial virus. *J. Gen Virol* 73: 737-741.