



11661
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

VIRUS RESPIRATORIOS AISLADOS DE PACIENTES
MENORES DE DIEZ AÑOS DE EDAD HOSPITALIZADOS
CON CUADRO CLINICO DE ENFERMEDAD AGUDA DEL
TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR (EATRI)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(AREA MICROBIOLOGIA)

P R E S E N T A

M. V. Z. ROSALINO VAZQUEZ LOPEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BEATRIZ GOMEZ GARCIA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE ME

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

27 A 229



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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología del dpto. de Microbiología y Parasitología en la Facultad de Medicina, UNAM, y en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, S.S.

Este trabajo fue posible gracias al apoyo de:

* La Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), U.N.A.M.

Proyecto IN 207296.

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

* Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), U.N.A.M. proyecto 72201/98.

* A la beca recibida del CONACyT por el tesista



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-CUAUTITLÁN

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

Coordinación General de Estudios de Posgrado
FES - Cuautitlán
Presente.

Por medio de la presente nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada "VIRUS RESPIRATORIO AISLADO EN PACIENTES CON DIEZ AÑOS DE EDAD HOSPITALIZADOS CON UN CUADRO CLÍNICO DE ENFERMEDAD AGUDA DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR (EATRI)".

que presenta el (la) alumno (a) VAZQUEZ LOPEZ ROSALINO

con Núm. de cuenta 8314918-6 N° Exp. 100941010

para obtener el grado de MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

_____ a _____ de _____ de 19 _____

NOMBRE DE LOS SINODALES

PRESIDENTE: DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

VOCAL: DR. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

SECRETARIO DR. ALVARO AGUILAR SETIEN

1er. SUPL. DRA. BEATRIZ GOMEZ GARCIA

2do. SUPL. M.C. HUMBERTO A. MARTINEZ RODRIGUEZ

[Handwritten signatures of the synodal members]



Universidad Nacional Autónoma de México

Secretaría General

Dirección General de Administración Escolar

Constancia 927194

NOMBRE DEL ALUMNO(A) VAZQUEZ LOPEZ ROSALINO

NO. DE CUENTA 8314918-6 NO. DE EXPEDIENTE 100941010

PLANTEL F.E.S. CUAUTITLAN

CLAVE 100

POSGRADO M EN MICROBIOLOGIA

CLAVE 481

AÑO SEM	CLAVE. ASIGNATURA	CREDITOS	ACTIVIDAD ACADEMICA	CALIFICACION	FOLIO
1994-1	100- 6001	8 M	OPT I BIOQUIMICA MICROBIANA	BIEN	10108438
1994-1	100- 6002	7 M	OPT II ESTADISTICA	MUY BIEN	10108439
1994-1	100- 6022	6 M	FISIOLOGIA CELULAR	BIEN	10108447
1994-1	100- 6113	9 M	INMUNOLOGIA BASICA	MUY BIEN	10108455
1994-1	100- 6114	1 M	SEM DE INMUNOLOGIA	MUY BIEN	10108456
1994-1	100- 9902	1 M	INGLES TRADUCCION	ACREDITADO	100
1994-2	100- 6205	18 M	BACTER Y MICOL VETERINARIAS	MUY BIEN	10111814
1994-2	100- 6207	16 M	VIROLOGIA VETERINARIA	MUY BIEN	10111815
1994-2	100- 6220	1 M	SEM DE VIROLOGIA	MUY BIEN	10111819
1994-2	100- 6221	1 M	SEMINARIO DE BACTERIOLOGIA	MUY BIEN	10111820
1995-1	100- 6303	10 M	OPT III ENFERMEDADES INFEC	MUY BIEN	10112845
1995-2	100- 6222	4 M	TRABAJO D INVESTIGACION I	MUY BIEN	10116478
1996-1	100- 6305	10 M	TRABAJO D INVESTIGACION II	NO PRESENTO	10120166
1997-1	100- 6305	10 M	TRABAJO D INVESTIGACION II	MUY BIEN	10128090
1997-2	100- 6400	20 M	TRABAJO D INVESTIGACION III	MUY BIEN	10132468

TOTAL DE CREDITOS RECONOCIDOS EN EL PLAN: 111

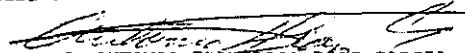
PROMEDIO DE LAS ASIGNATURAS RECONOCIDAS EN EL PLAN:

9.69 (NUEVE PUNTO SESENTA Y NUEVE)

ADEUDA LA PRESENTACION DE: TESIS Y SU REPLICA EN EXAMEN ORAL

LOS DATOS QUE ANTECEDEN, COINCIDEN CON LOS REGISTROS
ACADEMICOS DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACION DEL POSGRADO.

Ciudad Universitaria 30 de Jun. de 1998


LIC. ANTONIO FRANCISCO DÍAZ GARCIA
JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN DEL POSGRADO



CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

ASIGNACION DE BECA

REGISTRO
85695

FINANCIAMIENTO
CREDITO

FECHA
11/10/93

ORDEN No.
7574

DATOS DEL BECARIO

NOMBRE

VAZQUEZ LOPEZ ROSALINDO

FECHA NACIMIENTO

05/09/48

ESTADO CIVIL

SOLTERO

DEPENDIENTES

DATOS DE LA BECA

PROGRAMA DE BECA

ACADEMICA

PARA REALIZAR

GRADO DE MAESTRIA

TIPO DE BECA

TOTAL

AREA

CIENCIAS BIOLÓGICAS

DISCIPLINA

BIOLOGIA

ESPECIALIDAD

MICROBIOLOGIA

CONVENIO

INSTITUCION

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

CIUDAD Y ESTADO

CUAUTITLAN
ESTADO DE MEXICO

PAIS

MEXICO

PERIODO DE BECA

01/10/93

a

30/09/95

(24)

PRESUPUESTO

CONCEPTO	PAGARA	FECHAS O PERIODO DE PAGO	IMPORTE	TOTAL
Manutencion	BECA RIO	MENSUAL	1,250.00	30,000.00
			N*	30,000.00

AUTORIZO

REVISO

CONTROL PRESUPUESTAL

DIRECTOR DE ORIENTACION

JEFE DEL DEPARTAMENTO

CONTRALORIA

VACIONES

BECA RIO

0AA02

AGARDECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que de alguna u otro forma ayudaron en la realización de este trabajo de tesis; dentro de las cuales cito a las siguientes:

DRA. BEATRIZ GÓMEZ GARCÍA (Jefa del Laboratorio de Virología, Dpto. Microbiología y Parasitología, U.N.A.M.) .- Por haberme brindado la oportunidad de realizar la tesis con ella, por su acertada dirección a la misma, sus enseñanzas, sus valiosos consejos y en fin, por todo el apoyo que me brindó, por todo esto y mucho más, mil gracias doctora.

BIOL. IRMA LÓPEZ MARTINEZ (Jefa del Laboratorio de Virus Respiratorios, I.N.D.R.E.).- Por proporcionarme parte de las muestras clínicas trabajadas, los kits diagnósticos, el material y las instalaciones para el aislamiento de virus en embrión de pollo y en línea celulares.

M. en C. ROCIO TIRADO MENDOZA (Técnico Académico Asociado "B", T.C. del Laboratorio de Virología, Dpto. Microbiología y Parasitología, U.N.A.M.) .- Por haberme proporcionado el entrenamiento y la asesoría en técnicas de biología molecular, principalmente en la extracción de RNA total y RT-PCR, por su asesoría la redacción preliminar de la tesis y su incondicional colaboración en los momentos difíciles de la tesis.

M. en C. ROSA ELENA SARMIENTO (Técnico Académico Asociado "B", T.C. del Laboratorio de Virología, Dpto. Microbiología y Parasitología, U.N.A.M.)- Por haberme proporcionado el entrenamiento y la asesoría en técnicas de cultivo celular y aislamiento viral, así como en la toma de las fotografías que aparecen en la tesis, por su asesoría la redacción preliminar de la tesis y su total apoyo en el desarrollo de la tesis.

A MIS SINODALES:

DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO.- Por su colaboración en la parte estadística

DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA.- Por sus consejos a la discusión

DR. ALVARO AGUILAR SETIEN.- Por sus consejos para la organización

DRA. BEATRIZ GÓMEZ GRACIA.- Por la dirección

M. EN C. HUMBERTO A. MARTINEZ RODRIGUEZ.- Por sus consejos a la discusión

A todos mis sinodales les doy el mas sincero agradecimiento por el tiempo y dedicación prestados a la revisión y evaluación de esta tesis, y de quienes siempre recibí, de la mejor manera, las críticas mas acertadas para poder enriquecer el trabajo

A MIS PROFESORES:

DR. ABEL CIPRIAN C., DRA. SUSANA E. MENDOZA, DR. ALVARO AGUILAR, DR. ELISEO HERNÁNDEZ, DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ, DR. ANTONIO MORILLA, M EN C CLARA INES, DR. EDGAR.

Por todas sus enseñanzas y por su enorme entrega al posgrado de FES-Cuautitlán, y por la gran amistad que me brindaron en todo momento.

AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE VIROLOGÍA

A ROCIO, ROSA ELENA, MIRZA Y ENRIQUE.- Por su invaluable ayuda que siempre me brindaron de forma desinteresada y oportuna, y por su enorme apoyo en las buenas y las malas.

A TONY: Por su apoyo

A JESUS E IGNACIO: Por siempre apoyarme con el material requerido

gradezco al DR. OSCAR THOMPSON (HOSPITAL DR. GEA GONZALEZ, S.S. Y HOSPITAL
ENADOS, I.M.S.S.) y al DR. JOSE LUIS CASTAÑEDA J. (INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA)
or su valiosa ayuda y se enorme cooperación al proporcionarme las muestras clinicas

gradezco también al ING. GARIBAY (DPTO. DE MATEMÁTICAS DE LA F.E.S.- CUAUTITLÁN, U.N.A.M.)
r su enorme ayuda en el asesoramiento en el estudio estadístico de los resultados

A MI FAMILIA:

A mis padres PROFRA. SOBEIDA LÓPEZ VÁZQUEZ Y PROFR. ROSALINO VÁZQUEZ CONDE por el apoyo moral, afectuoso y económico que me brindaron para la realización de toda la maestría.

A mi esposa Q.F.B. SANDRA GEORGINA SOLANO GALVEZ por el apoyo incondicional que me brindó durante todo el proceso de realización de la tesis.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a:

MI FAMILIA:

- Profra. Sobeida López Vázquez: Mi madre, por haberme dado la vida y haberme enseñado a amar al prójimo y a la mujer, haberme enseñado a perdonar la injusticia y la mentira y haberme enseñado el amor a Dios y a la ciencia
- Profr. Rosalino Vázquez Conde: Mi padre, por haberme dado la vida y por haberme enseñado el amor por el trabajo, el amor por la ciencia, por haberme enseñado el camino correcto a seguir, el camino que debo enseñar a los míos, por enseñarme como debe ser un hombre ejemplar en su hogar.
- Q.F.B. Sandra Solano Galvez: Mi esposa, por se mi musa, el centro de toda mi inspiración, por ser mi motor y la fuerza que guía mi vida, por ser mi amiga y mi confidente, mi juez y mi amante, mi niña y mi mujer. Por compartir conmigo todas las espinas y los pétalos, todas las historias de azúcar y sal. Por haber querido compartir conmigo este loco sueño a través de la vida por tiempo que Dios nos de.
- P. Físico Juan Pedro Vázquez López: Mi hermano, quien con ocho años menor que yo, es y seguirá siendo mi inspiración y compromiso para no fallar. A quien con todo mi amor le dedico también mis triunfos.
- A la banda: Profra. Elsa V.L.(mi segunda madre), Dra. Irma V.L. (mi flaca), Cdto. Dr. en C. Isabel V.L. (mi guagua), Lic. Psicología Alma V.L. (mi chapis), Lic. Letras Hisp. Martha V.L. (Mi Martitita), Ing. Juan Carlos Paizanni (el carlangas), Victor Bravo (vic), Manuel (Manolo), Ale (y sus shushanos), Irmitta (hola...), Xunaxy, Carlitos (y su compu), Belona (campanas de Belén), Donis (y sus frenos), Manolo y Martitita (y su periódico).

A MIS AMIGOS:

- A Rocio, Rosa Elena, Mirza, Enrique, Tony, Chuchino y Nacho: por todo el apoyo que siempre.

A MIS PROFESORES:

DR. ABEL CIPRIAN C., DRA. SUSANA E. MENDOZA, DR. ALVARO AGUILAR, DR. ELISEO HERNÁNDEZ, DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ, DR. ANTONIO MORILLA, M EN C CLARA INES, DR. EDGAR.

i.- RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo principal, el aislamiento e identificación de virus respiratorios involucrados en enfermedad respiratoria aguda exclusiva del tracto respiratorio inferior (EATRI), en pacientes hospitalizados menores de diez años de edad. Los virus estudiados fueron: Respiratorio Sincitial (RSV), Parainfluenza tipos 1, 2 y 3 (PIV-1, PIV- 2 y PIV- 3), Influenza (IV), Adenovirus (AV) y Herpesvirus tipos 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2).

Para tal motivo se estudió una población de 91 niños menores de diez años de edad y hospitalizados en la Ciudad de México, y con cuadro clínico de Enfermedad Aguda del Tracto Respiratorio Inferior (EATRI).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que, los casos de pacientes con EATRI en los que se detectó la presencia de por lo menos alguno de los virus estudiados no tuvieron relación con el nivel socioeconómico de la familia del paciente ($P < 0.05$). Además tampoco se observó relación con el grupo etario al que pertenecían dichos pacientes, es decir que la presencia de por lo menos alguno de los virus estudiados se demostró en niños con EATRI desde 0 hasta los 10 años ($P < 0.05$).

El factor de riesgo más importante para la presentación de la enfermedad fue la convivencia con alguna persona con enfermedad respiratoria en general, este fenómeno fue observado en el 100% de los casos.

En ninguno de los casos se pudo aislar el virus de Influenza. Además la presencia de RSV y / o HSV fue independiente de la manifestación clínica de EATRI (bronquitis, bronquiolitis o neumonía) ($P < 0.05$). Para los casos de PIV y AV no se pudo realizar la correlación debido al bajo número de muestras.

Cabe señalar que los dos agentes que fueron detectados en un mayor número de muestras son el RSV y el HSV. El RSV ha sido plenamente estudiado y señalado por diferentes autores como causa importante de EATRI en niños menores de un año de edad. Por otra parte el HSV ha sido muy poco estudiado y sólo en algunos reportes de otros países se ha asociado con EATRI (111 - 115), al parecer el presente trabajo representa el primer reporte en México de éste tipo.

Por otra parte se comprobó que las líneas celulares empleadas para el aislamiento viral (MRC-5 y VERO) ofrecen los mismos resultados entre sí, sin embargo el empleo de la membrana corioalantoidea para el mismo propósito difirió de las primeras. Por lo tanto concluimos que la permisibilidad que muestran algunas células empleadas para el aislamiento viral es variable y depende tanto del tipo celular empleado como del virus que se intente aislar. Esta información resultará útil para trabajos como el presente, en donde se deseen aislar diferentes virus a la vez.

Finalmente la presencia de virus en los casos de EATRI fue independiente de la época del invierno que se estudió (inicio o final) y al número de muestras colectadas en dichas épocas ($P < 0.05$).

Nuestros resultados no pueden ser comparados con estudios previos de otros autores en México, debido a que éstos últimos fueron realizados en pacientes con enfermedad respiratoria del tracto respiratorio inferior y superior (80). Además en estos estudios no fue considerada la edad de los pacientes, ni el tipo de enfermedad respiratoria, ni tampoco se siguió una misma metodología para el aislamiento viral de cada una de las muestras (81). Por otra parte existen estudios basados únicamente en seroepidemiología sin aislamiento viral (80, 82, 83, 85)

1.- INTRODUCCIÓN

Las enfermedades agudas del tracto respiratorio inferior están consideradas a nivel mundial como la primera causa de mortalidad en niños menores de un año, y aunque el padecimiento también se presenta en otras edades, en lo subsecuente sólo se hará referencia a los grupos etarios de niños menores de un año (infantes), de uno a menos de cuatro (preescolar) y de cuatro a catorce años de edad (escolares), debido a que son estos los grupos en los que se enfocó el presente trabajo .

En México, las enfermedades agudas del tracto respiratorio inferior se encuentran entre las cinco principales causas de mortalidad de origen infeccioso en niños menores de catorce años (1, 2, 3) (Tablas 1, 2 y 3).

La enfermedad aguda del tracto respiratorio inferior en niños menores de catorce años puede ser producida por diferentes agentes etiológicos, entre los que se encuentran principalmente virus y/o bacterias.

Entre los agentes etiológicos bacterianos involucrados en la enfermedad aguda del tracto respiratorio inferior en estos grupos de edades, se encuentran principalmente los géneros *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus β hemolíticos*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Neisseria catarrhalis*.

En el caso de los virus cerca de doscientos tipos distintos son capaces de infectar el tracto respiratorio humano. De estos, sólo algunos pueden causar enfermedad aguda del tracto respiratorio inferior en niños menores de catorce años y que requieren hospitalización, entre los principales se encuentran algunos géneros de las familias Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Coronaviridae y Picornaviridae, (4, 5, 6).

1.1.- Familia Orthomyxoviridae

Esta familia está formada por virus pleomórficos envueltos de RNA de cadena sencilla, segmentada y de polaridad negativa. Está compuesta por dos géneros, el de la Influenza tipo A y B y el de Influenza tipo C; aunque se ha reconocido un tercer género denominado virus similar al virus Thogoto (6 - 9). El virus de la influenza tipo C a diferencia de los tipos A y B, no produce brotes epidémicos ni se aísla frecuentemente.

1.1. 1.- VIRUS DE LA INFLUENZA TIPOS A Y B :

Las partículas virales de Influenza A y B, son esféricas y/o pleomórficas con ocho segmentos de RNA, su nucleocápside es de simetría helicoidal y está cubierta con la proteína de la matriz y sobre esta última se localizan las proteínas de la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), ancladas en la envoltura del virión constituyendo así los antígenos superficiales de la partícula viral (9).

Los virus de influenza presentan modificaciones antigénicas en todas sus proteínas. La variación en la HA y en la NA, se asocian a la aparición de nuevas cepas antigénicamente diferentes entre sí, lo cual tiene repercusión desde el punto de vista de la protección inmunológica de una población. Se conocen dos tipos de variación antigénica, la mayor o "shift", y la menor o "drift". La variación mayor consiste en la modificación total de la molécula que puede darse en la HA o NA o en ambas. La variación menor es una modificación de un fragmento de la molécula, por lo que la mayor parte permanece sin cambio, por ejemplo, la sustitución de un solo aminoácido. Esta variabilidad antigénica le ofrece una enorme ventaja al virus para poder evadir el sistema inmune de su hospedero y poder infectarlo y así producir la enfermedad.

TABLA 1.- COMPENDIO HISTÓRICO DE LAS PRINCIPALES SEIS CAUSAS DE MORTALIDAD EN NIÑOS MENORES DE UN AÑO DE EDAD, A NIVEL NACIONAL. TASA DADA POR 1,000 NACIDOS VIVOS

	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
Tasa total	22.99	23.6	25.69	24.07	20.73	18.76	17.47	16.97	17.46	16.88
1er lugar	I. Intest. 4,82	I. Intest. 4,16	I. Intest. 3,97	I. Intest. 3,63	I. Intest. 2,78	N. e l. 2,49	N. e l. 2,15	N. e l. 2,27	N. e l. 2,17	N. e l. 2,13
2º lugar	N. e l. 3,27	N. e l. 2,76	N. e l. 3,57	N. e l. 3,20	N. e l. 2,67	I. Intest. 1,84	I. Intest. 1,66	I. Intest. 1,35	I. Intest. 1,27	I. Intest. 1,07
3er lugar	I.R.A. 0,46	I.R.A. 0,47	I.R.A. 0,63	Sarp. 0,59	I.R.A. 0,44	I.R.A. 0,41	I.R.A. 0,31	I.R.A. 0,37	I.R.A. 0,35	I.R.A. 0,32
4º lugar	B.C. 0,43	B.C. 0,38	B.C. 0,43	I.R.A. 0,52	B.C. 0,26	B. C. 0,26	B. C. 0,25	Sept. 0,25	Sept. 0,25	Sept. 0,26
5º lugar	Sept. 0,25	Sept. 0,31	Sept. 0,29	B.C. 0,37	Sept. 0,23	Sept. 0,20	Sept. 0,22	B. C. 0,22	B.C. 0,21	B.C. 0,21
6º lugar	Mening. 0,19	Mening. 0,17	Sarp. 0,24	Sept. 0,28	Mening. 0,12	Mening. 0,10	Mening. 0,10	Mening. 0,09	Mening. 0,09	Mening. 0,09

Tasa dada por 1,000 nacidos vivos

N. e l. = Neumonía e Influenza

I. Intest.= Infecciones intestinales

Sept.= Septicemia

I.R.A.= Infecciones respiratorias agudas

B.C. = Bronquitis crónica y la no especificada, enfisema y asma

Mening. = Meningitis

Sarp.= Sarampión

Fuente: Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) libros de Estadística Demográfica (Cuaderno de población No.8) y de Información Estadística del Servicio de Salubridad y Seguridad Social (Cuaderno No. 13), basado en datos de Serv. Nal. de Salud, Sec. Salud, Insitutos Nals.

IMSS, IMSS-Solidaridad, ISSSTE, SEDENA, SEMAR, PEMEX, DDF.

TABLA 2.- COMPENDIO HISTÓRICO DE LAS PRINCIPALES SEIS CAUSAS DE MORTALIDAD EN NIÑOS DE UN A CUATRO AÑOS DE EDAD, A NIVEL NACIONAL. TASA DADA POR 10.000 HABITANTES DE ESA EDAD

	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
Tasa total	22.58	22.16	24.46	24.35	16.04	12.96	13.5	11.99	12.03	11.71
1er lugar	I. Intest 67,42	I Intest 5,62	I Intest 5,62	I Intest 4,99	I Intest 3,8	I. Intest. 2,42	I Intest 2,37	I Intest 1,68	N. e I. 16.4	I. Intest.1,51
2º lugar	N. e I. 2,36	N e I 2,24	N e I 3,06	Sarpmn 3,40	N e I 1,64	N. e I. 1,47	N e I 1,61	N e I 1,65	I. Intest.1,54	N. e I. 1,47
3er lugar	BC. 0,64	BC 0,59	Sarpmn 1,46	N e I 2,91	BC 0,43	B. C. 0,42	BC 0,43	BC 0,35	B. C. 0,53	B. C. 0,33
4º lugar	IRA 0,39	IRA 0,45	BC 0,65	BC 0,58	IRA 0,32	I. R. A. 0,25	IRA 0,28	Sept 0,24	I. R. A. 0,26	Sept. 0,26
5º lugar	Sept 0,33	Sept 0,38	IRA 0,57	IRA 0,45	Sept 0,26	Sept. 0,15	Sept 0,20	IRA 0,23	Sept. 0,24	I. R. A. 0,22
6º lugar	Tos F 0,25	Mening 0,22	Sept 0,34	Sept 0,31	Mening 0,16	Mening 0,13	Mening 0,14	Nef 0,12	Hep.V. 0,12	Nefr 0,13

Tasa dada por 10,000 habitantes de este grupo etario

N. e I. = Neumonía e Influenza

I. Intest = Infecciones intestinales

IRA= Infección aguda respiratoria

Sept.= Septicemia

B. C. = Bronquitis crónica y la no especificada, enfisema y asma

Hep.V.= Hepatitis vírica

Tos. F. = Tos Ferina

Nef.= Nefritis, síndrome nefrótico y nefrosis

Fuente: Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) libros de Estadística Demográfica (Cuaderno de población No.8) y de Información Estadística del Servicio de Salubridad y Seguridad Social (Cuaderno No. 13), basado en datos de Serv. Nal. de Salud, Sec. Salud, Insitutos Nals IMSSS, IMSSS-Solidaridad, ISSSTE, SEDENA, SEMAR, PEMEX, DDF.

TABLA 3.- COMPENDIO HISTÓRICO DE LAS PRINCIPALES CINCO CAUSAS DE MORTALIDAD EN NIÑOS DE CINCOA CATORCE AÑOS DE EDAD, A NIVEL NACIONAL. TASA DADA 100,000 HABITANTES DE ESA EDAD

	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
Tasa total	52.9	56.6	56.84	56.81	46.8	42.0	41.4	37.0	37.0	37.2
1er lugar	I. Intest 5,19	I. Intest 5,45	I. Intest 4,90	Sarmp 4,84	I. Intest 3,5	I. Intest 2,6	I. Intest 2,1	N e l 1,6	N e l 1,8	N e l 1,7
2º lugar	N e l 2,24	N e l 2,46	N e l 3,09	I. Intest 4,59	N e l 1,9	N e l 1,6	N e l 1,9	I. Intest 1,4	I. Intest 1,4	I. Intest 1,2
3er lugar	P.C.I. 0,83	Nef 0,92	Sarmp 1,64	N e l 3,10	Nef 0,8	P.C.I. 0,7	P.C.I. 0,8	P.C.I. 0,9	P.C.I.1.0	P.C.I.1.0
4º lugar	Nef 0,61	P.C.I. 0,87	Nef 0,80	Nef 0,87	P.C.I. 0,7	Nef 0,7	Nef 0,8	Nef 0,7	Nef 0,8	Nef 0,8
5º lugar	Sept 0,49	Sept 0,73	P.C.I. 0,77	P.C.I. 0,79	Sept 0,5	Sept 0,4	Sept 0,4	Sept 0,4	Sept 0,4	Sept 0,4

Tasa dada por 100,000 habitantes de este grupo etario

N. e l. = Neumonía e Influenza

I. Intest = Infecciones intestinales

Sept. = Septicemia

I.R.A. = Infecciones respiratorias agudas

P.C.I. = Parálisis cerebral infantil y otros síndromes paralíticos

Nef. = Nefritis, síndrome nefrótico y nefrosis

Sarmp. = Sarampión

Fuente: Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) libros de Estadística Demográfica (Cuaderno de población No 8) y de Información Estadística del Servicio de Salubridad y Seguridad Social (Cuaderno No. 13), basado en datos de Serv. Nal de Salud, Sec. Salud, Insitutos Nals.

IMSSS, IMSSS-Solidaridad, ISSSTE, SEDENA, SEMAR, PEMEX, DDF.

La influenza es una enfermedad que se caracteriza por fiebre abrupta, dolor de garganta, tos no productiva, mialgia, dolor de cabeza y malestar generalizado. La enfermedad sin complicaciones dura de 3 a 7 días pero la tos y la debilidad puede persistir por más de una semana; sin embargo es frecuente que se presenten complicaciones con infecciones bacterianas. En preescolares puede desarrollarse laringotraqueobronquitis ("croup"), neumonía o infección de oído medio. Además, en niños menores de 1 año, el porcentaje de mortalidad puede alcanzar el 85%. Estas infecciones se asocian con infecciones bacterianas secundarias (Ej. *Streptococcus aureus*, *Staphylococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, etc.) (6, 9)

En individuos mayores de 65 años esta infección tiene una mortalidad del 80 al 90%, el riesgo es mayor en individuos con afección crónica pulmonar o cardíaca, renal, hepática o de sistema endócrino (10)

Para el diagnóstico las muestras de elección son: el esputo o exudado faríngeo, lavado nasal, lavado orofaríngeo, o aspirado nasofaríngeo. Tradicionalmente se utiliza el cultivo en embrión de pollo por vía amniótica y alantoidea, su confirmación se realiza por ensayos de hemaglutinación y su tipificación por inhibición de la hemaglutinación con tres sueros contra virus de influenza tipos A, B y C. Actualmente en algunos centros de diagnóstico en el mundo se realiza el aislamiento y la identificación empleando la línea celular MDCK (fibroblastos de riñón de perro) incubando a 33 ó 34°C en presencia de tripsina. El virus de influenza puede ser diagnosticado por hemadsorción empleando eritrocitos de cuyos o también mediante la identificación de antígenos virales en células infectadas por medio de inmunofluorescencia (6 - 12)

1.2.- Familia Paramyxoviridae

Esta familia esta compuesta por virus envueltos con un diámetro de 150 a 300 nm, su genoma consiste en una cadena de RNA no segmentado de polaridad negativa. Esta familia se divide en dos subfamilias, la Paramyxovirinae y la Pneumovirinae. La subfamilia Paramyxovirinae está constituida por los géneros Paramyxovirus (Ej. Parainfluenza), Morbillivirus (Ej. Virus del sarampión) y los Rubulavirus (Ej. Virus de las paperas). La subfamilia Pneumovirinae constituida por el género Pneumovirus (Ej. Virus Respiratorio Sincitial) (13).

1.2.1.- VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL (RSV) :

El RSV es la principal causa de enfermedad aguda del tracto respiratorio inferior en los niños menores de diez años. Las más altas tasas de infección ocurren en infantes de 6 meses a 1 año de edad, pudiendo empezar a manifestarse desde los 2 a 3 meses de edad (14 - 17). Del 20 al 25% de las de neumonías y más del 75% de las bronquiolitis que se presentan en pacientes hospitalizados, en niños menores de 1 año, son producidas por RSV (18, 19, 20).

La infección con RSV se ha reportado a nivel mundial, en epidemias anuales, las cuales ocurren a finales de otoño, invierno o primavera, teniendo su máximo pico en invierno y decayendo en los meses de abril y mayo. El virus es raramente aislado durante el verano (21). La altitud y el clima también tienen efecto en el aumento de la ocurrencia de la enfermedad (22). Se ha estimado que en más del 50% de los casos de RSV reportados, el contacto directo es un factor de riesgo (14, 23 - 26).

El RSV es transmitido principalmente por contacto estrecho persona-persona y por fomites. El período de incubación de la enfermedad es aproximadamente de 4 a 6 días, y el virus permanece por dos semanas o más en niños y por un período más corto en adultos (26-A).

Con respecto a individuos menores de diez años se ha señalado que, un estado inmunológico deficiente, un estado nutricional pobre, la convivencia con fumadores y/o personas que padezcan alguna enfermedad respiratoria de origen infeccioso, son factores predisponentes (14 - 17).

El diagnóstico de RSV se establece por el aislamiento viral, a partir de fluidos nasales, incluyendo esputo, secreciones de garganta y fluidos nasofaríngeos (27 - 30). El aislamiento se realiza en líneas celulares susceptibles a la infección por RSV, como HeLa (carcinoma epitelioide de cervix humano), HEp-2 (carcinoma epidermoide de laringe humana) y MRC-5 (células diploides de pulmón humano). El efecto citopático característico de éste virus es la formación de células gigantes multinucleadas denominadas sincitios (12, 24).

El virus es propagado en cultivo celular e identificado específicamente por reacciones antígeno-anticuerpo, empleando técnicas tales como: inmunofluorescencia o ELISA (31 - 34). El uso de las técnicas inmunoenzimáticas en estuche o kit comercial, se ha venido incrementando dado su alta sensibilidad y especificidad (35 - 41), además de su alto grado de simplicidad de manejo (42, 43). Se ha reportado, que para la detección de antígeno en una prueba inmunoenzimática, es preferible emplear la muestra clarificada que solamente las células provenientes de ésta, debido a que al emplear solamente las células, aumentan los falsos positivos (43, 44, 45).

Otras técnicas como la de la PCR (*Reacción en Cadena de la Polimerasa*) se han empleado para diagnóstico (46 - 53) y estudios epidemiológicos (53-A).

1.2.2.- VIRUS DE PARAINFLUENZA (PIV) :

El Virus de Parainfluenza (PIV) tiene cuatro serotipos virales PIV1, PIV2, PIV3 y PIV4, los cuales son patógenos para el humano y se encuentran distribuidos en todo el mundo. Los tres primeros son más fácilmente diagnosticados por aislamiento que el cuarto, el cual puede ser identificado por pruebas serológicas e inmunoenzimáticas.

La infección que producen los virus de PIV se limita al tracto respiratorio, generándose principalmente infecciones de tipo agudo.

El PIV produce infección primaria que se caracteriza por afectar a niños menores de cuatro años, generalmente manifestada como coriza y faringitis, asociada frecuentemente a un cuadro leve de bronquitis y fiebre (54).

En infantes, especialmente menores de seis meses PIV tipo 3 puede ocasionar bronquiolitis y neumonía, clínicamente indistinguibles de RSV (6, 26).

En niños de seis meses a cinco años PIV tipo 2 principalmente, y PIV-1 en menor grado son responsables del síndrome de laringotraqueobronquitis conocido también como croup; asociado también con fiebre, tos, estridor y dificultad respiratoria puede ocasionalmente evolucionar a obstrucción laringea.

El mecanismo de infección del PIV, como muchos agentes respiratorios, es por gotas de saliva eliminadas por el portador, y / o por contacto directo con secreciones respiratorias. El período de incubación es de 2 a 6 días, PIV-1 y PIV-2 son altamente transmisible e infectan a niños menores de cinco años causando croup. El PIV-3 infecta a niños menores de dos años y puede presentarse como una enfermedad intrahospitalaria en el área de incubadoras de recién nacidos, causando casos de neumonía y bronquiolitis. El tipo 4 produce solamente una enfermedad trivial.

La infección por el PIV induce a la aparición de una inmunidad de corta duración, por otro lado, la reinfección con cualquier tipo de PIV es frecuente, aunque la enfermedad es menos severa y generalmente confinada a tracto respiratorio superior.

Tradicionalmente el virus de Parainfluenza ha sido aislado en cultivos primarios de células de riñón humano o de mono; pero actualmente han sido desplazadas por líneas celulares continuas como Vero (riñón de mono verde africano). Los virus de Parainfluenza se multiplican de forma muy lenta y causan muy poco efecto citopático, excepto en el tipo 2, que induce la formación de sincitios. La replicación viral, así como, la diferenciación entre tipos de PIV, es más rápida y confiable por medio de técnicas de inmunofluorescencia y ensayo inmunoenzimático.

1.3.- Familia *Adenoviridae*

Los virus de la familia *Adenoviridae* son desnudos, de cápside icosaédrica, con DNA de doble cadena como genoma. La cápside se constituye por 240 capsómeros llamados "hexones" (rodeado por seis capsómeros vecinos) y doce capsómeros llamados "pentones" (rodeado por cinco capsómeros vecinos), los cuales se encuentran en vértice. Existen dos géneros en esta familia, Mastadenovirus (Ej. Adenovirus humano tipo 2) y Aviadenovirus (Ej. Adenovirus de la gallinas tipo 1) (55).

Los adenovirus se replican inicialmente en la faringe, conjuntiva o intestino delgado, y generalmente no infectan mas alla de los nódulos linfáticos cervicales, auriculares o mesentéricos.

1.3.1- ADENOVIRUS HUMANO (AV) :

Cerca de la mitad de los serotipos conocidos de Adenovirus, han sido relacionados con enfermedades de diferentes tipos. Adenovirus serotipos 1 al 8 son los más comunes y los de mayor difusión mundial (55).

El adenovirus puede producir infección de tipo respiratoria, ocular, de tracto génito urinario, entérica e infección en pacientes inmunocomprometidos.

El AV es la causa de cerca del 5% de las enfermedades respiratorias agudas en niños menores de 4 años en Estados Unidos. En contraste a muchas infecciones respiratorias virales, las infecciones por adenovirus conducen a una inmunidad duradera para muchos serotipos. Los anticuerpos maternos protegen al recién nacido hasta los seis meses de edad contra infecciones severas del tracto respiratorio inferior.

Las principales manifestaciones clínicas de infección respiratoria que produce el adenovirus son de tres tipos: faringitis, enfermedad respiratoria aguda y neumonía.

La faringitis por adenovirus se observa principalmente en infantes, los cuales manifiestan tos, congestión nasal, fiebre, inflamación de garganta y frecuentemente tonsilitis exudativa. Los serotipos involucrados en este padecimiento son del 1 al 7.

Enfermedad aguda por adenovirus es el nombre que se le da al síndrome caracterizado por fiebre, faringitis, adenitis cervical, tos y malasia. Esta enfermedad ocurre de forma epidémica en grupos de personas hacinadas. Los tipos 6 y 7 son frecuentemente los responsables de esta enfermedad.

La neumonía por adenovirus, es una enfermedad frecuentemente severa y ocasionalmente fatal, se puede desarrollar en infantes infectados con algún serotipo común, pero particularmente los serotipos 3 y 7. En algunos de los países más fríos del mundo, como el norte de China o Canadá los adenovirus son una importante causa de neumonía en infantes menores de dos años de edad. Los casos de fallecimiento pueden ser altos, y en pacientes crónicos los casos de falla pulmonar puede acompañarse de casos de bronquiectasia o bronquitis obliterante.

Dependiendo de la presentación clínica de la adenovirusosis será el tipo de muestra a elegir. Las muestras apropiadas para la presentación respiratoria incluyen: lavado faríngeo, exudado nasofaríngeo, aspirado nasofaríngeo, aspirado transtraqueal o

lavado bronquial. Para el aislamiento viral se han empleado líneas celulares como Vero, HEp-2 (carcinoma epidermoide de laringe humana), KB (carcinoma epidermoide oral humano) o A-549 (carcinoma pulmonar humano). Los adenovirus comunes (tipos del 1 al 7) producen efecto citopático en una o dos semanas. Las células se observan redondeadas y refringentes, agrupadas en forma de racimo de uvas, y revela las características inclusiones intranucleares basófilas después de teñirse. La confirmación se puede hacer por inmunofluorescencia a partir de la monocapa fijada (55).

1.4.- Familia *Herpesviridae*

Los virus de esta familia son envueltos pleomórficos o esféricos, con cápside icosaédrica con DNA de doble cadena como material genético. Esta familia está integrada por tres subfamilias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*.

En la subfamilia *Alphaherpesvirinae* están los géneros Simplexvirus (Ej. virus Herpes simple tipo 1) y Varicellovirus (Ej. virus Herpes simple tipo 3)

En la subfamilia *Betaherpesvirinae* está el género Cytomegalovirus (Ej. virus Herpes tipo 5 o Citomegalovirus humano)

En la subfamilia *Gammaherpesvirinae* está el género Lymphocryptovirus (Ej. virus Herpes tipo 4 o Epstein-Barr Virus)

1.4.1.- VIRUS HERPES SIMPLE TIPO 1 Y 2 :

La infección por Herpes simplex, puede tener las siguientes manifestaciones clínicas, orofaríngea, genital, queratoconjuntivitis, infección cutánea, encefalitis, herpes neonatal e infección diseminada en pacientes inmunocomprometidos.

De estos padecimientos la manifestación neonatal pueden estar involucrada en *enfermedad respiratoria aguda*. Se presenta como una enfermedad severa adquirida por los recién nacidos, generalmente al atravesar el canal de parto, en la mayoría de los casos es debido a HSV-2, pero también hay casos de HSV-1 adquirido postnatalmente y en menores casos prenatalmente por transmisión transplacentaria. El herpes neonatal puede presentarse de forma diseminada (con mortalidad de hasta 80%), como encefalitis o como enfermedad localizada en superficies mucocutáneas como piel, ojo, orofaringe y faringe.

El diagnóstico de Herpes virus se puede hacer por cultivo en líneas celulares, por ejemplo en células Vero, donde se aprecia el efecto citopático como redondeamiento de las células; cuando el título viral es muy bajo, se recomienda hacer el aislamiento en membrana corioalantoidea de embrión de pollo. Por éste método es posible detectar a las 72 hrs. lesiones de tipo pustular en forma de placas de 0.5 a 1.5 mm de diámetro o vesículas de 1 a 1.5 mm de diámetro, ambas lesiones con bordes regulares y bien delimitados, pudiendo encontrarse acompañadas por un proceso hemorrágico localizado. Dichas lesiones son sugestivas de infección por HSV (56 - 60). Sin embargo, otros virus pueden causar lesión en membrana corioalantoidea, entre los que se encuentran: el virus de la Viruela (61, 62, 63), el virus del Sarampión (64, 65), el virus de la Parotiditis (66, 67) y el Adenovirus (68, 69). Por otra parte existen virus los cuales no producen lesión visible, sin embargo, puede detectarse antígeno en la membrana corioalantoidea, como en el caso del virus de la Hepatitis B (70), el virus de Influenza (11, 71, 72), y el virus Sendai (71, 72, 73). Por tal motivo se requiere la confirmación y tipificación del HSV por medio de técnicas como la inmunofluorescencia.

1.4.2.- VARICELA :

Otro género de la familia Herpesviridae es el denominado virus varicela-zoster (VZV), el cual es responsable de dos de las enfermedades más importantes para el humano: varicela, uno de los exantemas de la infancia, y el herpes zoster, una enfermedad que produce invalidez laboral en personas adultas y también afecta a individuos inmunocomprometidos.

El virus de varicela se transmite por vía aérea y se replica inicialmente en la mucosa del tracto respiratorio y orofaringe del humano. Tiene un periodo de incubación de 10 a 20 días la diseminación ocurre vía linfática y sanguínea, multiplicándose en leucocitos y células endoteliales.

La infección con el VZV se manifiesta principalmente como exantema cutáneo, sin embargo, puede haber manifestaciones de tipo neurológicas, poco comunes casi siempre fatales o con secuelas.

Las lesiones necrotizadas y hemorrágicas características del exantema cutáneo, también pueden involucrar otros órganos incluyendo pulmones, hígado y cerebro.

El cuadro clínico de la varicela es tan característico que pocas veces se recurre al laboratorio para su confirmación. La histopatología describe células gigantes multinucleadas con inclusiones intranucleares características.

El diagnóstico puede ser establecido también por pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra VZV.

El aislamiento viral se puede realizar a partir de líquido vesicular de la lesión e inoculación en fibroblastos pulmonares de embrión humano, sin embargo el efecto citopático es poco evidente y demasiado lento (más de dos semanas).

1.4.3.- EPSTEIN-BARR VIRUS:

El virus de Epstein-Bar (EBV) se replica en células epiteliales de nasofaringe y glándulas salivales, especialmente las parótidas, produciendo lisis celular y liberando miles de partículas infecciosas a la saliva. Los linfocitos B se infiltran en el tejido linfático de la mucosa orofaríngea y pueden ser susceptible de infectarse, pero generalmente estas células no son permisivas.

La infección por EBV presenta principalmente las siguientes tres manifestaciones clínicas : mononucleosis infecciosa (fiebre glandular), infección en pacientes inmunocomprometidos, el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo. De estas sólo la primera está relacionada con enfermedad respiratoria aguda.

La mononucleosis infecciosa en infantes es asintomática, sin embargo, llega a afectar a escolares, como sucede en países desarrollados, presentado un periodo de incubación de 4 a 7 semanas, iniciando la sintomatología con dolor de cabeza, malestar generalizado y fatiga. Posteriormente se presenta fiebre, faringitis y linfadenopatía generalizada. La fiebre es alta y fluctuante, y la faringitis se caracteriza por la presencia de un material exudativo proveniente de las tonsilas de color blanco o gris con mal olor y puede a veces ser tan severo que obstruya las vías respiratorias. Se puede presentar esplenomegalia y los valores de funcionamiento hepático se ven alterados.

El diagnóstico de laboratorio incluye: conteo diferencial de leucocitos, pruebas serológicas como el ELISA. El aislamiento viral es poco empleado debido a que las líneas celulares conocidas son poco permisivas a este virus. El único método de propagación de EBV in vitro en secreciones orofaríngeas o leucocitos de pacientes infectados, para inocular linfocitos de cordón umbilical, se busca demostrar la inmortalización de los linfocitos de cordón umbilical y la posterior producción de una línea celular linfoblastoide,

en la cual se puede detectar la presencia de antígeno de EBV empleando anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína.

1.5.- Familia PICORNAVIRIDAE

Los miembros de esta familia tienen por genoma una molécula de RNA de cadena sencilla de polaridad negativa.

La familia picornaviridae está dividida en cinco géneros, tres de los cuales Enterovirus, Rhinovirus y Hepatovirus son patógenos para el humano. Los Enterovirus y Hepatovirus afectan a tracto gastrointestinal, y muestran alta resistencia a pH ácido, sales biliares y enzimas proteolíticas. Los Enterovirus pueden llegar a afectar tracto respiratorio.

1.5.1.- ENTEROVIRUS (VIRUS COXSAQUIE) :

Para muchos enterovirus la vía de entrada en el humano es la digestiva, y se replican tanto en garganta como en tracto intestinal, aunque son eliminados principalmente en heces más que en secreciones respiratorias. Se desconoce la vía de diseminación de los enterovirus hacia los otros órganos a los que afectan y se sabe poco acerca de los factores que determinan su tropismo. El período de incubación para infecciones sistémicas es de una a dos semanas, y para afecciones respiratorias es de un día.

La enfermedad respiratoria no está catalogada como una de las principales causas de enfermedad respiratoria pero puede producir una gama de resfriados febriles y dolores de garganta durante epidemias en verano. Este padecimiento es uno de los denominados "Enfermedad Febril No Diferenciada".

El diagnóstico se puede hacer por medio del aislamiento viral en líneas celulares provenientes de pulmón, de embrión (HDF) o de feto de humano (HEL). Las muestras para el aislamiento viral incluyen las heces y aspirados o lavados de garganta. En algunas enfermedades puede ser aislado directamente de ojo, fluido vesicular, orina, líquidos cefalo raquídeo, sangre, corazón y cerebro. El efecto citopático incluye retracción celular, aumento de la refracción de la luz (células refringentes), granularidad citoplásmica y picnosis nuclear. El efecto citopático causado por estos virus es de lento desarrollo.

1.5.2.- RHINOVIRUS :

Se ha calculado que cerca del 50% de los resfriados comunes son producidos por los Rhinovirus. La infección por Rhinovirus está localizada en la parte superior del tracto respiratorio, debido a su predilección de replicación a 33°C, sin embargo, ocasionalmente puede afectar el tracto respiratorio inferior. El período de incubación es muy corto, de 2 a 3 días, posteriores a los cuales se presenta inflamación, edematización y abundante exudación del tracto respiratorio superior que persiste por pocos días. La enfermedad por Rhinovirus puede complicarse con otros virus o con bacterias, produciendo así daño en el tracto respiratorio inferior.

En países nórdicos, la infección por Rhinovirus ocurre a lo largo de todo el año, con picos en otoño e invierno. Tres o cuatro serotipos diferentes de Rhinovirus circulan simultáneamente en una misma comunidad, apareciendo otros en el siguiente año. Los niños de edad preescolar son los más susceptibles a casi todos los serotipos, y son los responsables de transmitir el Rhinovirus en el núcleo de las familias produciendo en ellas la enfermedad en un 50% de los casos a 2 ó 5 días después de la llegada del virus. El virus se encuentra en el fluido nasal acuoso por más de 3 días. La transmisión es vía aerosoles o fomites.

El diagnóstico se hace generalmente de forma clínica y pocas veces se requiere del diagnóstico de laboratorio. El aislamiento viral se hace en líneas celulares derivadas

de fibroblasto de pulmón de embrión humano como la MRC-5 o la WI-38. Sin embargo, resulta difícil debido a que éste virus produce poco efecto citopático y de forma muy lenta. Un método más sencillo es la demostración de la presencia de antígeno viral en las secreciones nasales, por medio de ensayos inmunoenzimáticos.

1.6.- Familia CORONAVIRIDAE

Se les denomina así a los coronavirus debido a la apariencia en forma de corona que presentan sus peplómeros. Son virus con un genoma compuesto de una molécula de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva.

La familia Coronaviridae incluye dos géneros patógenos para el humano, los Coronavirus y los Torovirus. Los Coronavirus tienen dos serotipos que causan enfermedad respiratoria el HCV-229E y el HCV-OC43. Los Torovirus se han relacionado principalmente con enfermedades gastrointestinales.

1.6.1.- CORONAVIRUS :

La infección típica por Coronavirus en el humano es un resfriado marcado por descarga nasal y malestar generalizado, tos y dolor de garganta, con nula o poca fiebre. La enfermedad dura una semana sin consecuencias graves.

La infección por Coronavirus puede ocasionalmente producir ataques de estornudos en niños asintomáticos, o exacerbación de bronquitis crónica.

El virus permanece localizado en el epitelio respiratorio superior y produce una respuesta inmune pobre generalmente no afecta tracto respiratorio inferior, sólo en los casos complicados con bacterias u otros virus.

El diagnóstico por aislamiento, se realiza en líneas celulares de fibroblastos de pulmón de embrión humano. Una semana posterior a la inoculación se observan pequeños focos de células granulosas que dan la apariencia de "sucias" o "polvosas", y progresa hasta observarse cierta vacuolación antes de que se desprendan las células.

Dos métodos actualmente empleados para la demostración directa de antígenos de coronavirus en aspirados o lavados nasofaríngeos, son los ensayos inmunoenzimáticos e inmunofluorescencia.

1.7.- TÉCNICAS EMPLEADAS EN DIFERENTES LABORATORIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LOS ALGUNOS VIRUS RESPIRATORIOS

En la enfermedad aguda del tracto respiratorio inferior, el diagnóstico clínico no permite diferenciar entre los agentes etiológicos posiblemente involucrados; esto debido a la similitud clínica de la enfermedad. Por lo tanto se requiere del diagnóstico de laboratorio, empleando para esto, técnicas adecuadas para cada uno de los posibles agentes involucrados.

En el caso de infecciones producidas por virus, como ya se mencionó, existen diferentes técnicas diagnósticas y el empleo de cada una de ellas dependerá del tipo de virus y de los recursos con los que cuente el laboratorio que las realice. Debido a la extrema labilidad de muchos virus respiratorios, se han reportado mejores resultados en el aislamiento, cuando se emplean medios de transporte que contengan alguna proteína estabilizadora, como por ejemplo, la albúmina (74) y también cuando la muestra es inoculada inmediatamente en una línea celular susceptible (29, 75, 76).

A continuación se resume los métodos de elección para la identificación y diagnóstico de los diferentes agentes virales asociados a EATRI (Tabla 4).

TABLA 4.- MÉTODOS DE ELECCIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE AGENTES VIRALES ASOCIADOS CON EATRI.

VIRUS ESTUDIADO	TÉCNICA EMPLEADA
Virus de Influenza	Aislamiento viral en embriones de pollo por vía amniótica y alantoidea para el aislamiento del virus de Influenza. Posteriormente se realizó la Hemaglutinación.
Virus de Parainfluenza	Aislamiento viral en línea celular VERO y posteriormente la inmunofluorescencia para detectar antígenos del virus de Parainfluenza. Finalmente tipificación por inmunofluorescencia de los positivos (tipos 1, 2 o 3).
Adenovirus	Aislamiento viral en línea celular VERO y posteriormente la inmunofluorescencia para detectar antígenos del Adenovirus
Virus Herpes Simplex	Aislamiento del virus de Herpes simplex en embrión de pollo por vía de la membrana corioalantoidea. Posteriormente se identificó la presencia de placas y/o vesículas en membrana corioalantoidea y finalmente, a partir de estas, se realizó la Inmunofluorescencia para detectar HSV (Tipos 1 y 2).
Virus Respiratorio Sincitial	Ensayo Inmunoenzimático para la detección de antígeno. Aislamiento viral y comprobación por RT-PCR

2. - JUSTIFICACIÓN:

En diferentes países se han hecho estudios epidemiológicos que indican a los principales agentes involucrados en la EATRI, ya sea empleando ensayos inmunoenzimáticos para detección del antígeno (77, 78) o la tecnología del PCR y la hibridación (79).

En México existen pocos estudios epidemiológicos de la enfermedad respiratoria aguda de origen viral. Algunos trabajos anteriores al presente, realizados por diferentes autores, se basan en estudios seroepidemiológicos para la detección de anticuerpos contra diferentes virus respiratorios. En algunos de estos no se consideró el nivel del tracto respiratorio involucrado en la enfermedad (80). En otro trabajo la población estudiada era demasiado heterogénea, incluía individuos desde recién nacidos hasta adultos, y la metodología empleada para el aislamiento viral no fue la misma para todas las muestras (81). Otros estudios seroepidemiológicos (82, 83) se realizaron para detectar anticuerpos contra RSV, PIV tipos 1, 2 y 3, Virus Epstein-Barr, Citomegalovirus, *Mycoplasma*, *Streptococcus β hemolyticum A* y *Toxoplasma gondii*, a partir de una población de individuos menores de 17 años aleatoriamente seleccionada y sin cuadro clínico de enfermedad respiratoria. En un trabajo que abarcó 3 años (1987 - 1989) se realizó conjuntamente el aislamiento bacteriológico y el virológico (84), sin embargo la identificación viral se hizo simplemente por observación de ECP y correlacionada con pruebas serológicas a partir de suero del paciente. En pacientes con crisis asmáticas se ha correlacionado su padecimiento con la detección por aislamiento de RSV y el PIV (85). Otro estudio reporta aislamiento e la identificación por IFA del RSV en un brote en la unidad de cuidados intensivos neonatales del Hospital Infantil de México (86). Otros autores aislaron y corroboraron por virus neutralización al RSV a partir de infantes (de 0 a 1 año) hospitalizados con enfermedad respiratoria aguda, además se tipificó al RSV por medio de mAb, siendo el subgrupo A el más frecuente.

En México no existen reportes de aislamientos virales en enfermedad respiratoria aguda exclusiva del tracto respiratorio inferior en pacientes hospitalizados menores de diez años de edad.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal determinar la presencia de virus respiratorios involucrados en la enfermedad respiratoria aguda exclusiva del tracto respiratorio inferior, en una población determinada compuesta de pacientes hospitalizados menores de 10 años de edad, con cuadro clínico de la enfermedad. Los virus estudiados fueron: Virus Respiratorio Sincitial, Virus de Parainfluenza tipos 1, 2 y 3, Virus de Influenza, Adenovirus y Herpesvirus tipos 1 y 2.

Para tal motivo se estudió una población de 91 niños menores de diez años de edad y hospitalizados en la Ciudad de México, y con cuadro clínico de enfermedad aguda del tracto respiratorio inferior (EATRI).

3. - OBJETIVO GENERAL

Aislar virus asociados a enfermedad aguda del tracto respiratorio inferior, a partir de muestras de pacientes hospitalizados menores de diez años.

3.1. - OBJETIVOS PARTICULARES

1. Recolectar muestras de aspirados y lavados nasofaríngeos de niños menores de diez años de edad con enfermedad aguda del tracto respiratorio inferior en un periodo de 12 meses.
2. Determinar los factores de riesgo en la enfermedad respiratoria aguda
3. Estudiar los principales agentes infecciosos virales asociados a enfermedad aguda del tracto respiratorio inferior en niños menores de diez años (RSV, PIV tipos 1, 2 y 3, Influenza, Adenovirus y HSV tipos 1 y 2).

3.2. - METAS

1. Obtener de los pacientes muestras de aspirado y lavado nasofaríngeo
2. Determinar la presencia de virus infecciosos de RSV, Parainfluenza (tipos 1, 2 y 3), Influenza, Adenovirus y Herpes simplex (tipos 1 y 2) en las muestras
3. Correlacionar la presencia de daño en línea celular con la detección de virus.
4. Clasificar a los pacientes en estratos socioeconómicos y determinar la importancia que juegan los diferentes factores de riesgo en la presentación de la enfermedad respiratoria aguda.

3.3. - HIPÓTESIS

Las infecciones del tracto respiratorio inferior de origen viral son la principal causa de cuadros de bronquitis y neumonías en niños menores de diez años.

- * Auscultación donde se aprecia afección a parénquima pulmonar, inflamación con depósito de trasudado o exudado en los alvéolos. Signología de condensación pulmonar, como es la matidez a la percusión del área afectada y aumento en la transmisión de la voz
- * Estertores crepitantes (de fina burbuja)

4. 1. 4. - FACTORES DE RIESGO

El factor de riesgo considerado fue la convivencia con personas con enfermedad respiratoria aguda o crónica

4. 2. - COLECCIÓN DE MUESTRAS CLÍNICAS

4. 2.1. - METODOLOGÍA DE ASPIRADO NASOFARÍNGEO:

La toma de la muestra se realizó en los hospitales "DR. GEA GONZALEZ, S.S.A" y "VENADOS, IMMS" y previamente se tuvo preparado todo el material, así como el aparato de succión con la trampa / frasco conteniendo al medio de transporte frío (4° C). El procedimiento fue el siguiente:

1. - Usando guantes de látex y con un algodón humedecido con alcohol al 70%, se limpió el área de la piel cercana a las fosas nasales
2. - Se introdujo la punta estéril del succionador (Figura 1) hasta el fondo de la nariz, y conforme se fue succionando se retiró suavemente la punta hasta sacarla. La misma operación se realizó en la otra fosa nasal con previo cambio de la punta.
3. - En los casos en donde no se obtuvo suficiente muestra en el aspirado se procedió a introducir en una de las fosas nasales un volumen de 0.5 a 1.0 mL de solución salina fría y estéril con una jeringa estéril y sin aguja, y se intentó la succión de nuevo.
4. - Se retiraron la trampa y / o el frasco conteniendo a la muestra con el medio de transporte. Se tuvo cuidado de que no se contaminara la muestra, y posteriormente se cerró perfectamente el recipiente conteniendo la muestra.
5. - Se rotuló a lápiz la etiqueta (Figura 2) de la trampa y / o el frasco que contenía la muestra.
6. - La muestra se mantuvo durante el transporte a 4°C dentro de la caja de unicel con hielo frapé hasta llegar al Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina (UNAM) para ser procesada.

4.2.2. - METODOLOGÍA DEL LAVADO NASOFARÍNGEO:

La toma de la muestra se realizó en el INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA y previamente se tuvo preparado todo el material. El procedimiento fue el siguiente:

1. - Usando de guantes de látex y con un algodón humedecido con alcohol al 70%, se limpió el área de la piel cercana a las fosas nasales
2. - Se introdujo al cotonete estéril hasta el fondo de la nariz, de forma muy suave y procurando no lastimar, (Figura 3), y antes de retirarlo se realizaron pequeños giros, para obtener la mayor cantidad de material posible. Se retiró con cuidado sin dañar la mucosa nasal.
3. - Se colocó al cotonete en el frasco conteniendo el medio de transporte y posteriormente se cerró perfectamente el recipiente conteniendo la muestra.
4. - Se rotuló a lápiz la etiqueta (Figura 2) de la trampa y / o el frasco que contenía la muestra.
5. - La muestra se mantuvo a 4°C dentro de la caja de unicel con hielo frapé hasta llegar al Laboratorio de Virus Respiratorios del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) para ser procesada lo más pronto posible.

4. 3. - CLARIFICACIÓN DE LA MUESTRA

La clarificación de la muestra se realizó de la siguiente forma:

1. - Se colocó la muestra y en un tubo de centrifuga de 15 mL

4. - MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se describe la metodología seguida en el presente trabajo y de igual forma se citan los materiales requeridos, para tal efecto. Dicha metodología se encuentra además, resumida en los diagramas de flujo 1 y 2. Para información detallada de los materiales ver apéndice C.

4.1 ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

A los familiares se les aplicó el cuestionario que aparece en el Apéndice A. La información que se obtuvo con este cuestionarios fue: Grupo etario, el diagnóstico clínico del paciente, estrato socioeconómico al que pertenecía y factor de riesgo.

4. 1. 1. - CLASIFICACIÓN POR GRUPOS ETARIOS

Las edades de la población se agruparon, según la clasificación internacional (1, 2, 3), en los siguientes tres grupos etarios: Menores de un año (o Infantes), de uno a menores de cuatro años (o Preescolares) y de cuatro a catorce años (o Escolares).

4. 1. 2. - ESTRATO SOCIOECONÓMICO

La población estudiada pertenecía a diferentes niveles socioeconómicos, desde personas que vivían en albergues de beneficencia en donde su gasto mensual de alimentación era de cero salarios mínimos, hasta personas que invertían más de tres salarios mínimos. La clasificación de los estratos económicos se hizo con base al número de salarios mínimos que se destinaban a la alimentación mensualmente. La población estudiada se agrupó de la siguiente forma:

- Grupo A. - De 0 a menos de 1 salario mínimo
- Grupo B. - De 1 a menos de 2 salarios mínimos
- Grupo C. - De 2 a menos de 3 salarios mínimos
- Grupo D. - De 3 en adelante.

4. 1. 3. - DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad se clasificaron en bronquitis, bronquiolitis y neumonía. Lo anterior fue realizado por el médico responsable, por medio de la exploración y auscultación del paciente y además respondió la parte clínica del cuestionario.

Los datos del cuestionario que sirvieron para definir el cuadro clínico fueron los siguientes (90, 91, 92, 93, 94, 95):

BRONQUITIS :

- * Tos en accesos con expectoración mucoide
- * Hipertermia
- * Signología febril (cefalea, calosfrios, ataque al estado general)
- * Auscultación sugestiva de afección bronquial sola o acompañada de croup (Laringotraqueobronquitis).

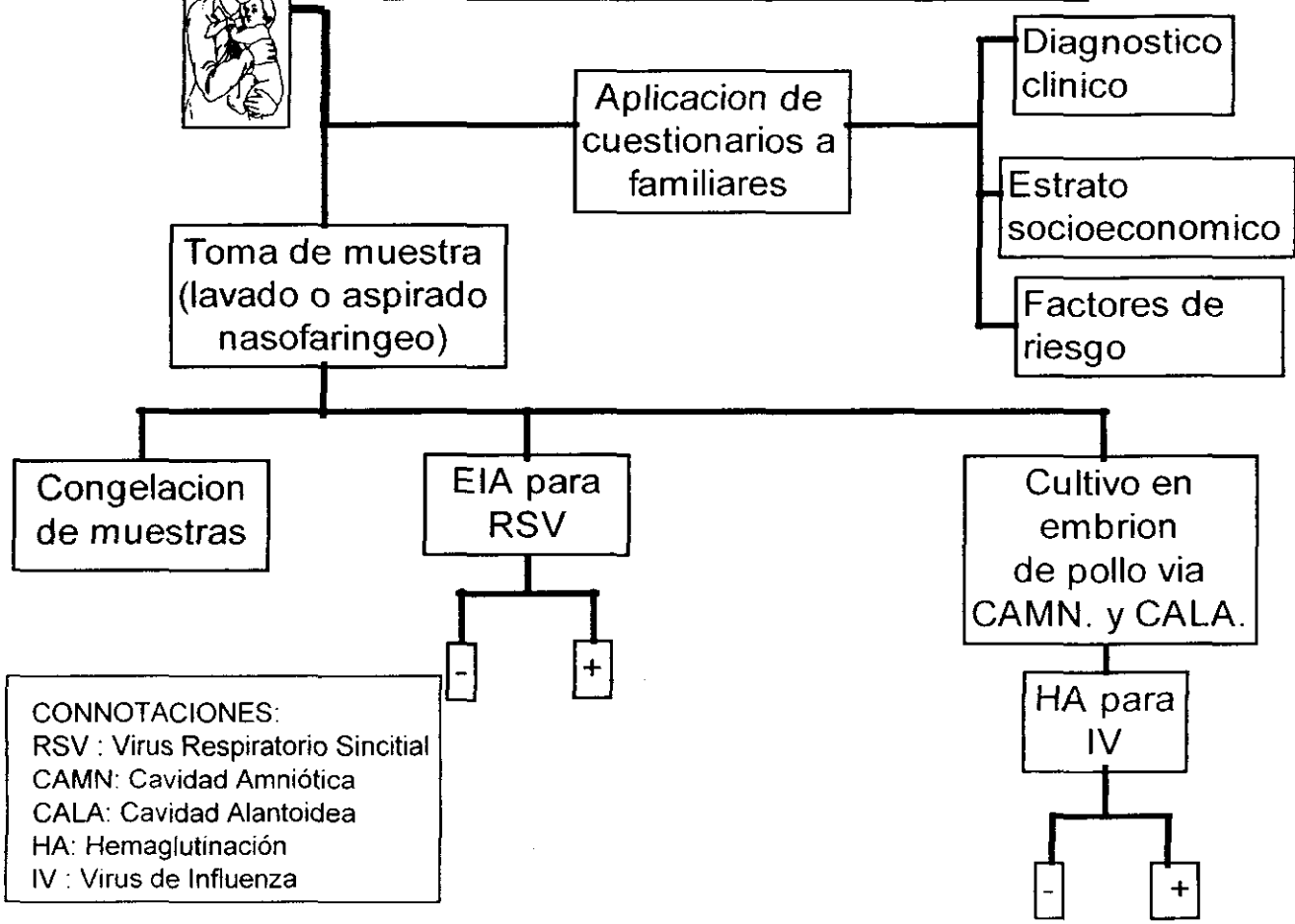
BRONQUIOLITIS :

- * Inicio en vías respiratorias altas y progreso a tracto inferior
- * Insuficiencia respiratoria aguda
- * Signología febril
- * Auscultación donde se percibe estertores bronquiales sin siblancia

NEUMONÍA :

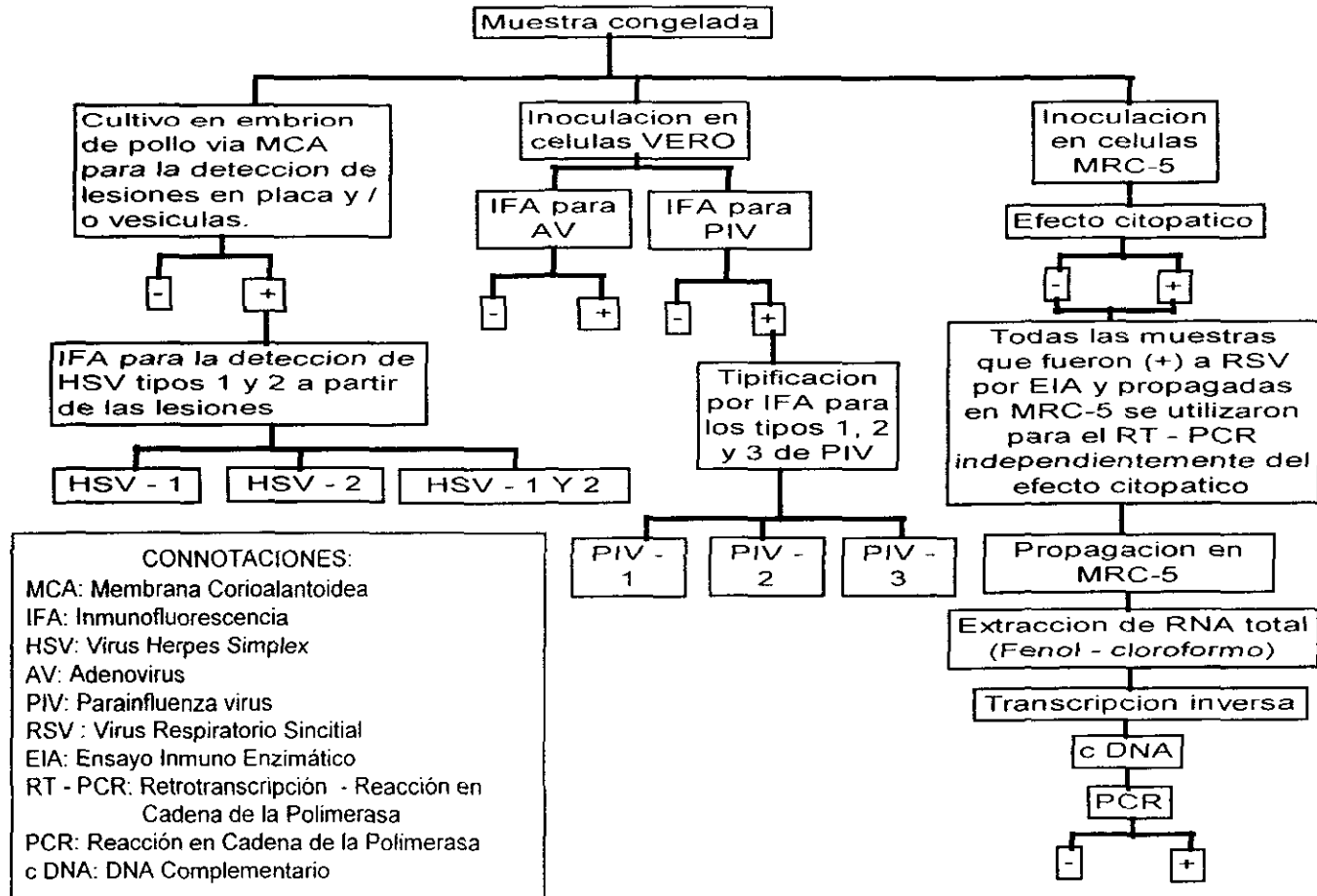
- * Tos productiva con expectoración mucopurulenta
- * Signología de dolor torácico
- * Ataque al estado general

DIAGRAMA DE FLUJO (1)



CONNOTACIONES:
RSV : Virus Respiratorio Sincitial
CAMN: Cavidad Amniótica
CALA: Cavidad Alantoidea
HA: Hemaglutinación
IV : Virus de Influenza

DIAGRAMA DE FLUJO (2)



- * Auscultación donde se aprecia afección a parénquima pulmonar, inflamación con depósito de trasudado o exudado en los alvéolos. Signología de condensación pulmonar, como es la matidez a la percusión del área afectada y aumento en la transmisión de la voz
- * Estertores crepitantes (de fina burbuja)

4. 1. 4. - FACTORES DE RIESGO

El factor de riesgo considerado fue la convivencia con personas con enfermedad respiratoria aguda o crónica

4. 2. - COLECCIÓN DE MUESTRAS CLÍNICAS

4. 2.1. - METODOLOGÍA DE ASPIRADO NASOFARÍNGEO:

La toma de la muestra se realizó en los hospitales "DR. GEA GONZALEZ, S.S.A" y "VENADOS, IMMS" y previamente se tuvo preparado todo el material, así como el aparato de succión con la trampa / frasco conteniendo al medio de transporte frío (4° C). El procedimiento fue el siguiente:

1. - Usando guantes de látex y con un algodón humedecido con alcohol al 70%, se limpió el área de la piel cercana a las fosas nasales
2. - Se introdujo la punta estéril del succionador (Figura 1) hasta el fondo de la nariz, y conforme se fue succionando se retiró suavemente la punta hasta sacarla. La misma operación se realizó en la otra fosa nasal con previo cambio de la punta.
3. - En los casos en donde no se obtuvo suficiente muestra en el aspirado se procedió a introducir en una de las fosas nasales un volumen de 0.5 a 1.0 mL de solución salina fría y estéril con una jeringa estéril y sin aguja, y se intentó la succión de nuevo.
4. - Se retiraron la trampa y / o el frasco conteniendo a la muestra con el medio de transporte. Se tuvo cuidado de que no se contaminara la muestra, y posteriormente se cerró perfectamente el recipiente conteniendo la muestra.
5. - Se rotuló a lápiz la etiqueta (Figura 2) de la trampa y / o el frasco que contenía la muestra.
6. - La muestra se mantuvo durante el transporte a 4°C dentro de la caja de unicel con hielo frapé hasta llegar al Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina (UNAM) para ser procesada.

4.2.2. - METODOLOGÍA DEL LAVADO NASOFARÍNGEO:

La toma de la muestra se realizó en el INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA y previamente se tuvo preparado todo el material. El procedimiento fue el siguiente:

1. - Usando de guantes de látex y con un algodón humedecido con alcohol al 70%, se limpió el área de la piel cercana a las fosas nasales
2. - Se introdujo al cotonete estéril hasta el fondo de la nariz, de forma muy suave y procurando no lastimar, (Figura 3), y antes de retirarlo se realizaron pequeños giros, para obtener la mayor cantidad de material posible. Se retiró con cuidado sin dañar la mucosa nasal.
3. - Se colocó al cotonete en el frasco conteniendo el medio de transporte y posteriormente se cerró perfectamente el recipiente conteniendo la muestra.
4. - Se rotuló a lápiz la etiqueta (Figura 2) de la trampa y / o el frasco que contenía la muestra.
5. - La muestra se mantuvo a 4°C dentro de la caja de unicel con hielo frapé hasta llegar al Laboratorio de Virus Respiratorios del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) para ser procesada lo más pronto posible.

4. 3. - CLARIFICACIÓN DE LA MUESTRA

La clarificación de la muestra se realizó de la siguiente forma:

1. - Se colocó la muestra y en un tubo de centrifuga de 15 mL

2. - Se centrifugó a 800 o 1000 r.p.m. / 10 minutos a 4°C
3. - Se eliminó el moco que generalmente se quedaba tanto en la parte del fondo (algunas veces acompañado de poco detritus celular) como en la superficie (presente como hilos delgados)
4. - La muestra clarificada fue utilizada para el ensayo inmunoenzimático para la detección de RSV, y para la inoculación en embrión de pollo para el aislamiento del virus de la influenza.

NOTA: En lo subsecuente a la muestra clarificada se le denominará muestra fresca

4. 4. - CONGELACIÓN DE MUESTRAS

Una vez ya clarificada la muestra se, procedió bajo condiciones de esterilidad, a formar cuatro alícuotas de 0.5 mL perfectamente identificadas, después se le adicionó sulfato de magnesio a una concentración final de 0.01M y finalmente se congeló (24, 96).

Posteriormente las alícuotas de las muestras congeladas se iban descongelando conforme se iban empleando. Estas sirvieron para realizar la infección a embrión de pollo para el aislamiento de virus de herpes y en cultivo celular para la detección de adenovirus, parainfluenza virus y virus respiratorio sincitial; como más adelante se detalla.

NOTA: En lo subsecuente a este tipo de muestra, pese a que se empleó descongelada, se le denominará muestras congelada.

4. 5. - ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO EN FASE SÓLIDA PARA LA DETECCIÓN DE R.S.V.

A partir de cada una de las muestras frescas (sin congelar) se corrió el ensayo inmunoenzimático para la detección de antígeno de RSV, siguiendo los pasos del kit " *Abbott Testpack ® RSV* ".

4. 6. - INOCULACIÓN A EMBRIÓN DE POLLO VÍA AMNIÓTICA Y ALANTOIDEA PARA EL AISLAMIENTO DEL VIRUS DE INFLUENZA.

A partir de cada una de las muestras frescas (sin congelar) se inocularon dos huevos embrionados de pollo de la siguientes forma (97):

1. - Se limpió y se desinfectó el cascarón (Figura 4)
2. - Se marcó una cruz con lápiz en la punta ovoide del huevo
3. - Se perforó con una aguja hipodérmica del No. 16 estéril
4. - Se cargó 400 µl de muestra fresca con una jeringa hipodérmica de 1 mL. Se introdujo por la perforación hasta llegar a la cavidad alantoidea (Figura 4)
5. - Con ayuda del ovoscopio se localizó al embrión y sus membranas. Después se depositó en la cavidad amniótica 200µl de la muestra, procurando dirigir la aguja hacia el ojo del embrión, sin lesionarlo.
6. - Se fue sacando cuidadosamente la aguja hasta llegar a la membrana alantoidea, entonces se depositaron los otros 200 µl de la muestra (Figura 4)
7. - Se retiró toda la aguja con cuidado e inmediatamente después se selló con cera o barniz de uñas el orificio para evitar contaminación
8. - Se incubaron los huevos en un incubador húmedo a 37°C / 3 días
9. - Después de la incubación los huevos se colocaron a -20°C / 30 minutos para que muriera el embrión
10. - Se limpió y desinfectó el cascarón en el área del saco aéreo
11. - Se marcar con lápiz el saco aéreo
12. - Se recortó con tijeras estériles o flameadas el cascarón en esa zona
13. - Se cortó y se separó la membrana corioalantoidea

14. - Se colectaron por separado con jeringas de 10 mL, los líquidos alantoidé y amniótico. Se puncionó la cavidad alantoidea y se extrajo el líquido. Posteriormente se inclinó el huevo de tal forma que la cabeza no estorbara y se pudiera aspirar el líquido del saco amniótico.

15. - Finalmente los líquidos alantoidé y amniótico se sometieron a la técnica de hemaglutinación empleando eritrocitos de gallina al 5% en PBS para la detección del virus de influenza.

4. 7. - HEMAGLUTINACIÓN PARA DETECTAR VIRUS DE INFLUENZA

1. - Se colocan 25 µl de PBS en cada uno de los pozos

2. - Se trabajaron dos filas de pozos (horizontales o letras) por cada muestra (tanto de líquido alantoidé como del amniótico), y cada una de las diluciones correspondió a cada una de las columnas (vertical o números)

3. - En el primer pozo de la placa (A-1) se colocaron 50 µl de la muestra problema, se mezclaron bien y se tomaron 25 µl que fueron transferidos al siguiente pozo (A-2), este procedimiento se continuó hasta el último pozo (A-12) donde se adicionaron los últimos 25 µl y después de mezclar bien se eliminaron 25 µl.

4. - Se adicionaron a todos los pozos 25 µl de la solución de eritrocitos (5%)

5. - Se incubó la placa a 22°C / 39 minutos

6. - Los resultados se leyeron de la siguiente forma: En la muestra positiva se esperaba encontrar el fenómeno de aglutinación donde no hay precipitación de los eritrocitos; y en los resultados negativos se buscó precipitado de eritrocitos formando un botón rojo al fondo.

Se consideraría el título viral como la dilución más alta de la muestra donde se hubiera observado total o parcial aglutinación de eritrocitos. Esta dilución se dice que contiene una unidad Hemaglutinante de antígeno viral.

7. - En caso de ser positivos se procedería a tipificar el Influenzavirus involucrado por medio de la Inhibición de la Hemaglutinación. Esto no fue necesario ya que todas las muestras resultaron negativas.

4. 8. - PROPAGACIÓN DE CÉLULAS

Las líneas celulares MRC-5 y VERO fueron crecidas en D-MEM con 10% de SFB. Las MRC-5 hasta la generación 38 y las VERO hasta la generación 169. La línea celular HEp-2 se creció en medio MEM con 6% de SFB.

4. 9. - INFECCIÓN A CULTIVO CELULAR (MRC-5) PARA VER EFECTO CITOPÁTICO

Se infectaron cultivos celulares (MRC-5 generación 38) en placas de seis pozos, con las muestras "congeladas" para dar pases y tratar de observar efecto citopático. Las muestras que iban mostrando efecto citopático o muerte celular se iban pasando a botellas de 25 cm².

1. - Cuando las monocapas de MRC-5 presentaba confluencia del 90 al 100% fueron infectadas con las muestras de la siguiente forma.

2. - Se retiró el medio de crecimiento y se agregó 1 mL de medio de mantenimiento (al 2% de SFB)

3. - Se inocularon con 200 µl de la muestra

4. - Se incubó por 2 Hrs a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO₂

5. - Se retiró el inóculo y se agregaron 5 mL de medio de mantenimiento.

4. 10. - INFECCIÓN DE CÉLULAS VERO PARA EL AISLAMIENTO DE PARAINFLUENZA Y ADENOVIRUS.

1. - En placas de 48 pozos, se propagaron células VERO generación 169 (2×10^4 células / pozo) con 500µl por pozo de DMEM con 10% de SFB como medio de crecimiento
2. - Cuando la monocapa estaba confluyente en un 90 a 100% el medio de crecimiento fue sustituido por 50 µl de inóculo (muestra congelada)
3. - Se dejó incubando por 2 Hrs., posteriormente el inóculo fue retirado y se le adicionó 500µl medio de mantenimiento (al 2% de SFB)
4. - Se cosechó cuando se observó efecto citopático y en los casos donde no se observó se cosechó en un plazo de 21 días.

4. 11. - INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS DE PARAINFLUENZA COMO GRUPO, PARA LA TIPIFICACIÓN DE LOS TRES TIPOS (1, 2 Y 3), E INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ADENOVIRUS.

1. - Se cosecharon las células VERO infectadas con las muestras cuando la monocapa presentó daño celular o en caso de no presentarlo se cosecharon hasta los 21 días. La forma de cosecha consistió solamente en raspado de la monocapa dentro del medio de mantenimiento, sin utilización de tripsina ni verseno, empleando para esto, una palita o gendarme estéril.
2. - Se centrifugaron las células a 1,500 r.p.m. / 10 minutos / a temperatura ambiente
3. - Se separó el sobrenadante y se guardó a -70°C
4. - Se lavó el botón de células con PBS
5. - Se centrifugó nuevamente a 1,500 r.p.m. / 10 minutos / a temperatura ambiente
6. - Se eliminó el sobrenadante
7. - Al botón celular se mantuvo en un volumen mínimo (de 75 a 100 µl)
8. - Se colocó 25 µl de la suspensión de células en cada uno de dos espacios del porta objetos
9. - Se dejó secar a temperatura ambiente
10. - Se fijó con acetona fría (4°C) por 10 minutos
11. - Se dejó secar a temperatura ambiente
12. - Se lavó nuevamente con PBS
13. - Se adicionaron :
 - A). - 25 µl de la mezcla de anticuerpos monoclonales (mAb) anti parainfluenza tipos 1, 2 y 3 para detectar al virus de Parainfluenza como grupo.
 - B). - En los casos positivos a PIV (grupo) se procedió a tipificarlos, empleando 25 µl de mAb de cada uno de los tipos de PIV (1, 2 y 3) por separado.
 - C). - Colateralmente se procesaron las muestras para la detección de adenovirus donde se emplearon anticuerpos monoclonales contra la proteína hexón común a todos los adenovirus humanos.
14. - Se incubó 15 minutos a 37°C en una cámara húmeda
15. - Se lavó tres veces con PBS-Tween (Ver apéndice A)
16. - Se adicionaron 50 µl de ioduro de propidio a una concentración final de 1mg / mL
17. - Tres lavados con PBS-Tween (Ver apéndice A)
18. - Se adicionó una 25 µl de líquido de montaje y se colocó el cubre objetos
19. - Las laminillas se observaron inmediatamente después de haberse preparado. Se empleó microscopio de fluorescencia tanto con luz visible como con luz ultravioleta a 40X, 100X y 200X de aumento.

4. 12. - INOCULACIÓN A EMBRIÓN DE POLLO VÍA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA PARA EL AISLAMIENTO DEL VIRUS DE HERPES SIMPLEX.

Este procedimiento se hace por duplicado para cada muestra (97)

1. - Se limpió y desinfectó el cascarón (Figura 5)
2. - Se observó al ovoscopio para verificar que el embrión se encontraba vivo e identificar las estructuras del huevo
3. - Se marcó con lápiz una línea alrededor del perímetro de la cámara de aire del huevo y se marcó en el centro de la cámara una X
4. - Se identificó a un lado de la cámara de aire con el número de la muestra
5. - Se buscó una zona poco irrigada en la membrana corioalantoidea y se marcó con una X
6. - Se perforó con una aguja hipodérmica estéril del No. 18 en las dos marcas, y se tuvo cuidado de no perforar las membranas (Figura 5)
7. - Con una bombilla de látex se succionó desde la perforación de la cámara de aire para crear un nuevo espacio entre el cascarón y la membrana corioalantoidea (en el sitio de punción)
8. - Se cargaron 200 μ l de muestra "congelada" en una jeringa hipodérmica de 1 mL y se introdujo por el orificio que da a la membrana corioalantoidea sin llegar a la membrana (Figura 5)
9. - Después se depositó en la nueva cámara de aire 100 μ l de la muestra por cada embrión
10. - Se sacó cuidadosamente la aguja
11. - Inmediatamente después se selló con cera o barniz de uñas los dos orificios para evitar contaminación
12. - Se incubaron los huevos en un incubador húmedo a 37°C / 3 días
13. - Después de la incubación se colocaron los huevos a -20°C / 30 minutos para que muera el embrión
14. - A las 72 Hrs después se cosecharon las membranas
15. - Se recortó con tijeras estériles o flameadas en la punta ápice del cascarón
16. - Se separaron y eliminaron las membranas amniótica y alantoidea, así como el embrión; y se colectó solamente la membrana corioalantoidea
17. - Finalmente se realizó la exploración en microscopio estereoscópico de las membranas para detectar la presencia de placas y / o vesículas de lesión sugestivas de Herpes

4. 13. - INMUNOFLOURESCENCIA DIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE HERPES SIMPLEX TIPOS 1 Y 2.

1. - Se cosecharon las membranas corioalantoideas provenientes de embriones infectados con las muestras a las 48 Hrs post-infección. La forma de cosecha consistió en tomar la placa y / o vesícula bajo condiciones de esterilidad.
2. - La lesión de la membrana corioalantoidea se extendió en cada uno de los pozos de un porta objetos y posteriormente se fijó con acetona fría (aproximadamente a 4 ° C) por 10 minutos
3. - Se dejó secar a temperatura ambiente
4. - Se lavó nuevamente con PBS
5. - A cada pozo se le adicionó 25 μ l de uno de los anticuerpos monoclonales ya sea anti HSV-1 o anti HSV-2 .
6. - Se incubaron durante 15 minutos a 37°C en una cámara húmeda
7. - Se les dieron tres lavados con PBS-Tween (Ver apéndice A)
8. - Se les adicionaron 50 μ l de Ioduro de propidio
9. - Se les dieron otros tres lavados con PBS-Tween (Ver apéndice A)

10. - Al porta objetos se les adicionaron 25 μ l de resina para montaje y se le colocó el cubre objetos

11. - Las laminillas se observaron inmediatamente después de haberse preparado. Se empleó microscopio de fluorescencia tanto con luz visible como con luz ultravioleta a 40X, 100X y 200X de aumento.

4. 14. - RT - PCR

A las muestras que dieron positivo a RSV por ensayo inmunoenzimático y que provenían del quinto pase, se les dió un último pase en células HEP-2 para su posterior extracción de RNA total. Se empleó esta línea celular debido a que en esta ya está establecida la técnica de RT-PCR para virus de referencia en el laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina, U.N.A.M., el protocolo de extracción de RNA que se siguió se basó en el descrito por Chomzaynsky y Sachi (98, 99, 100).

4. 14.1. - EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

1. - Separación de células de una caja de 25 cm² a las 48 Hrs post-infección.

2. - Se centrifugó a 14, 000 r.p.m. durante 30 segundos

3. - A las células obtenidas se les adicionó 250 μ l de solución D (Ver apéndice B)

4. - Se agregaron 500 μ l de fenol saturado en agua, 50 μ l de acetato de sodio 2M (pH4) y 100 μ l de cloroformo-alcohol isoamilico 25:1. Se agitó durante 10 segundos, posteriormente se centrifugó entre 10 y 15 minutos en la centrifuga Eppendorf a 15,000 r.p.m. a temperatura ambiente.

5. - Se obtuvo el sobrenadante y se adicionó 500 μ l de isopropanol frío. Se enfrió durante toda la noche a -70°C

6. - Se centrifugó a 15,000 durante diez minutos en la centrifuga Eppendorf

7. - Se lavó la pastilla con 200 μ l de etanol al 75% y se disgregó el precipitado con ayuda de la micropipeta

8. - Se centrifugó a 15,000 r.p.m. en Eppendorf durante diez minutos

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

10. - La pastilla se resuspendió en 20 μ l de TE (Ver apéndice B)

11. - Se guardó a -20°C

4. 14.2. - CUANTIFICACIÓN DE RNA TOTAL

1. - A partir de la suspensión el RNA (20 μ l) se hizo en un tubo aparte una dilución 1:200, es decir se tomaron 5 μ l y se le adicionaron 995 μ l de TE.

2. - Se leyó la densidad óptica en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm

3. - Después se multiplicó el valor obtenido de la densidad óptica por 200 que es el factor de dilución que se empleó para hacer la lectura.

4. - Debido a que se considera que una unidad de densidad óptica equivale a 40 mg de RNA, se emplea este valor como constante para conocer los mg de ácidos nucleicos que se tienen por mL. Lo cual se logra multiplicando 40 por el resultado obtenido en el punto No. 3.

5. - Luego se obtiene el valor en mg de RNA en 100 μ l

6. - Finalmente se obtiene el valor del volumen en μ l en el que esté contenida la cantidad en mg de RNA con la que se desea trabajar. En el presente estudio se trabajó con 6 mg de RNA por reacción.

4. 14.3. - TRANSCRIPCIÓN INVERSA (OBTENCIÓN DE cDNA)

1. - En un tubo Eppendorf de 0.65 mL se colocaron: 4 μ l de amortiguador de reacción (50mM tris HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 10 mM de DTT (Ditiotreitol), 3 mM MgCl₂), 2 mM de cada fosfato de

desoxirribonucleótido, 6 mg de RNA de células infectadas, 20 U de inhibidor de RNAsa y se agregaron 200 U de la enzima transcriptasa reversa. El volumen de reacción final fue llevado a 20 μ l y se incubó a 42°C por una hora. Este proceso fue realizado por la M. en C. Tirado Mendoza Rocio

4. 14. 4. - REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Al tubo de reacción anterior se le adicionó amortiguador de amplificación (50mM de KCl, 10mM de Tris HCl, 1.5 Mg Cl₂), 60 pM de cada iniciador (N1 y N2) 2.5 U de Taq DNA polimerasa, y se agregó agua -DEPC para un volumen final de 100 μ l.

La reacción de PCR consistió en un paso de desnaturalización previa de 99°C / 2:30 min, y cada ciclo se compuso de un periodo de desnaturalización de 94°C / 1 min, uno de alineación de 65°C / 1:30 y otro de polimerización de 72°C / 1min. Durante 35 ciclos con una extensión final de 72°C / 7 min. Este proceso fue realizado por la M. en C. Tirado Mendoza Rocio

4. 14. 5. - LECTURA DEL PCR

Se emplearon 6 μ g de producto de PCR por cada muestra y 1 μ g de marcadores de pesos moleculares por gel. La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1% con 2,5 μ l de bromuro de etidio, a 90v durante 1hr. Posteriormente el gel fue observado con luz ultravioleta en un transiluminador.

4. 15. – ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Debido a que los resultados obtenidos son variables de respuesta, se consideraron valores nominales, es decir no paramétricos, por lo tanto el tipo de análisis estadístico que se realizó fue la prueba de Ji-cuadrada.

5. - RESULTADOS

5.1. - BASE DE DATOS:

Los datos se muestran en la Tabla 6, y están organizados por columnas de la siguiente manera:

Muest.- Es el número progresivo de las muestras con forme se recolectaron

Sexo.- Sexo del paciente

Edad.- Edad del paciente

DxCl.- Manifestación clínica del paciente con enfermedad aguda del tracto respiratorio inferior. Bronquitis (B), Bronquiolitis (BO) o Neumonía (N).

CPE.- Presencia o no de efecto citopático (CPE)

RSV.- Positividad por ensayo inmunoenzimático al virus respiratorio sincitial (RSV)

IV.- Positividad por inmunofluorescencia al virus de Influenza (IV)

PIV.- Positividad por inmunofluorescencia al virus de Parainfluenza (PIV) indicando tipos 1, 2 o 3.

AV.- Positividad por inmunofluorescencia al Adenovirus (AV)

HSV.- Positividad a virus Herpes Simplex (HSV), indicando tipos 1 y/o 2

SM.- Como ya se mencionó en materiales y métodos la clasificación de los estratos económicos se hizo con base al número de salarios mínimos que se destinaban a la alimentación mensualmente. La población estudiada se agrupó de la siguiente forma:

Grupo A.- De 0 a menos de 1 salario mínimo

Grupo B.- De 1 a menos de 2 salarios mínimos

Grupo C.- De 2 a menos de 3 salarios mínimos

Grupo D.- De 3 en adelante.

MCA. - Lesión en membrana corioalantoidea (MCA)

5. 2. - MUESTREO:

La población considerada en el estudio fue de noventa y un infantes menores de edad hospitalizados con cuadro clínico de enfermedad aguda del tracto respiratorio inferior, durante el periodo de mayo de 1996 a mayo de 1997. Los pacientes provenían de los hospitales "Dr. Manuel Gea González" (Secretaría de Salubridad), "Venados" (Instituto Mexicano del Seguro Social) y del Instituto Nacional de Pediatría. Las muestras se obtuvieron por lavados y aspirados nasofaríngeos, con base en lo reportado por otros autores, quienes señalan a este tipo de muestras como las adecuadas para aislar virus respiratorios en pacientes de estas edades, otras técnicas de toma de muestra como son el aspirado bronquial o el lavado bronquial, son más traumáticas para los niños.

5. 3. - CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

En cuanto al sexo, la población no tuvo sesgo, y cabe señalar que el sexo no fue considerado como un factor determinante de la enfermedad.

La población analizada se subdividió en tres grupos etarios según la clasificación mundial y también fue subdividida de acuerdo a su nivel socioeconómico (como ya se mencionó en materiales y métodos).

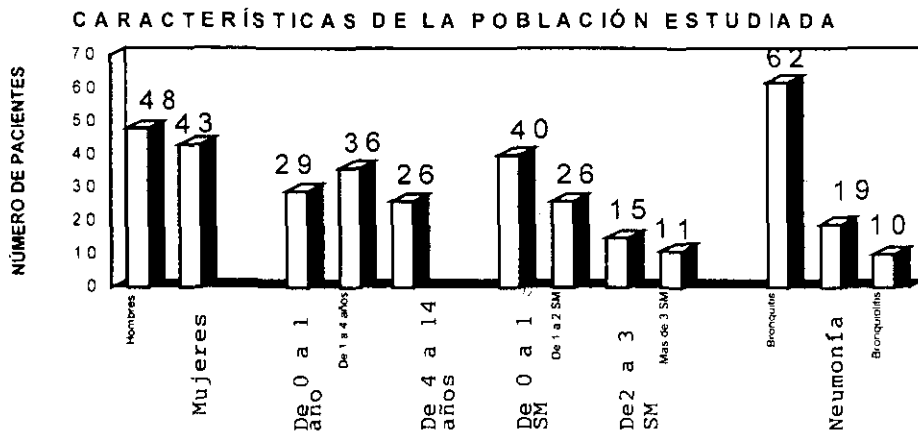
En la distribución de pacientes por grupos etarios no se observó sesgo. Pero si se observó una importante diferencia en el nivel socioeconómico, donde el mayor número de individuos fueron los del grupo "A", que son los de más bajo nivel socioeconómico. Esto debido a que las muestras provenían de hospitales de seguridad social y de asistencia pública.

TABLA 6: TABLA DE LA BASE DE DATOS											
MUEST	SEXO	EDAD	DX CL	CPE	RSV	IV	PIV	AV	HSV	SM	LESION
1	F	0.17	BO	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
2	M	0.67	N	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
3	M	0.17	B	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
4	M	0.83	N	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
5	M	0.17	N	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
6	F	0.17	N	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
7	M	0.17	N	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
8	M	0.67	N	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1 Y 2	B	(+)
9	F	0.67	N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	A	(+)
10	M	1.83	BO	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
11	M	0.58	BO	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
12	M	0.58	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
13	F	0.25	N	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
14	M	0.17	N	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
15	M	0.75	BO	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
16	F	2.00	BO	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
17	F	0.75	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
18	F	10.00	N	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
19	M	0.17	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
20	M	0.75	N	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
21	M	3.00	N	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
22	M	9.00	N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
23	M	5.00	N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1 Y 2	A	(+)
24	M	1.00	N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
25	M	5.00	N	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
26	F	2.00	N	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
27	M	1.83	B	(+)	(-)	(-)	(+) ³	(+)	(-)	C	(+)
28	F	5.67	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	2	C	(+)
29	F	0.50	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	C	(-)
30	F	10.00	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	C	(-)
31	M	1.08	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	C	(-)
32	F	2.92	B	(+)	(-)	(-)	(+) ¹	(-)	(-)	B	(-)
33	M	0.92	B	(+)	(-)	(-)	(+) ¹	(-)	(-)	D	(-)
34	M	3.25	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	2	B	(+)
35	F	3.75	B	(+)	(-)	(-)	(+) ²	(-)	1	C	(+)
36	F	3.33	B	(+)	(-)	(-)	(+) ²	(-)	(-)	D	(-)
37	F	2.08	B	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
38	F	1.00	B	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
39	F	2.33	BO	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
40	M	0.25	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
41	M	1.33	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	D	(-)
42	M	3.67	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
43	F	4.42	B	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
44	F	10.00	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
45	M	9.08	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)

MUEST	SEXO	EDAD	DX CL	CPE	RSV	IV	PIV	AV	HSV	SM	LESION
46	F	10.00	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
47	F	3.67	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	C	(-)
48	F	2.50	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
49	M	2.67	BO	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
50	F	2.25	B	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	D	(-)
51	F	0.17	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
52	F	1.17	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
53	M	1.75	B	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
54	M	1.67	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
55	F	5.33	B	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	C	(-)
56	F	1.00	B	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
57	M	1.08	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
58	F	3.50	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
59	F	4.50	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(+)
60	F	1.08	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
61	F	10.00	B	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
62	M	1.17	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	A	(+)
63	M	10.00	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
64	F	10.00	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	1 Y 2	B	(+)
65	M	7.00	B	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
66	M	3.33	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
67	F	0.92	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	D	(-)
68	M	1.92	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
69	M	5.67	B	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	C	(-)
70	F	1.33	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
71	F	5.33	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	C	(-)
72	F	0.92	B	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	C	(-)
73	M	4.42	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
74	M	0.33	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	D	(-)
75	F	0.17	BO	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	D	(-)
76	M	1.50	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(+)
77	M	4.00	B	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
78	F	10.00	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	D	(-)
79	M	3.25	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	C	(-)
80	M	0.50	B	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	C	(-)
81	M	8.00	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
82	F	10.00	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	C	(-)
83	M	10.00	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
84	M	0.25	N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	D	(-)
85	F	5.67	B	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	2	B	(+)
86	F	6.00	B	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	D	(-)
87	M	6.00	B	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	C	(-)
88	F	0.08	N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
89	F	3.00	B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	A	(-)
90	M	1.33	BO	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)
91	M	0.92	BO	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	B	(-)

Cada uno de los pacientes fue clasificado con base al cuadro clínico que presentó, como se describió en materiales y métodos. La manifestación clínica más frecuente de enfermedad aguda del tracto respiratorio inferior, fue la bronquitis (ver Gráfica 1).

GRÁFICA 1. - CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA



5.4. - FACTOR DE RIESGO PARA LA PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD ASOCIADA CON LA PRESENCIA DE VIRUS

Para determinar cual era el factor de riesgo de la enfermedad relacionada con la presencia de virus y que estuviera involucrado en los diferentes estratos socioeconómicos, se realizó la correlación de las muestras positivas a virus con cada uno de los factores de riesgo estudiados en el cuestionario aplicado. Los factores de riesgo estudiados fueron convivencia con personas con enfermedad respiratoria, hacinamiento, ubicación del hábitat cercana a industrias o basureros, convivencia con fumadores, estrato socioeconómico.

El factor de riesgo más importante y que fue común denominador en todas las muestras que fueron positivas a algún virus, fue la convivencia del paciente con personas (de diferentes edades) que padecían enfermedad respiratoria en general; es decir, que esta podía ser aguda o crónica, del tracto respiratorio inferior o superior, sola o complicada con alguna otra enfermedad, por ejemplo cardíaca.

5. 5. - CORRELACIÓN ENTRE EFECTO CITOPÁTICO (ECP) EN LÍNEA CELULAR (VERO O MRC-5) - LESIÓN EN MEMBRANA CORIOALANTOIDEA (MCA) - PRESENCIA DE VIRUS Y VIRUS IDENTIFICADO

De las muestras estudiadas (91 en total) 37 no presentaron ECP en ninguna de las dos líneas celulares estudiadas y 54 lo hicieron en ambas líneas celulares (Ver Fotografías 1, 2, 3, 4 y 5)

De las 37 muestras que no dieron ECP, 34 no produjeron lesión en MCA, de éstas, en 26 no se detectó ninguno de los virus estudiados y en 8 solamente se detectó antígeno de RSV (ver Fotografía 6), y no se pudo aislar ninguno de los virus estudiados.

Las 3 muestras restantes (de las 37 sin ECP) produjeron lesión en MCA, y se aisló HSV lo cual indica una diferencia de permisibilidad en los dos métodos empleados, para el HSV (Ver Fotografías 7, 8, 9, 10 y 11).

De las 54 muestras que en las que se observó ECP, 45 no produjeron lesión en MCA y 9 si lo hicieron.

De las 45 muestras con ECP y sin lesión en MCA, 28 fueron negativas a todos los virus estudiados; y de las 17 muestras restantes, se pudo detectar la presencia de virus en el siguiente orden:

- * 13 fueron positivos a antígenos de RSV, de los cuales cinco fueron positivos por RT-PCR (ver Fotografía 12)
- * 3 casos de PIV (Ver Fotografías 13-19)
- * 1 caso de AV (Ver Fotografías 20-22)

De las 9 muestras con ECP que además ocasionaron lesión en MCA, en 6 se pudo aislar al HSV. En uno de los 3 casos restantes, se diagnosticó previamente por IFA la presencia de AV y PIV-3 y muy probablemente la lesión en MCA fue producida por la interacción entre estos dos virus, ya que se ha reportado que las células transformadas por AV pueden inducir lesión en MCA.

En los otros 2 casos restantes de los 9 donde hubo ECP y lesión en MCA, no se pudo determinar el agente infeccioso, pero muy probablemente pudo haber sido otro u otros virus no respiratorios que pudieran producir lesión en MCA como Varicela, Sarampión, Poliomieltis, etc. (Ver Fotografías 23 y 24)

La presencia de antígeno de RSV (por ensayo inmunoenzimático) se detectó tanto en muestras que dieron ECP como en las que no lo hicieron. La confirmación de RSV por RT-PCR, se ensayó únicamente en las muestras que habían sido positivas al antígeno de RSV independientemente de que hubieran o no dado ECP. La detección de virus infeccioso se llevó a cabo utilizando como fuente de mRNA células MRC-5 infectadas con muestras

Las muestras que dieron ECP y fueron positivas a RSV por EIA y en las cuales no se pudo aislar ni detectar virus infeccioso de RSV por RT-PCR, pudieron deberse a que se haya perdido el virus durante los pases y que el ECP observado haya sido producido por otro virus no estudiado

El Cuadro de resultados 1 resume y correlaciona los datos obtenidos en la detección de efecto citopático, lesión en membrana corioalantoidea, presencia de virus y virus identificado.

CUADRO 1.- CORRELACIÓN ENTRE EFECTO CITOPÁTICO, LESIÓN EN MEMBRANA CORIOALANTOIDEA, PRESENCIA DE VIRUS Y VIRUS IDENTIFICADO.

CP VERO / MRC-5	PRESENCIA LESIÓN EN MCA	PRESENCIA VIRUS	VIRUS IDENTIFICADO
37 (-)	34 (-)	26 (-)	26 (-) todos los virus probados
		8 (+)	8 (+) Ag de RSV
	3 (+)	3 (+)	1 (+) HSV-2 y Ag de RSV 1 (+) HSV - 1 1 (+) HSV 1 y 2
ECP VERO / MRC-5	PRESENCIA LESIÓN EN MCA	PRESENCIA VIRUS	VIRUS IDENTIFICADO
54 (+)	45 (-)	28 (-)	28 (-) a todos los virus probados
		17 (+)	13 (+) a Ag de RSV de las cuales 5 fueron positivas a RT-PCR 2 (+) PIV-1 1 (+) PIV-2 1 (+) AV
	9 (+)	7 (+)	1 (+) HSV - 1 1 (+) HSV - 2 2 (+) HSV - 1y2 1 (+) PIV - 3, (+) AV y (-) HSV 1 (+) PIV - 2 y HSV-1 1 (+) AV - HSV-2
		2 ND	2 ND

FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. – Control negativo, células MRC-5

Fotografía 2. – Control positivo, células MRC-5 infectadas con RSV cepa Long

Fotografía 3. – Células MRC – 5 infectadas con muestra clínica y no produjo efecto citopático. Estas muestras tampoco produjeron efecto citopático en células VERO. Algunas de estas muestras si indujeron lesión en membrana corioalantoidea (MCA) resultando positivas a HSV, y otras (que no produjeron lesión en MCA) resultaron positivas a antígeno de RSV por ensayo inmunoenzimático (EIA).

Fotografía 4. – Células MRC-5 infectadas con muestra clínica. Se observa efecto citopático similar al del control positivo, la muestra resultó ser positiva a RSV por EIA y por Reacción en Cadena de la Polimerasa – Transcripción Reversa (RT – PCR).

Fotografía 5. – Células VERO infectadas con la misma muestra clínica de la Fotografía 4

Fotografía 6. – Ensayo Inmunoenzimático para la detección de antígeno de RSV. Arriba a la izquierda la placa de control positivo inoculada con RSV cepa Long en medio de transporte. Arriba a la derecha la placa de control negativo, donde se utilizó solamente el medio estéril empleado para transportar a la muestra. Abajo a la izquierda una muestra clínica positiva a la presencia del antígeno de RSV. Abajo a la derecha una muestra clínica negativa a la presencia del antígeno de RSV.

Fotografía 7. – Control negativo de HSV. Células VERO

Fotografía 8. – Control positivo de HSV – 1. Células VERO infectadas

Fotografía 9. – Control positivo de HSV – 2. Células VERO infectadas

Fotografía 10. – Membrana corioalantoidea inoculada con muestra clínica. Lesión en forma de vesícula bajo luz visible

Fotografía 11. – La misma lesión de la Fotografía 10, pero bajo luz ultravioleta

Fotografía 12. –Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para determinar la presencia de RSV infeccioso a partir de las muestras que resultaron positivas al ensayo inmunoenzimático para RSV, por medio de la técnica de RT-PCR.

Fotografía 13. –Control negativo para PIV. Células VERO sin infectar

Fotografía 14. – Control positivo para PIV-1. Células VERO infectadas

Fotografía 15. - Control positivo para PIV-2. Células VERO infectadas

Fotografía 16. - Control positivo para PIV-3. Células VERO infectadas

Fotografía 17. – Muestra clínica positiva a PIV-1. Células VERO infectadas

Fotografía 18. - Muestra clínica positiva a PIV-2. Células VERO infectadas

Fotografía 19. - Muestra clínica positiva a PIV-3. Células VERO infectadas

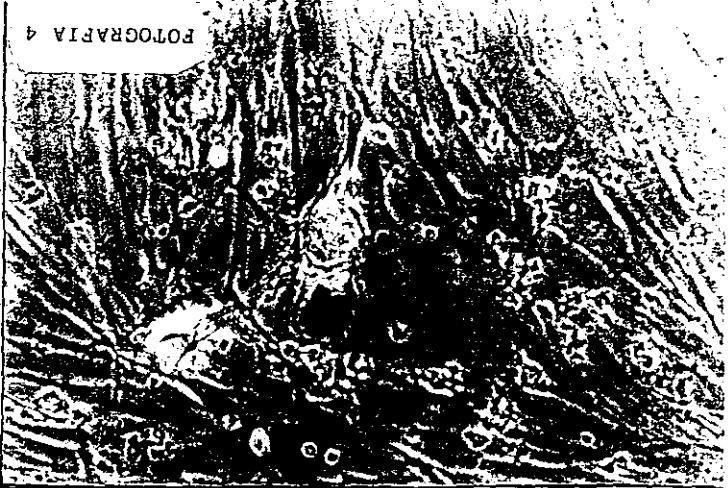
Fotografía 20. – Control negativo para AV. Células Hep-2 sin infectar

Fotografía 21. - Control positivo para AV. Células Hep-2 sin infectar

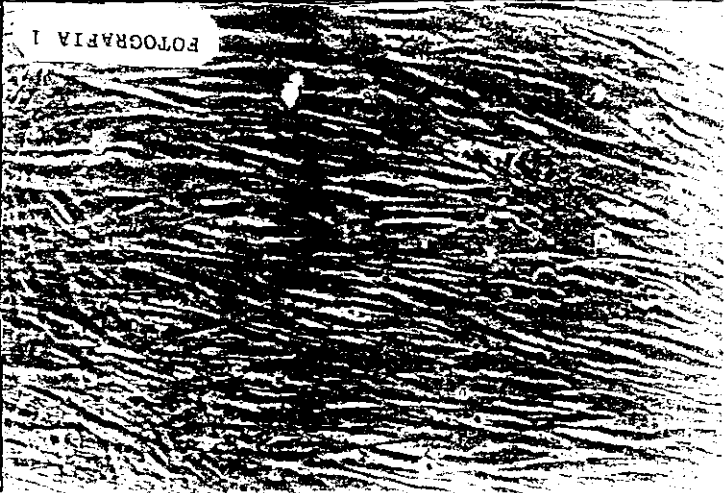
Fotografía 22. – Muestra clínica positiva a AV. Células VERO infectadas

Fotografía 23. – Efecto citopático producido por una muestra que fue negativa a todos los virus estudiados

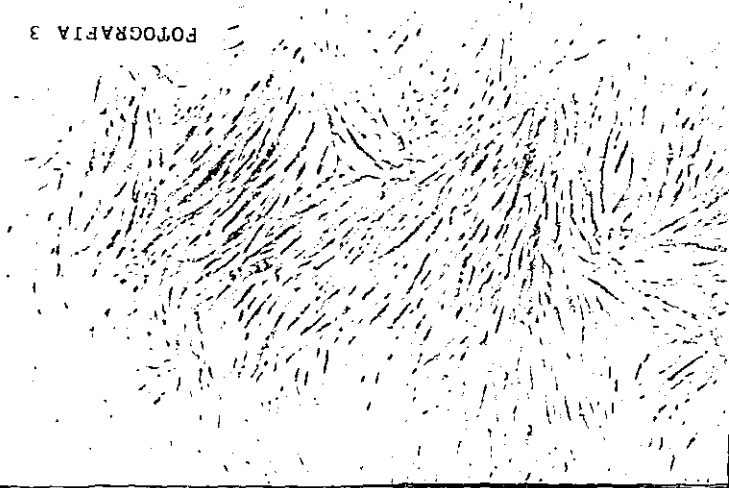
Fotografía 24. – Lesión en MCA producido por la misma muestra de la Fotografía 23.



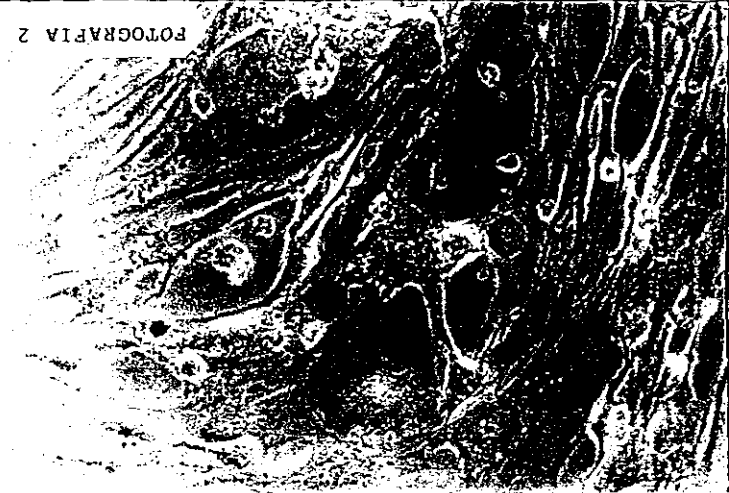
FOTOGRAFIA 4



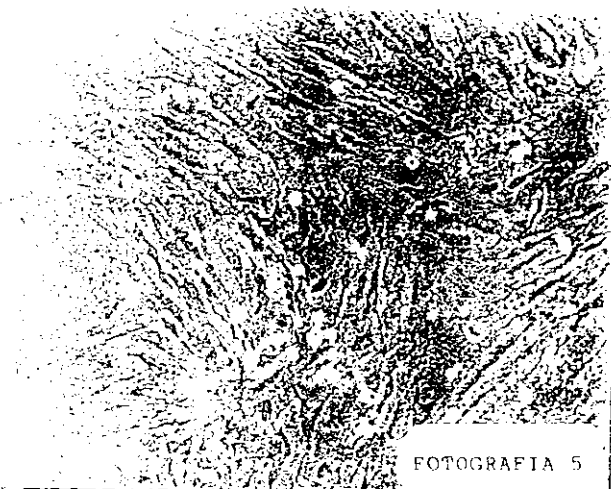
FOTOGRAFIA 1



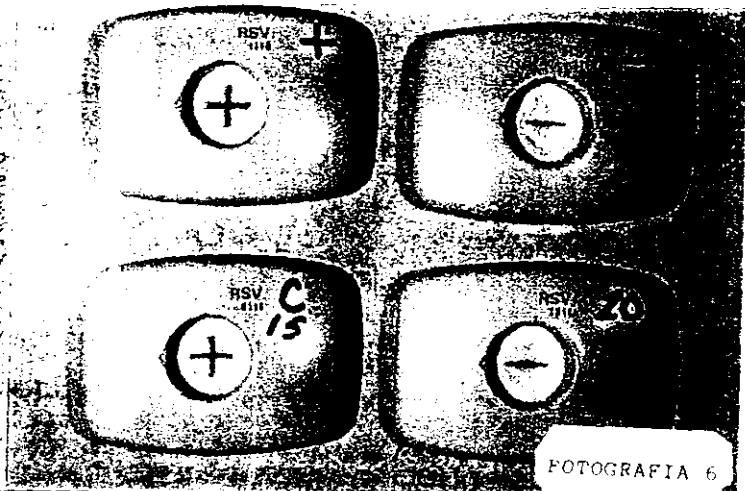
FOTOGRAFIA 3



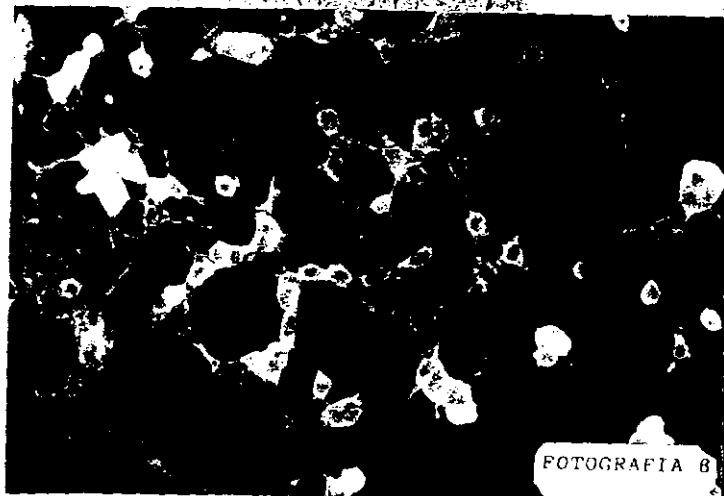
FOTOGRAFIA 2



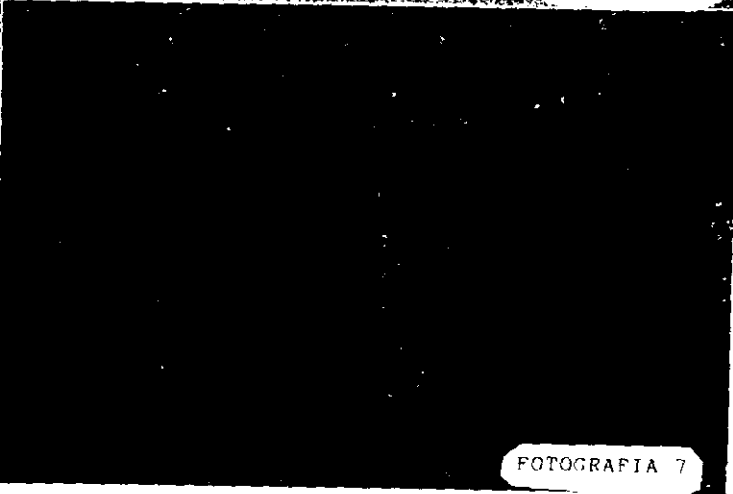
FOTOGRAFIA 5



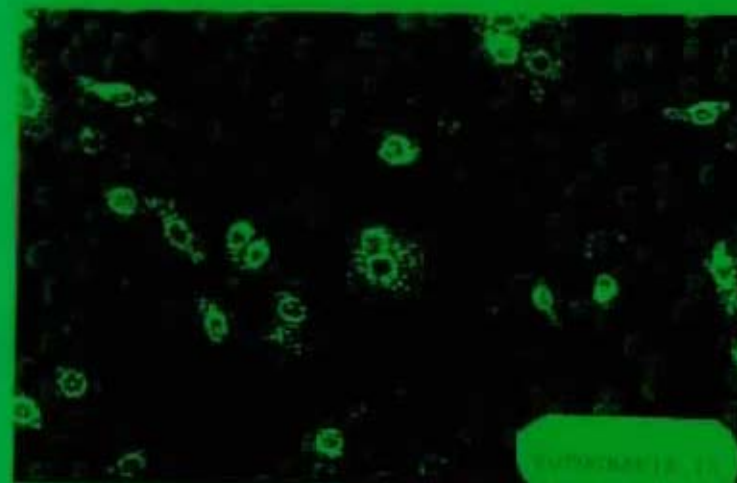
FOTOGRAFIA 6



FOTOGRAFIA 8



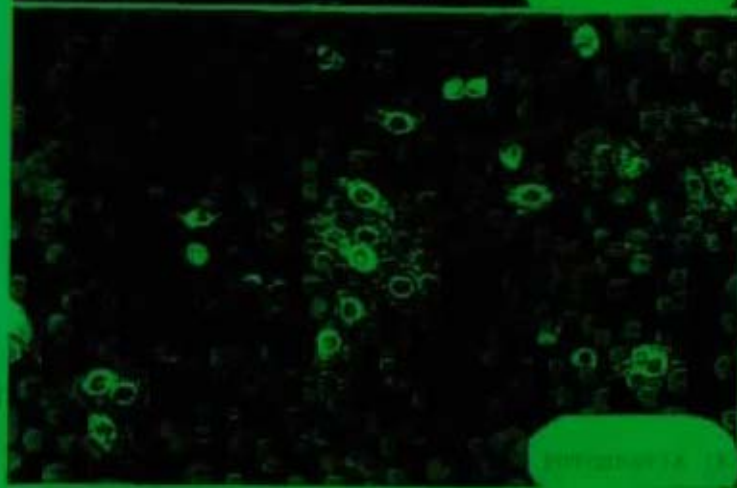
FOTOGRAFIA 7



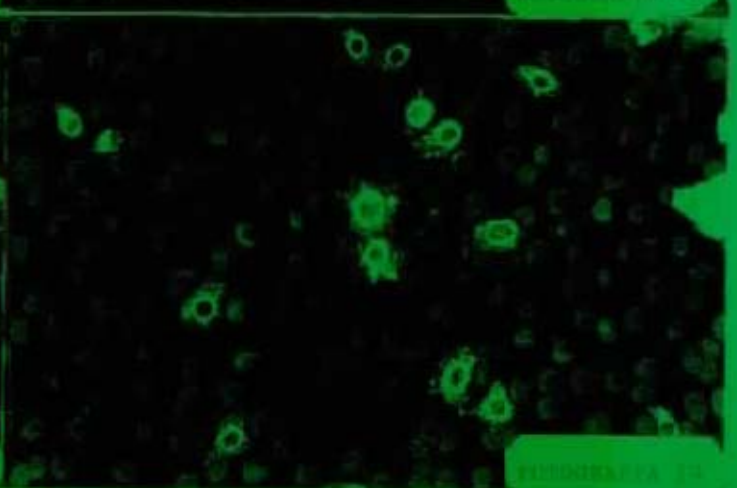
EPIDERMIS 11



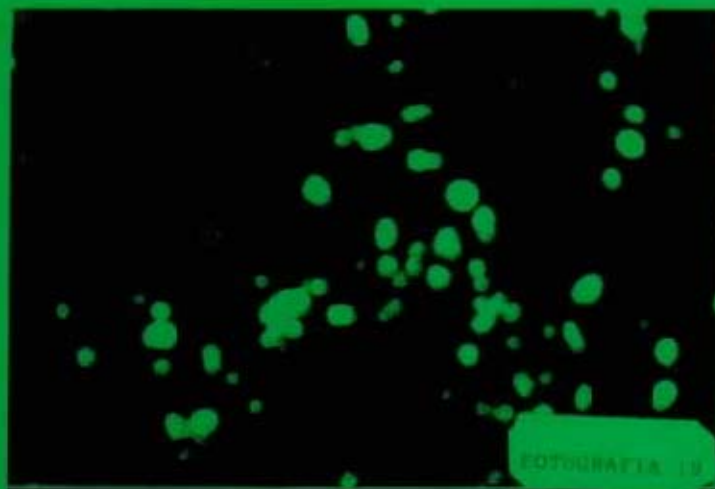
EPIDERMIS 10



EPIDERMIS 12



EPIDERMIS 13



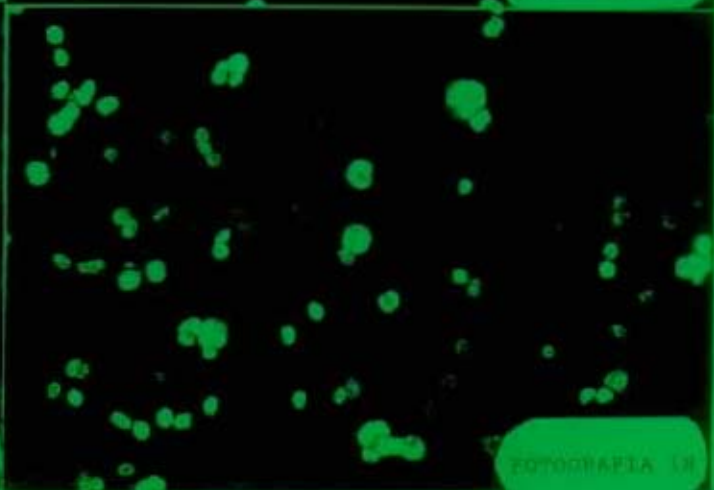
FOTOGRAFIA 19



FOTOGRAFIA 17



FOTOGRAFIA 20



FOTOGRAFIA 18



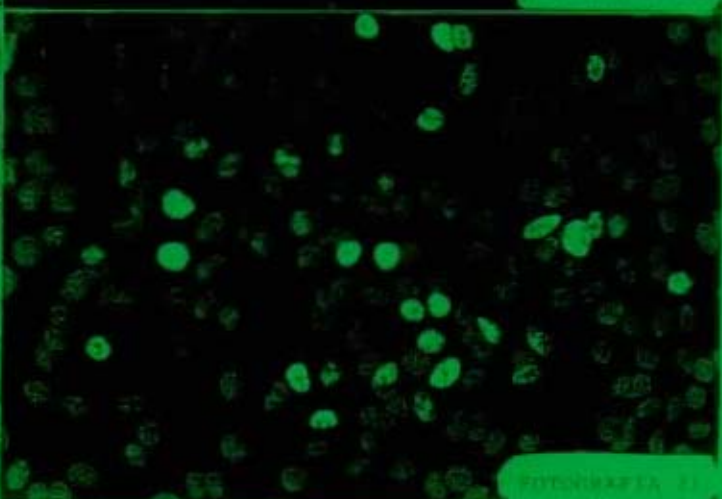
FOTOGRAFIA 24



FOTOGRAFIA 22



FOTOGRAFIA 23



FOTOGRAFIA 21

5. 6. - CORRELACIÓN ENTRE PRESENCIA DE VIRUS Y NIVEL SOCIOECONOMICO

Como se mencionó previamente el nivel socioeconómico de la familia de donde provenia el paciente fue ubicado en diferentes categorías dependiendo el número de salarios mínimos destinados a la alimentación de un mes. Así se obtuvieron los siguientes grupos:

- A.- De 0 a 1 salario mínimo
- B.- De 1 a 2 salarios mínimos
- C.- De 2 a 3 salarios mínimos
- D.- Más de 3 salarios mínimos

Estos datos fueron analizados por la prueba de Ji-cuadrada con 3 grados de libertad y 95% de confianza, obteniéndose los siguientes resultados (CUADRO 2):

CUADRO 2. - CORRELACIÓN ENTRE PRESENCIA DE VIRUS Y NIVEL SOCIOECONOMICO

Nivel Socioeconómico	Positivos a virus	Negativos a virus
A	12	28
B	10	16
C	8	7
D	4	6

Valor de Ji de prueba = 0.92829

Valor de Ji de tablas = 7.81472

Como $0.92829 < 7.81472$ se toma la decisión de aceptar la hipótesis de que la presencia de por lo menos uno de los virus respiratorios estudiados es independiente del nivel socioeconómico del paciente.

5. 7. - CORRELACIÓN ENTRE VIRUS IDENTIFICADO - GRUPO ETARIO - TIPO DE MUESTRA Y CUADRO CLÍNICO

Se realizó la correlación de las muestras que fueron positivas a alguno de los virus estudiados con el grupo etario al que pertenecía el paciente, el tipo de muestra y el cuadro clínico.

Con la metodología utilizada en nuestro estudio no fue posible aislar el virus de Influenza en la población estudiada.

El virus que más se detectó en toda la población fue el RSV (22 / 91) identificado en cada uno de los casos por ensayo inmunoenzimático y confirmado por RT-PCR en 5 de los 22 analizados.

De los 18 casos de bronquitis relacionadas con virus, el mayor número de casos se debió al RSV (14/18).

El HSV se detectó en 6/18 casos de bronquitis asociadas a virus y fue la segunda causa importante de enfermedad respiratoria aguda.

Todos los casos positivos a AV (3 / 91) y el PIV (5 / 91) se relacionaron con bronquitis.

En el Cuadro de resultados 3 se muestran los datos de los resultados resumidos arriba, los cuales están organizados primero por familia viral identificada, número de muestra, grupo etario, tipo de muestra y cuadro clínico.

CUADRO 3. - CORRELACIÓN ENTRE PRESENCIA VIRAL (SIMPLE), GRUPO ETARIO, TIPO DE MUESTRA Y CUADRO CLÍNICO

FAMILIAS VIRALES	MUESTRA S POSITIVAS	GRUPO ETARIO	TIPO DE MUE STRA		CUADRO CLÍNICO
			A.N.F.	I.N.F.	

ADENOVIRIDAE

• Adenovirus	1	0 a 1	0	1	B
--------------	---	-------	---	---	---

ORTHOMYXOVIRIDAE

• Virus de Influenza	0				
----------------------	---	--	--	--	--

PARAMYXOVIRIDAE

• Virus Respiratorio Sincital	10	0 a 1	8	2	3 B, 2 BO, 5 N
	4	1 a 4	0	4	3 B, 1 N
	7	5 a 14	0	7	7 B

• Parainfluenza virus (PIV)					
- PIV - 1	1	0 a 1	0	1	1 B
	1	1 a 4	0	1	1 B
- PIV - 2	1	1 a 4	0	1	1 B

HERPESVIRIDAE

Herpes Simplex (HSV)					
- HSV 1	1	0 a 1	1	0	1 N
- HSV 2	1	1 a 4	0	1	1 B
- HSV 1 y 2	1	0 a 1	1	0	1 N
	1	1 a 4	0	1	1 B
	2	5 a 14	0	2	1 B y 1 N

CUADRO 2 (CONTINUACIÓN).- CORRELACIÓN ENTRE PRESENCIA VIRAL (MIXTA), GRUPO ETARIO, TIPO DE MUESTRA Y CUADRO CLÍNICO

AV y PIV - 3	1	De 1 a 4	0	1	B
AV y HSV- 2	1	De 5 a 14	0	1	B
RSV y HSV-2	1	De 5 a 14	0	1	B
PIV-2 y HSV 1	1	De 1 a 4	0	1	B

De las 91 muestras analizadas 56 fueron negativas a todos los virus estudiados y 35 resultaron positivas a uno o más virus. Cabe señalar que, como ya se mencionó en material y métodos, para la identificación del RSV se empleó un procedimiento diferente que el usado para la identificación de los otros virus. Es decir, que mientras que para otros virus, la inmunofluorescencia se realizó a partir del aislamiento viral proveniente de línea celular o cultivo en embrión de pollo a partir de muestra congelada, en el caso de la identificación de RSV se realizó por medio de un ensayo inmunoenzimático para la detección de antígeno a partir de muestra fresca y que posteriormente, a partir de muestra congelada, se propagó en línea celular para posteriormente realizar la detección del N del RSV por RT-PCR. El cuadro no. 4 resume los resultados obtenidos en el aislamiento viral.

CUADRO 4. - MUESTRAS POSITIVAS A VIRUS

VIRUS	NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS
- RSV	21
- HSV	6
- PIV	3
- AV	1
- AV y PIV	1
- RSV y HSV	1
- PIV y HSV	1
- AV y HSV	1

5. 8. – CORRELACIÓN ENTRE EDAD Y PRESENCIA DE VIRUS

Los pacientes fueron organizados en tres grupos etarios, como ya se mencionó en materiales y métodos, los grupos fueron infantes (menores de un año), preescolares (de 0 a 4 años) y escolares (de 4 a menos de 14, que en este caso fueron niños menores de diez años)

Se realizó la correlación entre la edad del paciente y la presencia de virus, para tal efecto se empleó la prueba de Ji-cuadrada en donde se obtuvieron los siguientes resultados:

CUADRO 5. - CORRELACIÓN ENTRE EDAD Y PRESENCIA VIRUS

EDAD	POSITIVOS A VIRUS	NEGATIVOS A VIRUS
Infantes	14	15
Preescolares	9	27
Escolares	11	15

Valor de Ji de prueba = 0.1426

Valor de Ji de tablas = 5.9914

Como $0.1426 < 5.9914$ se toma la decisión de aceptar la hipótesis de que la presencia de RSV es independiente del diagnóstico clínico.

5.9. - CORRELACIÓN ENTRE PRESENCIA DE RSV Y DIAGNÓSTICO CLÍNICO

La presencia de RSV se correlacionó con el diagnóstico clínico que presentaba el paciente al momento de tomar la muestra. Estos datos fueron analizados por la prueba de Ji-cuadrada con 2 grados de libertad y 95% de confianza, obteniéndose los siguientes resultados (CUADRO 6):

CUADRO 6. - CORRELACIÓN ENTRE PRESENCIA DE RSV Y DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Diagnóstico Clínico	Positivos a RSV	Negativos a RSV
B	15	47
N	5	14
BO	2	8

Valor de Ji de prueba = 0.128

Valor de Ji de tablas = 5.9914

Como $0.1426 < 5.9914$ se toma la decisión de aceptar la hipótesis de que la edad del paciente es independiente de la presencia de virus.

5. 10. - CORRELACIÓN ENTRE PRESENCIA DE HSV Y DIAGNÓSTICO CLÍNICO

La presencia de HSV se correlacionó con el diagnóstico clínico que presentaba el paciente al momento de tomar la muestra. Estos datos fueron analizados por la prueba de Ji-cuadrada con 2 grados de libertad y 95% de confianza, obteniéndose los siguientes resultados (CUADRO 7):

CUADRO 7. - CORRELACIÓN ENTRE PRESENCIA DE HSV Y DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Diagnóstico Clínico	Positivos a RSV	Negativos a RSV
B	6	56
N	3	16
BO	0	10

Valor de Ji de prueba = 0.81955

Valor de Ji de tablas = 5.9914

Como $0.81955 < 5.9914$ se toma la decisión de aceptar la hipótesis de que la presencia de HSV es independiente del diagnóstico clínico.

5. 11. - CORRELACIÓN ENTRE PRESENCIA DE LOS OTROS VIRUS Y DIAGNÓSTICO CLÍNICO

La presencia de PIV así como de AV solamente se detectó en casos de bronquitis y fue en un número muy bajo por lo que no se procedió a realizar la prueba de ji-cuadrada. En el caso de IV no se detectó ninguna muestra positiva

5. 11. - DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL POR SEMANAS DE LOS VIRUS IDENTIFICADOS

La curva de distribución del número de muestras que se obtuvieron por semana durante el presente estudio, comprende desde la semana 18 de 1996 hasta la semana 16 de 1997 (Gráfica 3). Se estudio la correlación entre numero de muestras obtenidas por año y número de muestras positivas a virus. Estos datos fueron analizados por la prueba de Ji-cuadrada con 1 grado de libertad y 95% de confianza, obteniéndose los siguientes resultados (CUADRO 8):

CUADRO 8. - CORRELACIÓN ENTRE NÚMERO DE MUESTRAS OBTENIDAS POR AÑO Y NÚMERO DE MUESTRA POSITIVAS A VIRUS

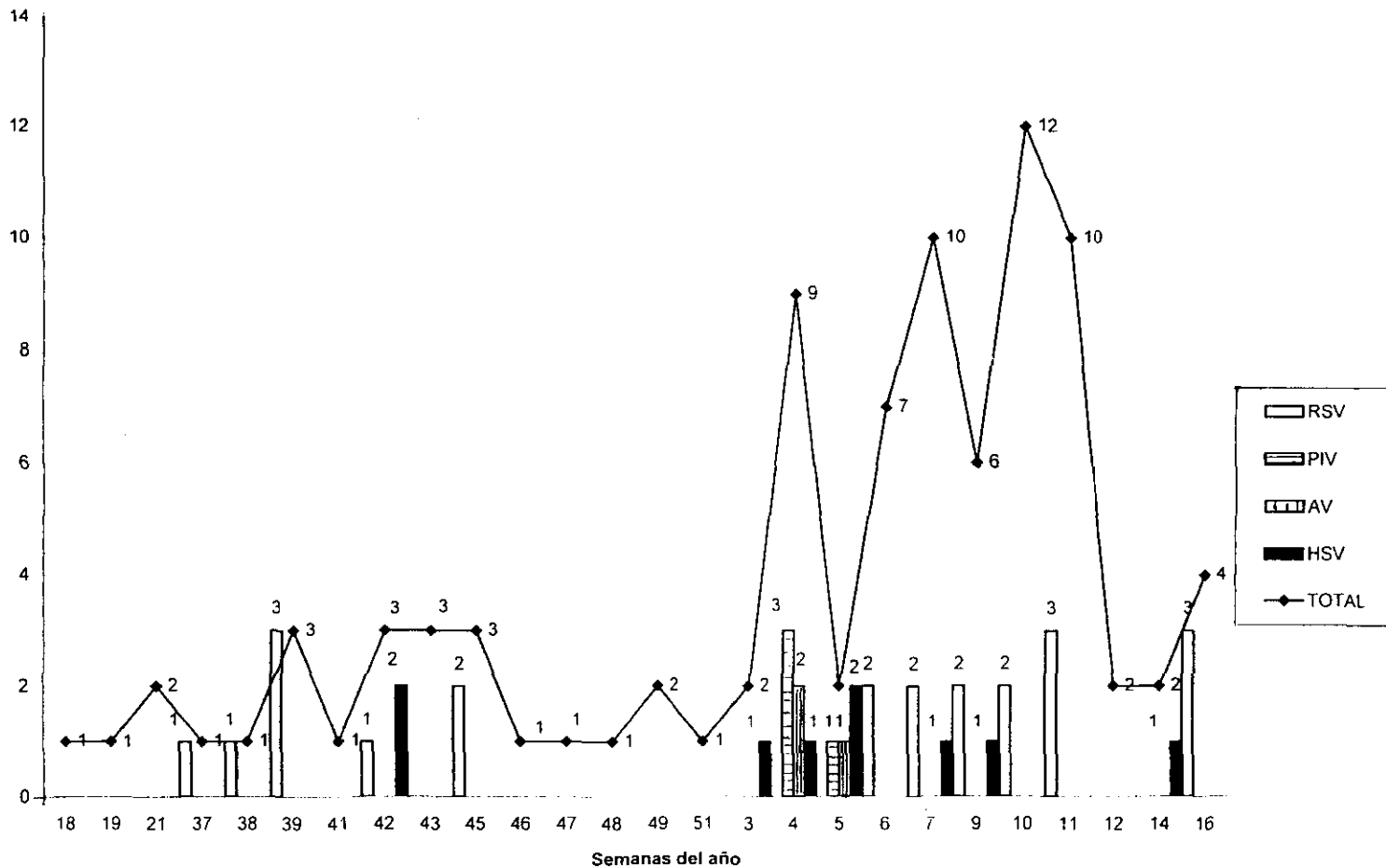
Año	Positivos a virus	Negativos a virus
1996	10	15
1997	28	38

Valor de Ji de prueba = 0.362448

Valor de Ji de tablas = 3.841455

Como $0.362448 < 3.841455$ se toma la decisión de aceptar la hipótesis de que la presencia de virus es independiente de la época del invierno (inicio o final) en la que se tomó muestra

GRAFICA 2 - DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL DE LOS VIRUS IDENTIFICADOS





1 DOBLS

CAFIL

6. - DISCUSIÓN

El objetivo primordial de este trabajo de tesis fue el aislamiento e identificación de virus respiratorios involucrados en la enfermedad aguda exclusiva del tracto respiratorio inferior, en pacientes hospitalizados y menores de diez años de edad.

En el presente estudio no se observó correlación entre el estrato socioeconómico del paciente y la presencia de por lo menos uno de los virus respiratorios estudiados ($P < 0.05$). Lo anterior puede deberse a la característica de los virus como patógenos primarios, los cuales no requieren la presencia previa de otro microorganismo para producir daño, y solamente requerirá de factores de riesgo para que se presente la enfermedad, tal y como lo observado en el presente estudio donde, como ya se hizo mención, la convivencia con personas con alguna enfermedad respiratoria puede ser un factor de riesgo muy importante.

El factor de riesgo más importante y común denominador en el 100% de las muestras que fueron positivas a algún virus, fue la convivencia del paciente con personas (de diferentes edades) que padecían enfermedad respiratoria en general; es decir, que ésta podía ser aguda o crónica, del tracto respiratorio inferior o superior, sola o complicada con alguna otra enfermedad. Este dato es de gran importancia debido a que no existen antecedentes de reportes nacionales que analicen los posibles factores de riesgo para la EATRI de origen viral en pacientes hospitalizados de estos grupos de edades. Sin embargo nuestros resultados señalan que la convivencia es un factor preponderante, lo cual coincide con lo reportado por otros autores (5, 6, 7, 8).

En el presente trabajo se demostró por medio de la prueba de Ji-cuadrada, que la presencia de por lo menos uno de los virus respiratorios estudiados fue independiente del diagnóstico clínico ($P < 0.05$ para RSV y para HSV), es decir que no importó si se trataba de un caso de bronquitis, bronquiolitis o neumonía. En estudios realizados por Steiner (101) y por Freymuth (102,103) se señala a la bronquitis como manifestación clínica principal de EATRI y cuadro clínico asociado a la presencia de virus. Monto (104) atribuye la principal causa de EATRI a las infecciones bacterianas, pero cita que muy probablemente estas sean favorecidas por una infección inicial de etiología viral.

De los virus que se estudiaron, Influenza no fue detectado en ninguno de los casos, resultado similar a lo reportado por Bakir (105) quien identifica un mínimo de muestras positivas a Influenza en niños menores de cinco años hospitalizados con cuadro clínico de EATRI. Contrariamente a estos estudios Steiner (101) y Tecu (106) por separado reportan como agente etiológico responsable de un brote de EATRI en niños menores de un año al virus de Influenza, posterior a este brote aparecieron casos de EATRI donde se aislaron virus de Parainfluenza y Adenovirus.

En nuestro estudio los casos de Parainfluenza y Adenovirus fueron escasos a diferencia de lo reportado por Steiner (101), solamente que hay que considerar que en el trabajo de Steiner, la aparición de los casos de Parainfluenza y Adenovirus fueron posteriores al brote de Influenza, lo cual pudo haber favorecido la presencia de estos virus. Por otra parte Videla (107), quien asocia al Adenovirus como segundo agente aislado en niños hospitalizados menores de dos años con cuadro clínico de EATRI, después del RSV como primera causa. Baumeister (108) y Han (109), por separado

demuestran al Adenovirus como uno de los principales agentes virales asociados con EATRI en niños menores de 5 años hospitalizados, pero no hace comparación con otros virus.

La anterior diferencia entre nuestros resultados y los obtenidos por los autores citados pudiera deberse a que se trata de condiciones geográficas diferentes.

Sin embargo, nuestros resultados coinciden con lo publicado por Freymuth (102, 103), quien no encontró muchos casos de EATRI relacionados con Adenovirus.

El principal agente viral asociado con EATRI en nuestro estudio fue el RSV, esto correlaciona con lo reportado por Freymuth (102, 103), al Rashed (110), Videla (107), y otros autores. En un estudio similar al nuestro Barkir, encuentra al RSV como principal causa de EATRI en niños hospitalizados menores de 5 años, seguido de Parainfluenza tipo 3 y en muy pocos casos al virus de Influenza y al Adenovirus. Freymuth (102, 103), por su parte reporta la detección por PCR de RSV como agente principal involucrado con EATRI en niños hospitalizados, seguido de Parainfluenza 3, Rinovirus y en algunos casos Adenovirus.

Como segundo agente viral en importancia asociado a EATRI, nosotros reportamos al virus Herpes Simplex (HSV) tanto el tipo I como el II. Este agente viral ha sido pocas veces asociado al tracto respiratorio inferior pero sí para el tracto superior. Krause (111) ha reportado al HSV como posible patógeno de laringotraqueobronquitis. Francois-Dufrense (112) ha asociado el HSV con EATRI en casos de pacientes con enfermedad de Crohn. Hull (113) reportó dos casos de los cuales uno de los pacientes presentaba inmunodeficiencia. Lissaeur (114) y Greene (115) reportan por separado al HSV como agente viral involucrado con neumonía fatal fulminante en neonatos. Muy seguramente el presente sea el primer reporte en México de la presencia de HSV en pacientes menores de 10 años de edad hospitalizados con diagnóstico clínico de EATRI.

En el presente estudio reportamos casos en los cuales están involucrados más de un virus. Las infecciones mixtas se han citado como productoras de un efecto aditivo en la patología de enfermedad respiratoria, como por ejemplo Drews (116), reporta la asociación de Picornavirus e Influenza en la neumonía fulminante. Nuestros resultados demuestran la asociación entre Adenovirus y Parainfluenza como un efecto aditivo para la presentación de lesiones en membrana corioalantoidea. Además se encontraron otras dobles infecciones como la del HSV-1 con PIV-2, y el Adenovirus con el HSV-2.

Con respecto al efecto citopático se encontraron muestras que no lo presentaron y en las cuales no se pudo detectar ninguno de los virus estudiados, esto probablemente se deba a que la enfermedad era de origen bacteriano

Por otra parte, encontramos casos en los cuales se pudo observar efecto citopático en línea celular y no se pudo identificar virus. Estos casos probablemente se deban a virus respiratorios diferentes a los estudiados, como por ejemplo, los Rinovirus. Kim (117) reporta a los Rinovirus como agentes virales principalmente asociados a EATRI en niños hospitalizados menores de un año de edad.

En la mayoría de las muestras que no produjeron ECP ni lesión en MCA, no se pudo aislar ninguno de los virus estudiados. Lo cual pudo deberse a la pérdida del agente

infeccioso durante el transporte o manipulación, o bien, que el agente etiológico no era de origen viral.

Las 2 muestras en las que se observó ECP, lesión en MCA y no se pudo detectar el HSV, ni los otros virus estudiados, se pudo deber a la presencia de otros virus no respiratorios que hayan estado presentes en la muestra y que tienen la capacidad de producir tanto ECP como lesión en MCA, por ejemplo, Varicela, Sarampión, Poliomielitis, etc.

Los resultados arrojados por el presente trabajo revelan que para el aislamiento viral las dos técnicas empleadas (cultivo celular y por cultivo en embrión de pollo por vía de la membrana corioalantoidea) ofrecieron diferente grado de permisibilidad.

Freymuth reporta un sustancial incremento del número de muestras que resultan positivas a virus respiratorios cuando emplea el PCR para la detección, en comparación con el aislamiento viral; este estudio lo realizó a partir de muestras clínicas de niños hospitalizados con EATRI. En nuestros resultados, al comparar la detección de antígeno viral por medio del ensayo inmuno enzimático (EIA) con la detección de virus infectante por medio de PCR, nosotros observamos que había un mayor número de muestras positivas a EIA que a PCR, lo anterior no coincide con los resultados de Freymuth, lo cual pudo deberse a diversos factores, a saber: 1).- El virus pudo haber perdido su infectividad durante el tiempo en que se colectaban las muestras antes de ir a recogerlas de la facultad al hospital. 2).- El virus pudo haber perdido su infectividad durante el transporte de la muestra. 3).- El virus pudo haber perdido su infectividad durante los pases que se le hicieron en línea celular.

De las 13 muestras en las que se pudo detectar antígeno de RSV, sólo en 5 casos se pudo detectar el mRNA del RSV por RT-PCR.

Las causas de que hayan aparecido muestras en las que no se detectó el RSV por RT-PCR, pudieron ser dos: 1.- Desde un inicio la muestra sólo contaba con antígeno de RSV, pero no al RSV infeccioso y el ECP observado se pudo deber a otro virus no estudiado; o 2.- Que la muestra contenía bajo título de RSV infeccioso que se fue perdiendo debido a la competencia por parasitar a las células con otro virus (no estudiado) con velocidad de crecimiento mayor al RSV.

Por último, en la distribución estacional de aislamientos virales por semanas, observamos que hubo un aumento en el número de muestras totales obtenidas al final del invierno (principio de año). Sin embargo, al analizar por medio de la prueba de Ji-cuadrada, el número de muestras obtenidas al inicio y final del invierno con relación al número de muestras positivas a virus en esos periodos, se observa que por la presencia de por lo menos uno de los virus respiratorios estudiados es independiente del período del invierno de donde se tome la muestra ($P < 0.05$)

El mayor número de casos donde se detectó RSV y HSV fue al final del invierno (inicio de año) en comparación a los casos de PIV y AV que sólo fueron detectados al inicio del año.

En países nórdicos reportan el mayor número de casos de EATRI asociada a virus al inicio del invierno, contrariamente a lo reportado por nuestro estudio. Lo anterior puede deberse probablemente a que las condiciones climatológicas no sean las mismas para nuestro país.

7. - CONCLUSIONES

Del presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La presencia de por lo menos alguno de los virus estudiados no tuvo relación con el nivel socioeconómico de la familia de los pacientes ($P < 0.05$)
- Tampoco se observó correlación entre el grupo etario y la presencia de por lo menos alguno de los virus estudiados ($P < 0.05$)
- El factor de riesgo más importante fue la convivencia de los pacientes con personas de diferentes edades que padecían enfermedad respiratoria en general (en el 100% de los casos).
- Con respecto al aislamiento viral se observó que el aislamiento en línea celular y por cultivo en embrión de pollo poseen diferente grado de permisibilidad dependiendo el virus de que se trate.
- La presencia de virus no tuvo correlación con las diferentes manifestaciones clínicas de EATRI ($P < 0.05$).
- De los virus estudiados, el más importante relacionado con la enfermedad fue el Respiratorio Sincitial, seguido del Herpes Simplex y finalmente Parainfluenza y Adenovirus en pocos casos. En estas muestras no se detectó la presencia del virus de Influenza.
- La técnica de PCR fue útil para la detección del RSV infeccioso, sin embargo se recomienda el óptimo manejo de la muestra para disminuir el número de falsos negativos.

APENDICE A

1.- MEDIO DE TRANSPORTE PARA RSV:

- * 100 ml de Solución de Hanks balanceada
- * 0.5 % de Albúmina sérica bovina
- * 1 ml de antibiótico
- * 1 ml de antimicótico

2.- D -MEM

Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco Laboratories - Life Technologies, catálogo No. 12100-046) Suplementado con L- Glutamina, piruvato de sodio, bicarbonato de sodio.

- * 1 sobre de D-MEM para preparar un litro (13.4 g)
- * 2.2 g de bicarbonato de sodio
- * 2.2 g de HEPES ($C_8H_{17}N_2O_4SNa$) Sigma Cell Culture catálogo No. 75277-39-3
- * Agua bidestilada cbp 100

NOTA:

- 1.- A 100 ml de D-MEM ya preparado se le adicionan 1 ml de antibiótico, 1 ml de antimicótico y suero fetal bovino. La cantidad de éste último dependerá del porcentaje al que se desea que quede el medio.
- 2.- La mezcla anterior se esteriliza por filtración

3.- SOLUCIÓN DE HANKS:

SOLUCIÓN No 1

- * NaCl 40.0 g
- * KCl 2.0 g
- * Fosfato monobásico de sodio 0.356 g
- * Fosfato diácido de potasio 0.3 g
- * Glucosa 5.0 g
- * Sulfato de Sodio 1.0 g
- * Rojo de fenol 0.085 g
- * Agua desionizada cbp 1 L

SOLUCIÓN No 2

- * Cloruro de calcio 0.037 g
 - o Cloruro de calcio dihidratado 0.485 g
- * Agua desionizada cbp 100 ml

SOLUCIÓN No 3

- * Bicarbonato de Sodio 0.7 g
- * Agua desionizada cbp 100 ml

PROCEDIMIENTO DE LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE HANKS

- 1.- Esterilizar las soluciones No. 2 y No. 3 por autoclave durante 15 minutos.
- 2.- Preparar frascos con 70 ml de agua desionizada y adicionarle 20 ml de la solución No. 1 y esterilizar por autoclave durante 15 minutos.
- 3.- A los frascos del punto 2 agregar 5 ml de la solución No. 2 y 5ml de la solución No. 3.

4.- ANTIBIÓTICOS:

- * Sulfato de Estreptomicina de 100 mg 1 g
- * Agua desionizada 5 ml

1.- Mezclar y agitar hasta disolver por completo

- * Penicilina G Sódica de 1×10^6 U. I. 1×10^6 U. I.
- * Agua desionizada 5 ml

2.- Mezclar y agitar hasta disolver por completo

- 3.- Mezclar ambos antibióticos y esterilizar por filtración (membranas de 0.45 y 0.22 nm)
- 4.- Recolectar el filtrado en frascos estériles de 5 ml e identificar
- 5.- Se conserva a -20°C hasta por un año

5.- ANTIMICÓTICO :

- * Nistatina 100 mg
- * NaOH 1N 1 ml
- * PBS 9 ml

- 1.- Disolver la nistatina en el NaOH y después se le adiciona el PBS
- 2.- Esterilizar por filtración (membranas de 0.45 y 0.22 nm)

6.- PBS pH 7.4 :

SOLUCIÓN No 1:

- * Cloruro de sodio 8.00 g
- * Cloruro de potasio 0.20 g
- * Fosfato disódico 1.15 g
- * Fosfato dipotásico 0.20 g
- * Agua desionizada 800 ml

SOLUCIÓN No2 :

- * Cloruro de Calcio 0.10 mg
- * Agua desionizada cbp 100 ml

SOLUCIÓN No 3:

- * Cloruro de Magnesio 0.10 mg
- * Agua desionizada cbp 100 ml

- 1.- Mezclar perfectamente y por separado cada una de las soluciones
- 2.- Esterilizar por separado en autoclave
- 3.- Esperar a que se enfríe (bien tapadas las botellas)
- 4.- Mezclar sobre la solución No. 1 a las soluciones No.2 y No.3
- 5.- Almacenar a 4° C

7.- HIDRÓXIDO DE SODIO 1 N :

- * Hidróxido de Sodio (NaOH) 40.0 g
- * Agua desionizada cbp 1000 ml

PREPARACIÓN :

- 1.- Depositar en un vaso de precipitados al NaOH ya pesado, agregar los 500 ml de de agua y ponerlo a baño María. Agitar con varilla de vidrio y una vez disuelto aforar a 1000 ml.

8.- PBS + ABS + TWEEN 20 Para los tres lavados

- * ABS 0.1%
- * Tween 20 0.05 %
- * PBS ph 7.4 cbp 500 ml

9.- VERSENO

- * Versonato de Sodio 0.5 g
- * Solución 1 del PBS 50 ml
- * Agua destilada 950 ml
- * NaOH 1N (para ajustar pH)..... a un pH de 7.6

SERVICIO DE PEDIATRÍA
CUESTIONARIO SOBRE VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL

FICHA DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE

No. de expediente :		No. de folio :			
Fecha de ingreso :		Fecha de egreso:			
Fecha de toma de muestra :					
Edad del niño :		Fecha de nacimiento :		Sexo :	
Nombre del niño :					
Nombre (s)		Apellido paterno		Apellido materno	
Dirección actual :					
Calle		No.		Colonia	
Barrio		Pueblo		Municipio	
Estado		C.P.		Teléfono (lada)	

HISTORIA CLÍNICA DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS DEL PACIENTE

El niño ha padecido

Tos _____ tipo de tos : seca _____ con flemas _____ con sangre _____
 color de la expectoración: verde _____ sanguinolenta _____ achocolatada _____

Fiebre _____ tipo de fiebre : continua _____ intermitente _____
 vespertina _____ matutina _____ Nocturna _____

Disnea _____

Asma _____

Rinorea _____ tipo: anterior _____ poosterior _____

Faringitis _____

Traqueítis _____

Neumonía _____

Bronquiolitis _____

Bronquitis _____

Sibilancia audible o estertores _____

Cianosis (dedos amoratados) _____

Tiros intercostales (hundimiento de costillas) _____

Quejidos respiratorios _____

Aleteo nasal _____

Retracción xifoidea _____

Estridor laríngeo _____

INFORMACIÓN SOCIOECONÓMICA

La vivienda donde habita es:
 Propia _____ Rentada _____ Prestada _____

Cuántas personas viven en éste domicilio ? _____

Cuántos cuartos (dormitorios) tiene ? _____

Cuál es el material predominante en

Techo	Paredes	Piso
- Adobe	- Adobe	- Tierra
- Lámina de cartón	- Lámina de cartón	- Concreto
- Madera	- Madera	- Madera
- Ladrillo	- Ladrillo	- Ladrillo
- Palma	- Palma	- Alfombra
- Asbesto	- Asbesto	- Otro
- Concreto	- Concreto	
- Otro	- Otro	

La vivienda cuenta con baño (sanitario):
 - No cuenta con baño _____ -El baño es interior _____ - El baño es exterior _____

Cuenta con sistema de drenaje
 -No _____ Si _____

La vivienda cuenta con agua potable
 - No cuenta con agua potable _____ - Toma interior _____ - Toma exterior _____

Se encuentran fábricas cerca de la vivienda:
 - No _____ - Si _____
 - Cuantas y cuáles _____

Se encuentran tiraderos de desperdicios cerca de la vivienda:
 - No _____ - Si _____
 - Cuantas y cuáles _____

Cuánto gasta la familia en alimentarse al mes? _____

La alimentación consiste en :
 - Desayuno: _____
 - Almuerzo: _____
 - Comida: _____
 - Merienda: _____
 - Cena: _____

Observaciones del clínico:
 - Respecto al aporte clorúrico: _____
 - Respecto al aporte proteico: _____

Presencia de animales en la casa
 - No _____ Si _____ Cuales y cuantos _____

Presencia de plantas y /o jardines
 - No _____ Si _____ Cuales y cuantos _____

DATOS FAMILIARES

Edad de la madre cuando nació su hijo
Lugar que ocupa el hijo en relación a sus hermanos
Ingiirió medicamentos durante su embarazo - No _____ - Sí _____ - Cuáles, cuando y cómo _____
4.- Le tomaron placas de rayos X o algún otro estudio de gabinete - No _____ - Sí _____ - Cuáles, cuando y cómo _____
Tipo de parto: - Normal: _____ - Cesárea _____ - Observaciones _____
Complicaciones durante el embarazo - No _____ - Sí _____ - Cuáles _____
Lactancia: Seno materno _____ edad de inicio _____ duración _____ Ablactación: edad de inicio _____ tipo alimento _____
Tabaquismo de la madre o algún otro familiar cercano - No _____ - Sí _____ - Quiénn (quiénes) _____
Enfermedades respiratorias resiente en la madre o padre o algún otro familiar cercano: - No _____ -Si _____ - Cuantos familiares _____ -Familiar _____ - Tipo de enfermedad _____ - Hace cuanto tiempo _____ - Duración del padecimiento _____ - Tratamiento _____ - Tipo de contacto con el niño (a) paciente _____ -Familiar _____ - Tipo de enfermedad _____ - Hace cuanto tiempo _____ - Duración del padecimiento _____ - Tratamiento _____ - Tipo de contacto con el niño (a) paciente _____ -Familiar _____ - Tipo de enfermedad _____ - Hace cuanto tiempo _____ - Duración del padecimiento _____ - Tratamiento _____ - Tipo de contacto con el niño (a) paciente _____
Edad del padre: _____ Ocupación _____ Tabaquismo _____

EXPLORACIÓN FÍSICA DE TORAX Y PULMONES

INSPECCIÓN

- 1.- Tos _____ tipo _____
- 2.- Producción de esputo _____ tipo _____
- 3.- Hemoptisis _____ frecuencia _____
- 4.- Falta de aliento _____
- 5.- Uso de músculos accesorios durante la inspiración y la espiración _____
- 6.- Postura del paciente, si se inclina hacia adelante y con los hombros caídos hacia adelante _____
- 7.- Frecuencia respiratoria _____
- 8.- Relación inspiratoria - espiratoria _____
- 9.- Retracción de los espacios intercostales durante la inspiración _____
- 10.- Ensanchamiento nasal _____
- 11.- Respiración con fruncimiento de labios _____
- 12.- Simetría del torax _____
- 13.- Color de la piel _____
- 14.- Estado de hidratación de la piel _____
- 15.- Dedos en forma de palillos de tambor _____
- 16.- Cianosis _____
- 17.- Tipo de tos _____
- 18.- Presencia de sibilancia o ronquidos audibles _____
- 19.- Torax en forma de barril _____

PALPACIÓN

- 1.- Áreas de hiperexcitabilidad _____
- 2.- Tono muscular en m. respiratorios _____
- 3.- Frémito táctil _____

AUSCULTACIÓN

- 1.- Ruidos respiratorios bronquiales _____
- 2.- Disminución de los ruidos respiratorios _____
- 3.- Crepitaciones y ronquidos _____
- 4.- Sibilancias _____
- 5.- Roce pleural por fricción _____
- 6.- Pectoriloquia de susurro _____

PERCUSIÓN

- 1.- Tono mate de percusión si _____ no _____
- 2.- Tono hiperresonante de percusión si _____ no _____

MANIFESTACIONES CARDIO PULMONARES

- 1.- Frecuencia respiratoria _____
- 2.- Frecuencia cardíaca _____
- 3.- Presión arterial _____

APENDICE B

1.- AGUA DEPC

- * Dietilpírocarbonato al 0.1% (v/v)
- * Agua desionizada

Calentar la solución a 37°C / 1hr, posteriormente hacer alícuotas y finalmente esterilizar por autoclave

2.- SOLUCIÓN D

- * Isotiocianato de guanidina 4M
- * N - Lauril sarcosil sódico 0.5%
- * Citrato de sodio 1M pH 7.0, a una concentración final 2mM
- * Adicionar antes de usar 2 β mercapto etanol 0.1 mM

3.- TE

- * 10 mM de Tris
- * 1 mM de EDTA
- * Prepara la solución con agua DEPC

Preparar la solución a un pH final de 8.0 y conservarla a -20°C

APENDICE C

1.- REACTIVOS QUÍMICOS

2- Mercapto etanol BIO RAD 21277

2- Propanol MERCK 215882

Acetona

Agarosa certificada para Biología Molecular BIO-RAD

Alcohol etílico al 70%

Alcohol isoamílico SIGMA I-9392

Antibióticos (Ver apéndice A)

Azul de bromofenol BIORAD cat. 161-0404

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 206160r

Dietil pirocarbonato SIGMA D5758

EDTA (Etilén diaminoacetato de sodio dibásico) 99.9% de pureza SIGMA Co. 808370

Enzima Transcriptasa Reversa "SuperScript™ II RNase Reverse Transcriptase", de Gibco BRL Life Technologies™ Cat. No. 18064-014

Estreptomina SIGMA Chemical Co. Cat. S-6501

FENOL GIBCO Cat. L I 5509011 100g

Fosfato dibásico de sodio anhidro ANALIT Químico Dinamia.

Fosfato monobásico de potasio J.T. Baker Cat. 790

Glicógeno Boehringer Mannheim 1901-393

Isotiocianato de guanidina GIBCO 15535-016

N-Lauril sarcosil de sodio. SIGMA L- 5125

Penicilina SIGMA Chemical Co. Cat. PEN-NA

Tripsina de pancreas bovino SIGMA Chemical Co. 1989

Trizma SIGMA T-7149

2. - KITS DIAGNÓSTICOS

2.1. - KIT DE "DAKO, IMAGEN™ ADENOVIRUS (Catálogo K6100)" que consiste en:

A). - Anticuerpo monoclonal que detecta un epítipo de la proteína hexón del Adenovirus, la cual es expresada en todos los serotipos de Adenovirus humanos conocidos, conjugado con FITC (Isotiocianato de Fluoresceína), diluido en una solución amortiguadora con proteína estabilizadora y azul de evans como contraste y 15 mmol / L de acida de sodio como conservador

B). - Líquido de montaje, que contiene un inhibidor de fotodecoloración en una solución de PBS y glicerol.

C). - Control positivo. - Células HEp-2 infectadas con virus de Adenovirus fijadas en acetona.

2.2. - KIT DE "DAKO, IMAGEN™ PRARAINFLUENZA VIRUS GROUP (TYPES 1,2 AND 3) (Catálogo: K6103)" que consiste en:

A). - Anticuerpos monoclonales purificados específicos contra Parainfluenza tipos 1, 2 y 3, y conjugados con FITC (Isotiocianato de Fluoresceína), diluidos en una solución amortiguadora con proteína estabilizadora y azul de evans como contraste. Envasados por separado.

B). - Líquido de montaje, que contiene un inhibidor de fotodecoloración en una solución de PBS y glicerol.

C). - Control positivo. - Células Vero infectadas con virus de Parainfluenza tipos 1, 2 o 3, fijadas en acetona.

D). - Control negativo. - Células Vero sin infectar teñidas sólo con azul de evans

2.3. - KIT DE "DAKO, IMAGEN™ PRARAINFLUENZA VIRUS TYPES 1,2 AND 3 (Catálogo: K6104)" que consiste en:

A). - Mezcla de anticuerpos monoclonales purificados específicos contra Parainfluenza tipos 1, 2 y 3, y conjugados con FITC (Isotiocianato de Fluoresceína), diluidos en una solución amortiguadora con proteína estabilizadora y azul de Evans como contraste.

H). - Líquido de montaje, que contiene un inhibidor de fotodecoloración en una solución de PBS y glicerol.

C). - Control positivo. - Portaobjetos con tres pozos y cubierta de teflón, cada pozo contenía células Vero infectadas con uno de los tres tipos de Parainfluenza (1, 2 y 3) y fijadas en acetona.

D). - Control negativo. - Células vero sin infectar teñidas sólo con azul de evans

2.4. - KIT "ABBOTT TESTPACK @ RSV (Catálogo: 2027)" que contiene:

A). - Buffer para tratamiento de la muestra, con 16mg/mL de ditioreitol

B). - Anticuerpo policlonal de origen bovino contra RSV, unido a micropartículas

C). - Anticuerpo policlonal de origen bovino contra RSV, conjugado con 0.5 µg/mL de biotina

D). - Anticuerpo policlonal de origen de conejo contra biotina, conjugado con 0.5 µg/mL de fosfatasa alcalina

E). - Hidrocloridrato de guanidina 1.0 M

F). - Cromógeno al 0.01%

G). Hidrocloridrato de guanidina 1.0 M

H). - Disco de reacción con Virus Respiratorio Sincitial inactivado

I). - Pipetas de plástico desechables (del kit)

J). - Contenedores de muestra y dispositivo de filtrado (del kit)

K). - Guantes de latex

2.5. - KIT DE "KALLESTAD™, DIAGNOSTIC INC., PATHFINDER HERPES SIMPLEX VIRUS TYPES 1 Y 2 (Catálogo 107950F)" que consiste en:

A). - Anticuerpos monoclonales contra HSV -1 y anticuerpos monoclonales contra HSV-2

B). - PBS, pH 7.3 +/- 0.10

C). - Laminilla de control positivo y negativo. - con cuatro pozos, cada uno con células Vero. Dos sin infectar, uno infectado con HSV-1 (ATCC cepa F-1) y HSV-2 (ATCC cepa MS).

3. - SUEROS Y MEDIOS

Medio de transporte viral (Ver apéndice A)

Suero fetal bovino (irradiado) Bioexport.

D-MEM (Dulbecco's modified Eagle medium) GIBCO BRL (Ver apéndice A)

4. - MATERIAL DE LABORATORIO

Bulbo de latex

Gasas

Jeringas hipodérmicas estériles de 1 mL (insulínicas) y de 10 mL

Mechero

Placas de hemaglutinación o de microtitulación de 96 pozos con fondo redondo

Portaobjetos con 2 espacios marcados

Portaobjetos con 8 espacios marcados

Tijeras estériles

5. - EQUIPO DE LABORATORIO

Ovoscopio

Microscopio de fluorescencia

Microscopio estereoscópico

Termociclador

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

6. - MATERIAL BIOLÓGICO

6.1. - LÍNEAS CELULARES

A). - MRC-5

Línea celular MRC-5 (ATCC = CCL 171): Línea diploide de pulmón humano proveniente de feto masculino de catorce semanas de edad. Se emplaron células MRC-5 generación 38. Crecidas en medio D-MEM

B). - VERO

Línea celular VERO (ATCC=CCL81): Línea extraída de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Se emplearon células generación 169

6.2. - VIRUS RSV

Cepa Long de RSV tipo A (ATCCVR - 26 American Type Culture Collection, Rockville MD, U.S.A.) donadas por el Doctor Trudel del Instituto Armand Frappie.

6.3. - EMBRIÓN DE POLLO PARA EL AISLAMIENTO DEL VIRUS DE INFLUENZA.

Embriones de pollo de 11 días de edad, que el proveedor ALPES (Aves Libres de Patógenos Específicos, S.A. de C.V.) garantiza que están libres de los siguientes patógenos (Tabla5):

TABLA 5 : LOS HUEVOS EMBRIONADOS DE POLLO QUE SEMPLEARON EN EL PRESENTE ESTUDIO SE ENCONTRARON LIBRES DE LOS PATÓGENOS CITADOS.

AGENTE	CEPA	ENSAYO	RESULT.
Síndrome de la baja postura	Mc Ferran	IH	(-)
V. de Leucosis linfoide	RSV-RAV A	MN	(-)
V. de Leucosis linfoide	RSV-RAV B	MN	(-)
V. de Leucosis linfoide	A,B,C,D,E	COFAL, EIA	(-)
Mycoplasma sinoviae	WWV 1853	ARP, IH	(-)
Mycoplasma gallisepticum	A5969	ARP, IH	(-)
Salmonella pul-gall	Comercial	ARP, MA, AB	(-)
V. de la bronquitis infecciosa	MASS	IH	MG 160 (-)
V. de la enfermedad de Newcastle	SOTA	IH	MG 360 (-)
V. de la Influenza aviar	H5N2	INMUNODIF.IH	(-) < 5

Connotaciones:

AB = Aislamiento bacteriológico

ARP= Aglutinación rápida en placa

COPAL= Fijación de complemento para la detección del virus de la leucosis aviar

EIA = Ensayo inmuno enzimático

IH = Inhibición de la hemaglutinación en yema

MA= Micro aglutinación en placa

MN= Micro virus suero neutralización

6.4. - EXUDADOS FARÍNGEOS

Las muestras se obtuvieron de los hospitales "DR. GEA GONZALEZ, S.S.A" y "VENADOS, IMMS" proporcionadas por el Dr. Oscar Thompson (26 muestras) y del INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA proporcionadas por el Dr. José Luis Catañeda J. (65 muestras).

Las muestras consistieron en aspirados o de exudados nasofaríngeos, provenientes de pacientes hospitalizados menores diez años de edad con diagnóstico clínico de Enfermedad Aguda del Tracto Respiratorio Inferior (EATRI).

6.5. - HEMAGLUTINACIÓN PARA DETECTAR VIRUS HEMAGLUTINANTE

Eritrocitos de pollo diluidos al 5% en PBS.

7. - REACTIVOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

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 U.N.A.M. (AMPLIFICASA, BOTECSA-MÉXICO)

dATP Trifosfato de desoxiadenosina GIBCO BLR Cat. 8252SA

dCTP Trifosfato de desoxicidina GIBCO BLR Cat. 18253-013

dGTP Trifosfato desoxiguanosina GIBCO BLR Cat. 18254-011

dTTP Trifosfato desoximidina GIBCO BLR Cat. 28025-013

Marcadores de peso molecular ϕ X174 RF DNA/ Hae III GIBCO Cat. 5611SA

λ y PBR 322-Mps Y donados por el Dr. Rogelio Alonso Morales.

Iniciadores : que van de la posición 858 a la 1,135 del gen N del RSV. Con las siguiente secuencia:

N1= 5' GGAACAAGTTGTTGAGGTTTATGAATATGC 3'

N2= 5' CTTCTGCTGTCAAGTCTAGTACACTGTAGT 3'

Sintetizados comercialmente por Laboratorios Boheringer - Lakeside

8. - BASE DE DATOS

Todos los resultados de este trabajo fueron capturados en una base de datos de acuerdo al programa Excel versión 5.0 de Microsoft Office.

FIGURA 1.- APARATO EMPLEADO PARA EL ASPIRADO NASOFARÍNGEO

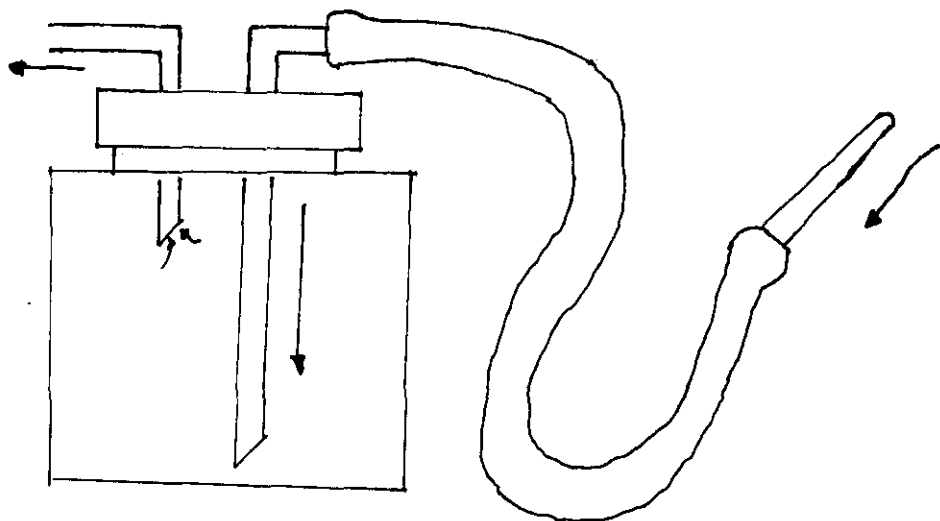


FIGURA 2.- ETIQUETA EMPLEADA PARA IDENTIFICAR LA MUESTRA

FECHA	Fecha de toma de muestra
EXPEDIENTE	Cleve del expediente que maneja el hospital
CLAVE	Clave con la se manejo la muestra en el presente estudio
NOMBRE	Nombre de la paciente o en algunos casos de la madre
EDAD	Edad del paciente

FIGURA 3 .- LAVADO NASOFARÍNGEO



FIGURA 4.- INOCULACIÓN A EMBRIÓN DE POLLO POR VÍA AMNIÓTICA Y ALANTOIDEA

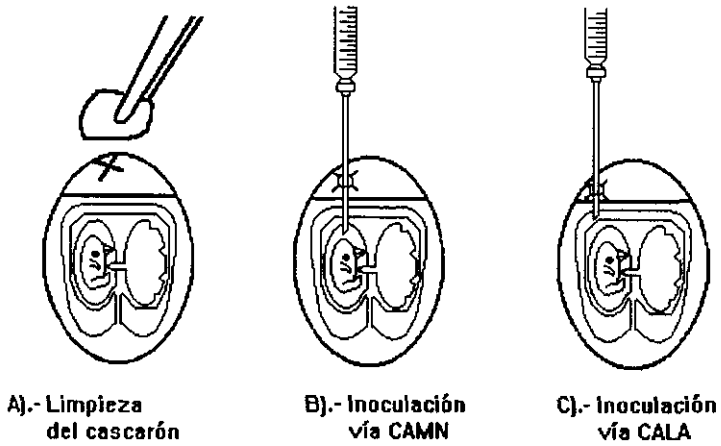
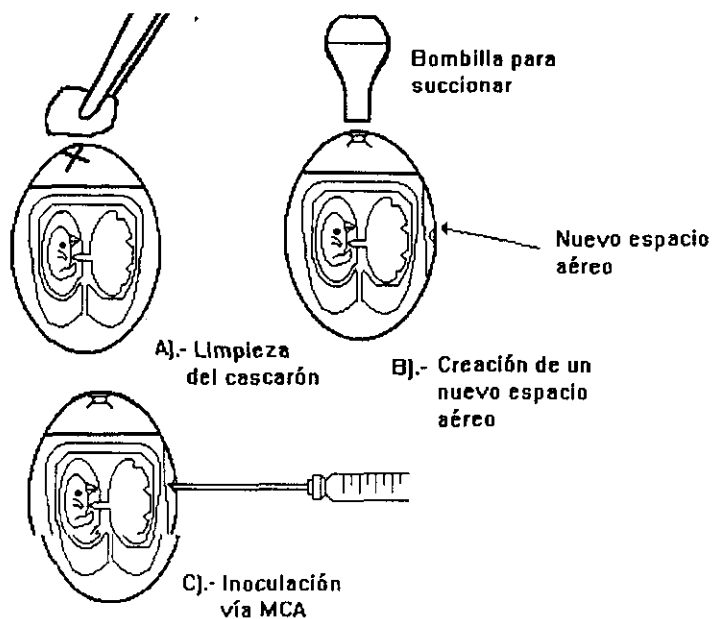


FIGURA 5.- INOCULACIÓN DE EMBRIÓN DE POLLO POR LA VÍA DE LA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA



BIBLIOGRAFÍA

- 1 Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). Libro de Estadística Demográfica de 1995 (Cuaderno de población No.8), basado en datos de Serv. Nal de Salud, Sec. Salud, Institutos Nals., IMSS, IMSS-Solidaridad, ISSSTE, SEDENA, SEMAR, PEMEX, DDF.
- 2 Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). Libro de Información Estadística del Servicio de Salubridad y Seguridad Social de 1995 (Cuaderno No. 13) basado en datos de Serv. Nal de Salud, Sec. Salud, Institutos Nals., IMSS, IMSS-Solidaridad, ISSSTE, SEDENA, SEMAR, PEMEX, DDF.
- 3 Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). Libro de Mortalidad Anual de 1995. Basado en datos de Serv. Nal. de Salud, Sec. Salud, Institutos Nals., IMSS, IMSS-Solidaridad, ISSSTE, SEDENA, SEMAR, PEMEX, DDF.
- 4 Casasola F.J. Agentes virales causales de infecciones respiratorias. En: García GML, Giono Cerezo S, Pacheco CR, Escobar GA y Valdespino GJL edtrs. Infecciones Respiratorias Agudas y Crónicas. 1ª impresión. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud. México DF. Oct. 1994. Cap. 1, 3ª Sección
- 5 Rodríguez AMG. Agentes virales causantes de neumonías. En: García GML, Giono Cerezo S, Pacheco CR, Escobar GA y Valdespino GJL edtrs. Infecciones Respiratorias Agudas y Crónicas. 1ª impresión. México DF. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud. Oct. 1994. Cap. 9, 3ª Sección
- 6 White DO and Fenner FJ. Medical Virology, 1994. 4th Edtn., Academic Press.
- 7 Couch RB. Respiratory Diseases. In: Galasso GJ, Whitley RJ, and Merigan TC. Antiviral agents and viral diseases of man editors. 3rd edtn. New York. Raven Pres; 1990 Chapter 10
- 8 Rhodes AJ and Van Royen CE. Respiratory syndromes. In: Textbook of Virology. 5th edtn. The williams and Wilkins. 1970 Chapter 1.
- 9 Velazco CJG. Virus de la influenza. En: García GML, Giono Cerezo S, Pacheco CR, Escobar GA y Valdespino GJL edtrs. Infecciones Respiratorias Agudas y Crónicas. 1ª impresión. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud, Edts.;; México,D.F.; Oct 1994. Cap. 6, 3ª Sección
- 10 Falsey AR, Cunninham CK, Barker WH, Kouides RW, Yuen JB, Menegus M, Weiner L.B, Bonville CA and Betts RF. Respiratory Syncytial Virus and Influenza A infections hospitalized elderly. J Inf Dis 1995 Aug; 172 : 389-394
- 11 Bakova AA. The use of monoclonal antibodies for detecting the influenza virus. Vopr Virusol 1994; 39 (4) :187-189.
- 12 Ian RF. Culture of animal cells. In: Wiley - Liss editors. A manual of basic technique. 2nd. edtn. 1990.
- 13 Lamb RA and Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In : Fundamental Virology. 3th, edtn.1996 Chapter 20.
- 14 Gómez-García B: Virus Sincicial Respiratorio. En: García GML, Giono Cerezo S, Pacheco CR, Escobar GA y Valdespino GJL edtrs. Infecciones Respiratorias Agudas y Crónicas. 1ª impresión. México DF. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud. Oct 1994. Cap. 8, 3ª Sección.
- 15 Jacobs JW, Peacock DB, Corner BD, Caul EO and Clarke SKR. Respiratory Syncytial and other viruses associated with respiratory disease in infants. Lancet 1971 May 1: 871 - 876.

- 16 Mc Intosh K. Respiratory Syncytial Virus. In : *Infection diseases*, Section 4, Chapter 218, Part VII: Viral Infection. pp 904 - 906.
- 17 Mufson, M.A. and Belshe, R.B.: Respiratory Syncytial Virus and the Parainfluenza Viruses. (Chapter 87). *Viral, Rickettsial and Chlamydial*
- 18 Collins PL, Mc Intosh K and Chanock MR. Respiratory Syncytial Virus. In: *Fields Virology*. Third Edtn. Raven Publishers. 1996 Philadelphia. Chapter 44.
- 19 Denny FWJr. The clinical impact of human respiratory virus infections. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 Oct; **152** (4 Pt 2) : S4-S12.
- 20 Lamprecht CL, Krause HE and Mufson MA. Role of maternal antibody in pneumonia and bronchiolitis due to Respiratory Syncytial Virus. *J. Infect. Dis.* 1976 Sept; **134** (3): 211 - 217.
- 21 Gilchrist S, Török J, Gary HE, Alexander JP and Anderson LJ. National surveillance for Respiratory Syncytial Virus, United States, 1985-1990. *J Infect Dis* 1994 Oct; **170** : 986-990.
- 22 Florman AL and McLean LC. The effect of altitude and weather on the occurrence of outbreaks of respiratory syncytial virus infections. *J Infect Dis* 1998 Dec; **158** (6): 1401-1402.
- 23 Isselbacher KJ, Braundwald E, Wilson JD, Martin JP, Fauci AS and Kasper DL. *Principios de medicina interna*, 13ª Edcn., Interamericana - McGraw Hill 1995.
- 24 Manjarrez ZME. Aislamiento del Virus Sincicial Respiratorio de niños hospitalizados con infecciones respiratorias agudas; Tesis de la Maestría en Ciencias Biomédicas en la U.N.A.M.; México, D.F. (1991)
- 25 Monto AS. Epidemiology of respiratory viruses in persons with and without asthma and COPD. *Am J of Resp and Crit Care Med* 1995; **151**: 1653 - 1658.
- 26 Suarez y Gamba, E.P. Virus de la Parainfluenza. En: García GML, Giono Cerezo S, Pacheco CR, Escobar GA y Valdespino GJL edtrs. *Infecciones Respiratorias Agudas y Crónicas*. 1ª impresión. México DF. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud. Oct 1994. Cap. 7, 3ª Sección.
- 26.A.- Talis A and McIntosh K. Respiratory Syncytial Virus. In: *Viruses* Chapter 83
- 26.B.- Berkow R And Fletcher AJ. *El manual Merck de diagnóstico y terapéutica*. 8ª Edcn., Edcs. Doyma 1989.
- 27 Ahluwalia G, Embree J, McNicol P, Law B and Hammond GW. Comparison of nasopharyngeal aspirate and nasopharyngeal swab specimens for Respiratory Syncytial Virus diagnosis by cell culture, indirect immunofluorescence assay, and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1987 May; **25** (5): 763 - 767.
- 28 Arens MQ, Swierkosz EM, Schmidt RR, Armstrong T and Rivetna KA. Enhanced isolation of Respiratory Syncytial Virus in cell culture. *J Clin Microbiol* 1986 April; **23** (4): 800 - 802.
- 29 Hierholzer JC, Castells E, Banks GG, Bryan JA and McEwen CT. Sensitivity of respiratory and other human viruses. *J Clin Microbiol* 1993 Jun; **31** (6) :1504-1510.
- 30 Hughes JH, Mann RD and Hamparian VV. Detection of Respiratory Syncytial Virus in clinical specimens by viral culture, direct and indirect immunofluorescence, and enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1988 Mar; **26** (3): 588 - 591.
- 31 Bell DM, Walsh EE, Hrushka JF, Schnabel KC and Hall CB. Rapid detection of Respiratory Syncytial Virus with a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 1983 Jun; **17** (6): 1099 - 1101.

32 Falsey AR, McCann RM, Hall WJ and Criddle MM. Evaluation of four methods for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in older adults. *J Am Geriatr Soc* 1996 Jan; **44** (1): 71-3.

33 Freymuth F, Brooks W, Petitjean J, Daon F and Constantini S. Evaluation of an enzyme membrane immunoassay (Directigen RSV) for the rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *Pathologie Biologie* 1991 Apr; **39** (4): 283-6.

34 Freymuth F, Eugene G, Vabret A, Petitjean J, Brouard J, Duhamel JF and Guillois B. Detection of Respiratory Syncytial Virus by reverse transcription-PCR and hybridization with a DNA enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1995 Dec.; **33** (12): 3352-3355.

35 Hornsleth A. A rapid test for detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretion. *Europ J Clin Micro Infect Dis.* 1990 May; **9** (5) :356-8.

36 Kanestrom A and Myrnel H. Quick diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *Tidsskrift for den norske laegeforening.* 1996 May; **116** (12): 1461-3.

37 Kok T, Barancek K and Burell CJ. Evaluation of the Beckton Dickinson Directigen test for respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *J Clin Micro* 1990 Jun; **28** (6).

38 Mendoza J, Rojas A, Navarro JM, Plata C and De la Rosa M. Evaluation of three rapid enzyme immunoassays and cell culture for detection of respiratory syncytial virus. *Eurp J Clin Microbiol & Infect Dis* 1992; **11** (5) : 452-4.

39 Michaels MG, Serdy C, Barbadora K, Green M, Apalsch A and Wald ER. Respiratory syncytial virus: a comparison of diagnosis modalities. *Ped Infect Dis J* 1992 Aug ; **11** (8).

40 Rothbarth PH, Hermus MC and Schrijnemakers P. Reliability of two new test kits for rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *J Clin Microbiol* 1991 Apr ; **29** (4) : 824-6.

41 Warner JL, Whitehurst NJ, Todd SJ, Shalaby H and Wall L.V. Comparison of directigen RSV with viral isolation and direct immunofluorescence for the identification of respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol* 1990 Mar ; **28** (3): 480-3.

42 Halstead DC, Todd S and Fritch G. Evaluation for five methods for respiratory syncytial virus detection. *J Clin Microbiol* 1990 May; **28** (5): 1021-5.

43 Tantivanich S, Klongkamnuankarn K and Desakorn V. Simplified, rapid diagnosis of Respiratory Syncytial Virus from clinical specimens. *Asian Pc J Allergy Immunol* 1997 Jun; **15** (5): 99-103.

44 Englund JA, Piedra PA, Jewell A, Patel K, Baxter BB and Whinbey E. Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infections in immunocompromised adults. *J Clin Microbiol* 1996 Jul; **34** (7): 1649-53.

45 Hendry, R.M.; Pierik, L.T. and McIntosh, K.: Comparison of washed nasopharyngeal cells and whole nasal secretions for detection of Respiratory Syncytial Virus antigens by enzyme-linked immunosorbed assay.; *J. Clin. Microbiol.*, Vol **23**, No. 2, pp 383 - 384, Feb (1986)

46 Cane, P.A. and Pringle, C.R.: *Molecular epidemiology of Respiratory Syncytial Virus: a review of the use of reverse transcription-polymerase chain reaction in the analysis of genetic variability.* *Electrophoresis*, Vol. **16**, No. 3, pp 329-333, Mar (1995)

47 Gottschalk, J.; Zbinden, R.; Kaempf, L. and Heinzer, I.: Discrimination of Respiratory Syncytial Virus subgroups A and B by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* Vol. **34**, No. 1, pp 41-43, Jan. (1996)

48 Paton, W.A.; Paton, J.C.; Lawrence, A.J., Goldwater, P.N. and Harris, R.J.: Rapid detection of Respiratory Syncytial Virus in nasopharyngeal aspirates by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *J Cl Microbiol*, Vol **30**, No. 4, pp 901-904, Apr (1992)

- 49 Ramadan, H.H.; Farr, R.W. and Wetmore, S.J.: Adenovirus and Respiratory Syncytial Virus in chornic sinusitis using polymerase chain reaction. *Laryngoscope*, Vol. **107**, No. 7, pp 923-925, Jul. (1997).
- 50 Tantivanich, S.; Suphanaranonda, K.; Balachanda, K. and Anderson, R.: Detection of Respiratory Syncytial Vyrus from clinical specimens:comparason between reverse transcription polymerase chain reaction and tissue culture. *Southeast Asian J. Trop Med. Public Health*, Vol. **26**, No. 4, pp 684-688, Dec. (1995).
- 51 Valdivia, A.; Savon, C.; Chacon, D.; Sarmiento, L.; Otero, A.; Stot, Y.; Ororpesa, S. and Goyonechea, A.:Analysis of Respiratory Syncytial Virus in clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction restriction mapping. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. **92**, No. 3, pp 389-393, May (1997)
- 52 van Milaan, A.J.; Sprenger, M.J.; Rotherbarth, P.H.; Branderburg, A.H.; Masurel, N. And Claas, E.C.: Detection of Respiratory Syncytial Virus by RNA-polymerase chain reaction and differentiation of subgroups with oligonucleotide probes. *J. Med. Virol.*, Vol. **44**, No. 1, pp 80-87, Sep (1994)
- 53 Yoshio, H.; Yamada, M. And Nii, S.: Reverse transcription-polymerase chain reaction amplification of Respyratory Syncytial Virus genome from neonatal nasal swab samples. *Acta Paediatr Jpn*, Vol.**38**, No. 5, pp 429-433, Oct (1996)
- 53.A Meteyard, J.D. and Young, P.R.: Optimization of PCR and automated sequencing of clinical isolates of Respiratory Syncytial Virus. *J. Virol. Meth.* Vol. **50**, No. 1-3, pp 335-341. Dec. (1994)
- 54 McLean, D.M.D.; *Virological infections*, pp 471-486, Charles, C. Tomas Publs. (1989)
- 55 Alvarez y Muñoz, M.T.: Adenovirus causantes de infecciones respiratorias. (Cap. 3), 3ª Sección : Infecciones Respiratorias Agudas y Crónicas. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaria de Salud, Edts.: García, G.M.L.; Giono Cerezo, S.; Pacheco, C.R.; Escobar, G.A. y Valdespino, G.J.L.: 1ª impresión, México,D.F.; Oct. (1994)
- 56 Anan'ev, A.V.; Stakhanova, V.M.; Shumkina, O.B.; Mal'khanov, V.B. and Zhilina, N.N.: Cultivation of several viruses in organ cultures developing on chick embryo chorioallantoic membranes. *Vopr. Virusol.*, Vol. **18**, No. 5, pp 597-603. Sep (1973)
- 57 Andrzejewski, J. And Bogunowicz, A.: A modified method of inoculation of chorioallantoic membranes for virus cultivation. *Zentralbl Bakteriol*, Vol. **201**, No. 4, pp 432-434, Dec. (1966)
- 58 Goodman, J.L.; Cook, M.L.; Sederati, F.; Izumi, K. And Stevens, J.C.: Identification, transfer and characterization of cloned herpes simplex virus invasive regions. *J. Virol.*, Vol. **63**, No. 3, pp 1153-1161 Mar. (1989)
- 59 Herrod, H.A.; Mc Lean, B.; Hambling, M.H. and Halliburton, I.W.: Efficiency of the use of pock size on the chorioallantoic membrane of fertile hen's egges as a method of typing herpes simplex viruses. *J. Hyg. (Lond)*, Vol. **93**, No. 1, pp 95-103, Aug. (1984)
- 60 Rodgers, F.G.: Growth of herpes simplex virus types 1 and 2 in tissues of fertile hen's eggs in ovo and in vitro. *Br. J. Exp. Pathol.* Vol. **62**, No. 3, pp 317-322, Jun (1981)
- 61 Blawat, F.; Kubica, B. And Kwiatkowski, B.: Electron microscopic observation on the development of variola virus in chick embryo chorioalantoic membrane cells. *Biul Inst Med Morsk Gdansk*, Vol. **21**, No. 1, pp 43-46, (1970)
- 62 Marennikova, S.S. and Shafikova, R.A.: Comparative studies on the properties of variola virus strain. I. Characteristics of chorioallantoic membrane lesions and pathogenicity for chick embryos after different methods of inoculation. *Acta Virol*, Vol 13, No.6, pp 538-543, Nov. (1969)

- 63 Tarantola, D.J.; Huq, F. Nakano, J.H. and Foster, S.O.: Immunofluorescence staining for detection of variola virus. *J. Clin. Microbiol.*, Vol. **13**, No. 4, pp 723-725, Apr. (1981)
- 64 Cerini, C.P.; Arguedas, J.; Hernandez, G.; Frickey, P. And Douglas, A.V.: Chorioallantoic membrane measles: development and clinical evaluation of a new further attenuated measles vaccine. *Appl Microbiol*, Vol. **27**, No. 4, pp 763-766, Apr. (1974)
- 65 Ueda, S.; Takahashi, M.; Minekawa, Y.; Oginó, T. And Suzuki, N.: Studies on further attenuated live measles vaccine. I. Adaptation of measles virus to the chorioallantoic membrane of chick embryo and clinical test on the strain. *Biken J.*, Vol. **13**, No. 2, pp 111-116, Jun. (1970)
- 66 Hosai, H.; Yamanashi, K.; Ueda, S.; Minekawa, Y. And Oginó : Studies on live attenuated mumps virus by several passage in the chorioallantoic membrane of chick embryos and field trials by the inhalation method. *Biken J.*, Vol. **13**, No. 2, pp 121-126, Jun. (1970)
- 67 Yamanashi, K.; Hosai, H.; Ueda, S.; Takahashi, M. And Okuno, Y. : Studies on live attenuated mumps virus . II. Biological characteristics of the strain adapted to the amniotic and chorioallantoic cavity of developing chick embryos. *Biken J.*, Vol. **13**, No. 2, pp 127-132, Jun. (1970)
- 68 Fazely, F.; Moses, D.C. and Ledinko, N.: Effects of retinoids on invasion of organ cultures of organ cultures of chick chorioallantoic membrane by adenovirus transformed cells. *In Vitro Cell Dev Biol.*, Vol. **21**, No. 7, pp 409-414, Juli (1985)
- 69 Takase, K.; Baba, J.M.; Nishi, R.; Fujikawa, H. And Yamada, S.: Comparison of agar-gel precipitin responses among strains of fowl adenovirus using antigens prepared from chorioallantoic membranes and chicken kidney cell cultures. *J. Vet. Med. Sci.*, Vol. **57**, No. 2, pp 327-330, Apr (1995)
- 70 Zuckerman, A.J.: Tissue and organ culture studies of hepatitis B virus. *Am J. Med. Sci.*, Vol. **270**, No. 1, pp 197-204, Jul. (1975)
- 71 Samuel I.; Mihail, A.; Teodosiu, O.; Barnaure, F.; Coban, E.; Petrescu, A. And Matinca, D.: Comparative results of respiratory virus isolation attempts in chorioallantoic membrane fragments and embryonated chicken eggs. *Virologie*, Vol. **32**, No. 4, pp 297-303, (1981)
- 72 Samuel, I.; Tomas, E. And Barnaure, F.: Investigations concerning the cultivation of myxo- and paramyxoviruses and chorioallantoic membrane fragments. Note I. Data on multiplication of several myxo- and paramyxoviruses. *Virologie*, Vol. **32**, No. 2, pp 145-154, Apr (1981)
- 73 Aktypi, A.; Costache, M.; Repanovici, R. And Popa, L.M.: Isolation of poly(A) - rich mRNA from the chorioallantoic membrane of Sendai virus-infected chick embryos. *Virologie*, Vol. **36**, No. 4, pp 235-240, (1985)
- 74 Tannock, G.A.; Hierholzer, J.C.; Bryce, D.A.; Chee, C-F. and Paul, J.A.: Freeze- Drying of Respiratory Syncytial Virus for transportation and storage.; *J. Clin. Microbiol.*; Vol **25** , No. 9, pp 1769 - 1771, Sept (1987)
- 75 Hall, B.C. and Douglas, R.G.:Clinically useful method for the isolation of Respiratory Syncytial Virus.; *J. Infect. Dis*, Vol **131**, No 1, pp 1 - 5, Jan (1975)
- 76 Meguro, H.J.; Bryant, D. Torrence, A.E. and Wright, P.F.: Canine kidney cell line for isolation of respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.*, Vol. **9**, No. 2, pp 175-79, Feb (1979)
- 77 Lina, B.; Valette, M.; Foray, S.; Luciani, J.; Stagnara, J.; See, D.M. and Aymard, M.: Surveillance of community-acquired viral infections due to respiratory viruses in Rhone-Alpes (France) during winter 1994 to 1995. *J. Cl. Microbiol*, Vol. **34**, No. 12, pp 3007-3011, Dec (1996)

78 Zelaya, E.A.C.; Peterson, C.A., Forsgren, M.; Orvell, C. And Strannegard, O.: Respiratory Syncytial Virus infection in hospitalized patients and healthy children in El Salvador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 51, No. 5, pp 577-584 (1994)

79 Freymuth, F.; Vabret, A.; Galateau-Salle, F.; Ferrey, J.; Eugene, G.; Petitjean, J.; Brouard, J.; Jokik, M.; Duhamel, J.F. and Guillois, B.: Detection of Respiratory Syncytial Virus, Parainfluenza 3, Adenovirus and Rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization. *Clin. Diagn. Virol.* Vol. 8, No. 1, pp 31-40, may (1997)

80 Gutierrez, G. And Gomez, J.R.: The role of virus infections of the lower respiratory tract in children of Mexico city. *Minerva Pediatr.* Vol 22, No. 26, pp 1330, Jun (1970)

81 Pizarro, S. E. y Medina, G.G.: Respiratory viruses in infants with severe symptoms. *Rev Latinoam Microbiol.* Vol. 20, No. 3, pp 185-188, Jul (1978)

82 Golubjatnikov, R.; Allen, V.D.; Olmos-Blancarte, M.P. and Inhorn, S.L.: Serologic profile of children in mexican highland community: prevalence of complement-fixing antibodies to *Mycoplasma pneumoniae*, respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. *Am J Epidemiol.* Vol. 101, No. 5, pp 458-464, May (1975)

83 Golubjatnikov, R.; Filloy, L. And Olmos, P.: Serologic survey for determination of antibodies against various virus infections, *Mycoplasma*, beta hemolytic A streptococcus and *Toxoplasma gondii*, performed on children of state-of-Mexico municipality. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* Vol. 34, No. 4, pp 787-796, Jul (1977)

84 García Ramos, E.; Pizarro Suarez, E.; Sapián, L.A. y Lugo de la Fuente, G.: Epidemiologic and etiologic study of acute respiratory infections in children under 5 years of age. *Rev. Latinoam Microbiol.* Vol. 33, No. 2-3, pp 109-119, Apr (1991)

85 López Perez, G.T. et al.: Virus precipitating asthmatic crises. *Rev Alerg Mex.* Vol. 40, No. 5, pp 135-138, Sep (1993)

86 Murguía-de Sierra, T.; Casasola-Flores, J.; Rosales-Urban, S.; Nava-Ibarra, V. Y Navarrete-Navarro, S.: Outbreak of respiratory syncytial virus at a neonatal intensive care unit in Mexico city. *Bol Med Hosp Infant Mex.* Vol 50, No. 10, pp 709-716, Oct (1993)

87 Romero, V.J.; Rubio, A.M.; Corral, O.; Pacheco, S.; Agudo, E. and Picazo, J.J.: Community-acquired respiratory infections. *Enfer. Infecc. Microbiol. Clin.*, Vol. 15, No. 6, pp 289-298, Jun. (1997)

88 Sarmiento, S.R.E. y Tirado, M.R.G.: Aislamiento del Virus Sincitial Respiratorio de niños hospitalizados con infecciones respiratorias agudas; Tesis mancomunada para la Licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo de la U.N.A.M.; México, D.F.; (1990)

89 Tirado, R.; Sarmiento, R.E.; Bustos, J.; Thompson, O. and Gomez, B.: Occurrence of Respiratory Syncytial Virus subtypes in mexican infants with acute lower respiratory tract disease.; *Archi. Med. Res.*, Vol 26, pp 121- 126 (1995)

90 Cosío, V.I.; Celis, S.A. y Cosío, P.M.: Aparato Respiratorio, Edtr. Mendez, O.F.; 9ª edición; México, D.F.; (1976)

91 Chétien, J.: Manual de Neumología.; Edt Toray - Masson, S.A., pp 40; España, (1978)

92 Des Jardins, T.: Enfermedades respiratorias manifestaciones clínicas. ; Edt. RRT, El Manual moderno; Caps.: 1, 6 y 19 (1993)

93 Ioannou, J. : Atlas d' Endoscopie bronchologique, aspects normaux et pathologiques; Edtr. Masson et Cie.; France, Paris.; (Chapitre 2), pp 3 - 7 (1967)

94 Stern, R.C.: Bronchitis (Chapter 337), Part XIX The respiratory system, Section 3 The lower respiratory tract.

95 Vaughan, V.C.; McKay, R.J. and Berhamn, R.E.: Nelson Textbook of pediatrics.; Edt. W.B. Saunders. Chapters 218, 337 and 338 (1989)

96 Hanks, J.H. and Wallace, R.E.: Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* **71** (1949)

97 Trudel, M. And Payment, P.: Methods and technics in Virology. Marcel Dekker, Inc. (1993).

98 Chomzaynsky, P. And Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium Thiocyanate-phenol-chloroform extraction; *Anal Biochem.*, Vol **162**, pp 156-159 (1987).

99 Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. and White, T.J.: PCR Protocols, a guide to methods and applications. Academic Press (1990).

100 Sambrook; Fritsch and Maniatis : Molecular cloning a laboratory manual, 2nd. Edtn. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1987)

101 Steiner N, Petrescu A, Zaharia CN, Birnaure F, Mihail A and Jucu V. Epidemiological and virological research on influenza and viral respiratory infections in south-eastern Romania during the cold season, 1991-1992. *Rom J Virol* 1992 Jul-Dec; **43** (3-4): 185 - 93

102 Freymuth F, Vabret A, Galateau F, Brouard J, Eugene G, Petitjean J, Gennetay E. Etiology and diagnostic of viral bronchopneumonias. *Ann Biol Clin* 1998 Jan-Feb; **56** (1): 29 - 40

103 Freymuth F, Vabret A, Galateau-Salle F, Ferey J, Eugene G, Petitjean J, Gennetay E, Brouard J, Jokik M, Duhamel JF and Guillois B. Detection of respiratory syncitial virus, parainfluenza virus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polimerase chain rection and hybridization. *Clin Diagn Virol* 1997 May; **8** (1): 31 - 40

104 Monto AS, Lehmann D. Acute respiratory infection (ARI) in childre: prospects for prevention. *Vaccine* 1998 Oct; **16** (6): 1582 - 8

105 Bakir TM, Halawani M and Ramanian S. Viral etiology and epidemiology of acute respiratory infections in hospitalized Saudi children. *J Trop Pediatr*, 1998 Apr ; **44** (2): 100-3

106 Tecu C, Gherghina I, Constantinescu C, Chirita C, Ionita E, Alexandrescu V, Matepiuc M and Lupulescu E. Viral etiology of acute respiratory infections in infants and young children. *Roum Arch Microbiol Immunol* 1996. Oct-Dec; **55** (4): 333 - 9

107 Videla C, Carballal G, Misirlian A and Aguilar M. Acute lower respiratory infections due to respiratory syncitial virus and adenovirus among hospitalized children in Argentina. *Clin Diag Virol* 1998 May; **10** (1): 17-23

108 Baumeister E, Fernandez Cobo M, Pontoriero A and Savy V. Characterization of isolated adenovirus with acute lower respiratory infection in pediatrics. *Enfer Infec Microbiol Clin* 1997 Dec; **15** (10) : 528 - 31

109 Han BK, Son JA, Yoon HK and Lee SI. Epidemic adenoviral lower respiratory tract infection in pediatric patients : radiographic and clinical characteristics. *AJR Am J Roentgenol* 1998 Apr; **170** (4): 1077 - 80

110 al Rashed . Role of *Mycoplasma pneumoniae* in acute respiratory-tract infections in Saudi paediatric patients. *Amm Trop Med Parasitol* 1998 Jul; **92** (5): 595 - 601

111 Krause Y, Schonfeld T, Ben-Ari J, Offer I and Garty BZ. Prolonged croup due to herpes simplex virus infection. *Eur J Pediatr* 1998 Jul; **157** (7): 567 - 9