

47



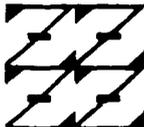
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

FRECUENCIA DEL VIRUS SINICIAL RESPIRATORIO
(VSR) EN NIÑOS MENORES DE 2 AÑOS DE EDAD
QUE FALLECIERON CON NEUMONIA EMPLEANDO
LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA
(PCR).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
**LICENCIATURA DE QUIMICO
FARMACEUTICO BIOLOGO**
P R E S E N T A :
ANA LILIA PEÑA ARGUELLES

U N A M
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO ES
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: O.F.B. MA. ELENA BUSTAMANTE CALVILLO
ASESOR DE TESIS: O.F.B. ROBERTO CRUZ GONZALEZ MELENDEZ

JUNIO DE 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

La presente tesis fue realizada en el Laboratorio de Virología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Los organismos que apoyaron la elaboración de este trabajo fueron el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Fundación Mexicana para la Salud.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Gracias por encausarme en la senda de la superación, por darme la fuerza y el valor suficiente para lograr una más de mis metas, por iluminar día a día mi camino y mostrarme la magnitud de tu amor a cada instante.

A MIS PADRES LUCIA Y PABLO

Por mi oportunidad de existir, por su gran cariño, comprensión y sobre todo por sus sacrificios realizados durante todos mis estudios, porque sin ustedes no hubiera sido posible la culminación de mi profesión, por darme animos cuando más lo necesite impulsandome siempre hacia adelante, por ser los mejores padres, por ser mis grandes amigos. Por todo esto y más GRACIAS.

A MI ESPOSO PEDRO

Por tu apoyo incondicional, confianza, nobleza y amor, que siempre me has brindado. Por creer siempre en mi.

CON MUCHO CARIÑO A MI HIJA YARELY

Por ser el gran motivo para no claudicar y seguir adelante, por tu paciencia, por tu sonrisa invaluable. Mil gracias.

A MIS TIOS Y PRIMOS

Por el apoyo incondicional que siempre me han brindado y por sus palabras de aliento.

A MI ABUELITO

Por esa palmada en la espalda y por sus sabios consejos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CON ESPECIAL AGRADECIMIENTO

A la Q.F.B Ma Elena Bustamante Cabillo

Por su confianza, por su valiosa ayuda, por sus conocimientos y asesoramiento en la realización de este trabajo. GRACIAS por su amistad.

Al Q.F.B Roberto Cruz González Meléndez.

Por el tiempo dedicado a este trabajo y por su asesoramiento.

A la Q.F.B Yolanda Flores Cabrera, Q.F.B Patricia Vivar Guzmán, y al Q.F.B Angel García Sánchez, que amablemente aceptaron participar como sinodales en la presente tesis.

A mis compañeros de laboratorio, que de alguna manera contribuyeron en la elaboración de este trabajo.

Al personal de Laboratorio de virología a todos....

GRACIAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**FRECUENCIA DEL VIRUS SINICIAL RESPIRATORIO (VSR) EN
NIÑOS MENORES DE 2 AÑOS DE EDAD QUE FALLECIERON CON
NEUMONIA EMPLEANDO LA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR).**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE**PAGINA**

RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	4
FUNDAMENTACION TEORICA.....	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
OBJETIVO.....	20
HIPOTESIS.....	20
DISEÑO DE ESTUDIO.....	21
POBLACIÓN.....	21
CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	21
VARIABLES ESTUDIADAS.....	22
TAMAÑO DE MUESTRA.....	22
MATERIAL EMPLEADO.....	23
METODOS DE LABORATORIO.....	28
RESULTADOS.....	36
DISCUSION.....	43
CONCLUSIONES.....	45
PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	46
GLOSARIO.....	48
REFERENCIAS.....	51

RESUMEN

OBJETIVO: La finalidad de este estudio fue determinar la frecuencia del virus sincicial respiratorio (VSR) en niños menores de 2 años de edad que fallecieron con neumonía, empleando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

METODOLOGIA: Fueron estudiadas 98 biopsias de pulmón incluidas en parafina de niños fallecidos durante el período de 1989-1997 con diagnóstico anatomopatológico de neumonía en el Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Estas muestras fueron desparafinadas para extraer el ARN total y realizar la transcripción reversa. Una vez obtenido el ADNc se llevaron a cabo dos amplificaciones (PCR-1 y PCR-2), utilizando oligonucleótidos específicos para la glicoproteína F de VSR. De las 98 muestras de pulmón de niños menores de 2 años de edad, se eligieron 30 para evaluar la metodología, formando tres grupos de 10 muestras cada uno con diferente diagnóstico anatomopatológico. Grupo I con neumonía viral, Grupo II con neumonía bacteriana y Grupo III sin neumonía, encontrando una diferencia significativa entre Grupo I y Grupo III con una $p=0.005$, posteriormente, se aplicó la metodología a las 98 muestras de tejido pulmonar de niños que fallecieron con neumonía. A todas las muestras que fueron negativas se demostró la ausencia de inhibidores inespecíficos, utilizando un control interno de VSR, también se comprobó la integridad del ADNc por PCR, usando oligonucleótidos específicos para el gen FMR-1 del cromosoma X humano.

RESULTADOS: De los 98 casos de neumonía el 30% resultaron positivos a VSR por PCR. De los niños que fallecieron con diagnóstico anatomopatológico de neumonía viral el 62% fueron positivos a VSR y en el 25% de los niños con diagnóstico de neumonía bacteriana ($P=0.018$).

CONCLUSIONES: Este estudio muestra una elevada frecuencia de VSR en los niños menores de 2 años de edad fallecidos por neumonía, siendo más frecuente en los casos de neumonía viral (62%), además, en los casos con diagnóstico anatomopatológico de neumonía bacteriana, también se detectó el VSR en un 25 %, indicándonos la presencia de una infección mixta.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

El virus sincicial respiratorio (VSR) es el principal causante de infecciones graves de las vías respiratorias que conduce a bronquiolitis y neumonía en niños menores de 6 meses de edad y preescolares.⁽¹⁾ También es responsable de otros síndromes respiratorios (rinitis y bronquitis). Además, está asociado con exacerbaciones clínicas en niños que tienen asma, fibrosis quística u otros problemas cardiopulmonares.⁽²⁾ En los Estados Unidos se ha estimado que dentro de la patología infecciosa en vías respiratorias, el VSR es responsable de la mayoría de las admisiones hospitalarias en comparación con las causadas por cualquier otro agente, además juega un papel muy importante en la mortalidad infantil por enfermedades respiratorias.^(2,3) Este virus también es importante en las infecciones nosocomiales ya que incrementa la morbimortalidad en prematuros, en niños menores de 6 meses de edad con enfermedad congénita cardiopulmonar y preescolares con deficiencia o depresión inmunológica.^(2,4)

La infección primaria por VSR produce enfermedad sintomática en casi todos los niños menores de 2 años, estimándose que aproximadamente el 1% son asintomáticos. La enfermedad que se produce en la mayoría de las infecciones iniciales se limita al sistema respiratorio superior. Sin embargo, se ha considerado que del 25% al 40% de esas infecciones primarias conducen a enfermedades del árbol respiratorio inferior.^(2,3)

El VSR se ha diagnosticado por cultivo de tejido con sensibilidad de 57% y especificidad de 100%, por inmunofluorescencia directa con sensibilidad del 93% y especificidad del 94%, y ELISA con una sensibilidad y especificidad del 87% y 91% respectivamente. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método de diagnóstico rápido, sensible (96%) y específico (89%). Además, se puede identificar al virus sin requerir cultivo, así como, detectar virus no viable.^(8,9) Es limitada la información sobre mortalidad debida al VSR, la que existe indica que es una causa importante de muerte en niños menores de 6 meses de edad y preescolares. Así en el Reino Unido, se aisló el VSR postmortem en 13 de 46 niños menores de 6 meses de edad (28%) que murieron por patología del tracto respiratorio inferior.^(5,6,7) Debido a la ausencia de estos datos en nuestro país, fue importante realizar el presente estudio.

FUNDAMENTACION TEORICA

NEUMONIA

Antecedentes

La neumonía es una inflamación del parénquima pulmonar y es la causa de la mayor parte de la mortalidad infantil. Los patógenos de los países en vía de desarrollo son los mismos que en los países desarrollados, pero la frecuencia de infecciones bacterianas y virales, primarias o secundarias es mucho mayor en países en vía de desarrollo.⁽¹⁰⁾

Las neumonías son causadas por diversos agentes etiológicos, siendo los principales:

- a) **Virus:** Sincicial respiratorio, Parainfluenza (1,2,3) y Adenovirus.
- b) **Bacterias:** *Streptococcus*, *S. pneumoniae*, *Legionella*, *Haemophilus influenzae*, *S aureus*, *K. pneumoniae*.
- c) **Otros:** *Mycoplasma pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*, *Histoplasma capsulatum*, *Chlamydia trachomatis* y *Pneumocystis carinii*.

Otros agentes como los del sarampión, rubéola, varicela, tifoidea, pueden producir neumonía en forma secundaria.⁽¹¹⁾

Histopatológicamente las neumonías pueden clasificarse de la siguiente manera:

- Neumonía viral, en la cual se observa engrosamiento de los septos alveolares e infiltrado linfocitario intersticial.
- Neumonía bacteriana, en la cual se observa exudado inflamatorio agudo con la presencia de leucocitos polimorfonucleares en alvéolos, bronquiolos y bronquios, además de la presencia de bacterias.⁽¹¹⁾

Epidemiología:

Los agentes causales más frecuentes de neumonía varían de acuerdo a la edad, la temporada del año, el estado inmunológico del individuo incluyendo el estado nutricional y el estrato socioeconómico entre otros.

Con anterioridad se pensaba que los virus eran responsables del 20% a 25% de las neumonías pero con el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico, se considera que éstos son los responsables del 60% a 70% de los casos de neumonía y la menor parte por problemas bacterianos, siendo que el mayor número de casos de neumonía viral se observan en los menores de 2 años de edad de ahí su interés en epidemiología y la importancia en su diagnóstico.^(11, 24)

En los casos de bronquiolitis y de neumonía intersticial, los virus son casi siempre los agentes etiológicos, predominando el virus sincicial respiratorio, y el virus parainfluenza.⁽¹¹⁾

En general, las infecciones virales de las vías respiratorias inferiores son frecuentes en los meses de invierno siendo el VSR de los agentes que con mayor frecuencia produce neumonía. Aunque el periodo estacional de estos agentes

virales es bastante predecible, las epidemias en ciertas localidades pueden modificar las cifras de incidencia en un determinado año.⁽¹⁰⁾

La morbilidad de las neumonías aún es elevada. En 1988, en México se notificaron, a la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, 116,230 casos de neumonías, en 1990 se notificó un número similar de casos (116,412) presentándose el 50% de ellos en niños menores de 5 años de edad.⁽¹¹⁾ La fuente de contagio la constituyen casi siempre las secreciones nasales o bucales de personas infectadas y el mecanismo de transmisión es el contacto directo. El período de contagio es muy variable, dependiendo del agente etiológico, pero casi siempre es de 7 días.⁽¹¹⁾

Manifestaciones clínicas:

La mayoría de las neumonías virales presentan síntomas respiratorios, como rinitis y tos, la temperatura es generalmente menor que en la neumonía bacteriana. En general es frecuente la taquipnea acompañada de retracciones intercostales, subcostales y supraesternales, así como aleteo nasal. Las infecciones graves pueden acompañarse de cianosis y fatiga respiratoria. La auscultación del tórax puede revelar estertores y sibilancias difusas.⁽¹⁰⁾

Las neumonías virales no pueden distinguirse de las neumonías bacterianas basándose sólo en las manifestaciones clínicas, pues existen signos de infección viral en muchos pacientes que presentan una neumonía bacteriana, por tal motivo es necesario la realización de estudios de laboratorio y gabinete.^(10,11)

Patología:

La causa que con mayor frecuencia trastorna los mecanismos de defensa del pulmón es una infección viral que altera las propiedades de las secreciones normales, modificando la flora bacteriana y temporalmente, puede destruir la capa epitelial normal de las vías respiratorias. Es frecuente que de una enfermedad respiratoria viral preceda en unos días la aparición de una neumonía bacteriana.^(10,11)

La neumonía bacteriana durante la niñez no es una infección frecuente si no existe alguna enfermedad crónica de fondo, como la fibrosis quística o algún déficit inmunitario. La neumonía bacteriana usualmente ocurre cuando la bacteria es inhalada o aspirada, este tipo de neumonía ocurre con menor frecuencia que la neumonía viral pero se consideran en el diagnóstico para el uso de antibióticos.⁽¹²⁾ En los Estados Unidos de cada 1000 niños en los primeros años de vida, 15 a 20 casos son de neumonía bacteriana, y la incidencia incrementa de 30 a 40 casos por año en niños mayores de 5 años de edad.⁽¹²⁾

Diagnóstico:

El diagnóstico de neumonía es fundamentalmente clínico, pero es indudable que la radiografía aporta datos de gran valor. El cultivo de exudado faríngeo proporciona una ayuda poco confiable y los cultivos de espectoración son controversiales, ya

que pueden reportar una gran contaminación de microorganismos del tracto respiratorio superior. Los hemocultivos se han reportado positivos en un 10% hasta 40% de casos de infección respiratoria. Para identificación viral se emplean cultivos celulares, así como la técnica de inmunofluorescencia, fijación del complemento, análisis inmunoenzimáticos entre otros.⁽¹⁰⁾

Existe gran dificultad para la determinación de los agentes etiológicos de las neumonías, ya que es difícil el aislamiento del microorganismo; sin embargo, el virus sincicial respiratorio y el virus de parainfluenza parecen ser los agentes más frecuentes en niños pequeños.⁽¹⁰⁾

Tratamiento:

A los pacientes con neumonía se les trata con antibióticos cuando se sospecha que es de origen bacteriano ya que cuando es de origen viral se proporcionan medidas de sosten como hidratación, aplicación de oxígeno ó incluso ventilación asistida, y en casos graves se sugiere el empleo de una droga antiviral.^(10, 11, 12)

AGENTE CAUSAL (VSR)

Historia

El virus sincicial respiratorio humano (VSR) es la causa más importante de enfermedades vírales en el tracto respiratorio inferior en niños, en adultos inmunosuprimidos y ancianos. El VSR se aisló por primera vez en 1956 en un brote de una enfermedad semejante al resfriado en una colonia de chimpancés en cautiverio, siendo denominado "agente de la coriza de los chimpancés". Posteriormente un virus idéntico se aisló en un niño con neumonía y otro con laringitis, observándose sincicios, que es el efecto citopático característico del VSR en cultivos celulares; debido a esta característica se denominó "virus sincicial respiratorio".⁽¹³⁾

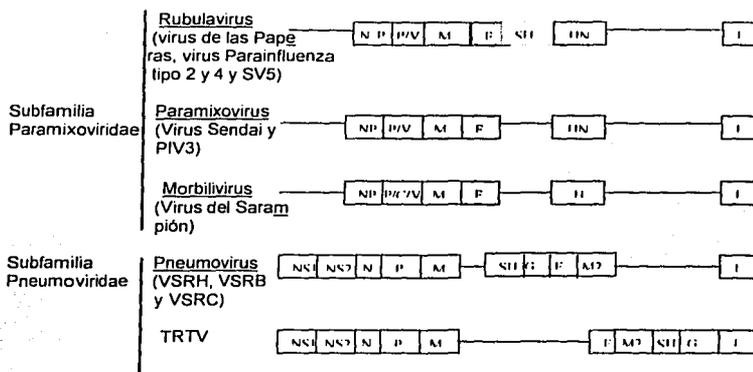
Los estudios serológicos en aquel momento indicaban que la infección era común en el hombre y se producía generalmente antes de los 4 años de edad. Investigaciones similares en diferentes partes del mundo indican que el VSR está asociado con enfermedades del tracto respiratorio inferior en los niños menores de 2 años de edad.^(14, 15)

CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO (VSR)

Clasificación

El VSR es un miembro del orden *Mononegavirales*, que consiste en una cadena de ARN negativa, pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, la cual comprende 4 géneros: a) *Rubulavirus*, representado por el virus de las Paperas, virus de Parainfluenza humano tipo 2 y 4, Virus Simian (SV5); b) *Paramixovirus*, representado por el virus Sendai y el virus Parainfluenza tipo 3 (PIV3); c) *Morbillivirus*, género representado por el virus del Sarampión. Estos 3 géneros forman parte de la subfamilia *Paramyxoviridae* debido a que presentan una relación en la secuencia de aminoácidos para varias proteínas. En la subfamilia *Pneumoviridae* se encuentra el género d) *Pneumovirus* representado por el Virus Sincicial Respiratorio humano (VSRH), bovino (VSRB) y caprino (VSRC). El virus de la rinotraqueítis de aves (TRTV), presenta una secuencia de aminoácidos diferente al de los *Pneumovirus*. (Figura 1) Los *Pneumovirus* difieren principalmente de otros *Paramixovirus* en el diámetro de la nucleocápside que es de 12nm – 15nm y el de los *Paramixovirus* es de 18 nm.^(16, 17)

Figura 1 Relación entre VSR y otros miembros de la familia *Paramixoviridae* de acuerdo a la secuencia de aminoácidos.



N/NP: proteína de nucleocápside, P: fosfoproteína, V: proteína rica en cisteína, M: proteína de matriz, F: proteína de fusión, SH: pequeña proteína hidrofóbica, G/HN/H: proteínas de enlace, L: proteína polimerasa, C/NS: proteína no estructural, M2: segunda proteína de matriz. SV5: Virus de Simio 5, PIV3: Virus Parainfluenza tipo 3, VSRH: Virus Sincicial Respiratorio Humano, VSRB: Virus Sincicial Respiratorio Bovino, VSRC: Virus Sincicial Respiratorio Caprino, TRTV: Virus de rinotraqueítis de aves.

Fuente: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Virology*. 3ª, vol. 1. Editorial Lippincott-Raven, Philadelphia; 1996:1313-37.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Morfología

El virus sincicial respiratorio es una partícula esférica cuyo tamaño es de 150 nm a 300 nm, presenta una nucleocápside helicoidal semejante a la de *Paramixovirus*, excepto que el diámetro (12 nm a 15 nm) es menor que el de *Paramixovirus* (18 nm). El genoma está constituido por ácido ribonucleico (ARN) de una sola cadena, no segmentado de polaridad negativa.^(15, 16, 17) El VSR tiene una envoltura con doble capa lipídica y tiene tres proteínas de membrana G, F, SH, las cuales median la adhesión y penetración del virus a las células, algunas de estas glicoproteínas se han observado por medio de microscopía electrónica como filamentos de 11nm-20 nm de largo en intervalos de 6nm-10 nm; en la matriz del virión hay dos proteínas no glicosiladas, la M1 y M2; las proteínas N, P y L se encuentran en la nucleocápside y están asociadas con el ARN genómico, y las proteínas no estructurales son NS1 y NS2.^(14, 15) Todas las membranas de la subfamilia del *Paramixovirus* tienen actividad hemaglutinante, pero esta función no la presentan los pneumovirus. (Tabla 1)

Tabla 1. Características diferenciales de los Paramixovirus

VIRUS	Parotiditis	Parainfluenza	Sarampión	VSR
Género	<i>Rubulavirus</i>	<i>Paramixovirus</i>	<i>Morbillivirus</i>	<i>Pneumovirus</i>
Serotipos	1	1,2,3,4A y 4B	1	1 (2 variantes A y B)
Diámetro de la nucleocápside	18	18	18	14
HA	+	+	++	-
NA	+	+	-	-
Hemadsorción	+	+	+	-
Inclusiones				

HA: hemaglutinina; NA: neuraminidasa; | inclusiones citoplasmáticas; *únicamente aglutina glóbulos rojos de primates y carece de actividad de neuraminidasa.⁽¹⁶⁾

Fuente: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Virology*. 3ª ed. Vol 1. Philadelphia: Editorial Lippincott-Raven, 1996:1313-37.

La replicación del virus sincicial respiratorio está limitada al citoplasma de las células infectadas; es sumamente lábil al calor, desecación, congelación y descongelación, por ello el transporte de las muestras debe ser rápido y conservarlas a 4°C para evitar la inactivación viral, recomendándose la inoculación inmediata de las muestras en los diferentes cultivos celulares sensibles a VSR como son las células Hela, células HEP-2, células Vero, etc.^(16, 17) La inestabilidad del virus ha sido un obstáculo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

para la purificación y el análisis detallado de su estructura. Se han identificado dos subgrupos: el A (cepa prototipo Long) y B (cepa prototipo 18537), que circulan simultáneamente en la comunidad y que se han caracterizado con anticuerpos monoclonales específicos. Las relaciones antigénicas entre las cepas A y B medidas por medio de la ELISA y proteínas F y G altamente purificadas, demuestran que la respuesta anti-F en ambos subgrupos son del 50% en comparación con valores entre 1% y 15% para la glicoproteína G. ^(15, 17)

PROTEINAS DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO.

ESTRUCTURALES

Proteínas de membrana.

La glicoproteína G se encuentra en la envoltura del VSR y sirve para fijarse a los receptores celulares, e induce anticuerpos neutralizantes, tiene un peso de 90.6 Kda y es una glicoproteína de 298 aminoácidos. ⁽¹⁶⁾

La glicoproteína de fusión (F) consta de dos fragmentos (F₁ y F₂) unidos por un puente disulfuro, que al fusionarse con la célula huésped, da por resultado la penetración del virus dirigiendo la fusión de la membrana viral y celular originándose el efecto citopático prominente con la formación de sincicios, como un mecanismo adicional de la diseminación viral. La glicoproteína F es de 574 aminoácidos con un peso de 70 Kda, es una región altamente conservada y específica del genoma del VSR, que tiene un 19.2% de homología con la proteína F del virus de Parainfluenza humano tipo 3. ^(16,17,18) Debido a esta baja homología con proteínas similares de otros virus, permite la utilización de este gen para el diagnóstico del VSR.

La glicoproteína SH, es una proteína corta de 64 aminoácidos que se encuentra en la envoltura de la membrana de VSR, tiene un peso de 7.5 Kda y solamente se encuentra en la superficie de las células infectadas; su función es desconocida. ^(15,16)

Proteínas de matriz.

Las proteínas M1 y M2 son no glicosiladas y se encuentran en la matriz del virión. La proteína M1 es hidrofóbica e interviene en la asociación de la nucleocápside con la envoltura del virus, pesa 28.7 Kda, y contiene 256 aminoácidos. ⁽¹⁶⁾ La proteína M2 esta formada por 194 aminoácidos, es básica e hidrofílica, con un peso de 22.15 Kda, cuya función es desconocida y se expresa en la superficie de la célula infectada. ^(16, 18)

Proteínas asociadas con la nucleocápside.

Estas tres proteínas de la nucleocápside del VSR, están involucradas en la transcripción y replicación viral. ^(16, 18)

La nucleoproteína N esta involucrada en la función estructural y probablemente en la transcripción y replicación del ARN viral.⁽¹⁷⁾ Es la proteína más grande de la nucleocápside formada por 391 aminoácidos con un peso de 43.42 Kda.⁽¹⁸⁾

La nucleoproteína P (fosfoproteína), esta formada por 241 aminoácidos con un peso de 27.15 Kda y es probablemente un cofactor de la polimerasa.^(16, 18)

La proteína L es una polimerasa y pesa 250.2 Kda, probablemente funciona como polimerasa de la nucleocápside.⁽¹⁶⁾

En general las proteínas estructurales facilitan la transferencia del ácido nucleico viral de una célula huésped a otra, protegen el genoma viral contra la inactivación por las nucleasas, también participan en la adhesión de la partícula viral a células sensibles y proporcionan la simetría estructural de esta partícula, estableciendo las características antigénicas del virus.^(14, 19)

NO ESTRUCTURALES.

Las proteínas NS1 y NS2 se consideran no estructurales y se detectan en pequeñas cantidades en la purificación del virión, encontrándose en las células infectadas, desconociendo su función, (Figura 1).⁽¹⁶⁾

PATOGENIA

El mecanismo por el cual el virus sincicial respiratorio se difunde desde la vía del tracto respiratorio superior al inferior no está claro. Se postula que la vía es el epitelio respiratorio o la aspiración de secreciones infectadas. El virus puede diseminarse de célula a célula sin emerger al líquido extracelular ya que no produce viremia.^(17,20)

La patología de una infección severa por VSR en niños, es similar a la de bronquiolitis o neumonía en comparación con otros virus respiratorios, sin embargo, los niños que presentan infección por VSR presentan graves cambios pulmonares, con notable inflamación, con infiltrados de células mononucleares en tejidos intersticiales y alvéolos, formación de pequeños sincicios e inclusiones citoplasmáticas, también se observa necrosis epitelial y tapones compuestos de restos celulares y fibrina, así como infiltrado linfocitario peribronquial causando obstrucción bronquial.^(16,20) Los lactantes son especialmente propensos a la obstrucción de las vías respiratorias bajas a causa del escaso calibre de sus bronquios. No se ha aclarado el papel que desempeña la infección bacteriana asociada al efecto destructor del virus y la respuesta del huésped. En casi todos los lactantes con o sin neumonía intersticial, la experiencia clínica sugiere que las bacterias son un factor importante.⁽¹⁰⁾

La imagen de rayos X puede ser normal, aunque casi siempre muestra combinación de atrapamiento de aire (hiperexpansión) y engrosamiento peribronquial o neumonía intersticial. La consolidación lobar o segmentaria, que usualmente afecta el lóbulo superior derecho, sólo es ocasional y la efusión pleural es rara.⁽¹⁵⁾

Se menciona que en los casos más graves de bronquiolitis y neumonía, se observan en niños pequeños que aún tienen anticuerpos maternos (IgG). Sin embargo, aún no está dilucidado cual es el mecanismo patogénico ni cuales son los mecanismos que protegen contra la infección o la reinfección.⁽²⁰⁾

Los pacientes con defectos en la inmunidad mediada por células pueden presentar infecciones persistentes, eliminando virus por largos periodos. Esto ha sido observado en niños con SIDA congénito y en niños tratados con drogas inmunosupresoras, lo que indica que la integridad del aparato inmunológico es de importancia para que la infección termine.⁽¹⁷⁾

HALLAZGOS CLINICOS

En los niños la infección respiratoria por VSR generalmente es sintomática desarrollando signos en el tracto respiratorio inferior, entrando en una fase prodrómica de rinorrea acompañada de pérdida del apetito, aparece simultáneamente tos, aunque es más frecuente después de un intervalo de 1 a 3 días. Durante esta etapa también pueden presentarse, estornudos y febrícula.⁽¹⁵⁾ Después de que la tos se presenta, los niños comienzan con taquipnea, pero si la enfermedad es leve, los síntomas no van mas allá de esta etapa. En el examen

clínico del niño se detecta, taquipnea, estertores roncantes difusos y sibilancias, las imágenes de rayos x del tórax son generalmente normales. ^(16,18) En la mayoría de los casos la recuperación se presenta después de 7 a 12 días de enfermedad. En casos más graves la tos y taquipnea es mayor a 70 respiraciones por minuto y el niño se vuelve dispnéico; la hiperexpansión del tórax es evidente, así como, retracciones intercostales y subcostales. El niño presenta apatía, cansancio, rechaza la comida y la hipoxia se hace más evidente, ya que cuando el niño se pone exhausto, la hipoxia llega a ser más extrema y va acompañada a menudo de hipercapnia y acidosis, presentándose disminución de la respuesta auditiva, apnea y jadeo. En general, la primoinfección que ocurre habitualmente antes del año de vida, suele inducir cuadros más severos que en las reinfecciones. ^(15, 16, 21)

En los niños con anomalías congénitas cardíacas o respiratorias, las infecciones con VSR pueden ser fatales. Las infecciones en adultos en especial del personal hospitalario son muy frecuentes, aunque generalmente no es diagnosticado ya que es indistinguible clínicamente del resfriado común. ⁽¹⁷⁾

Los estudios analíticos habituales aportan escasa información en la mayor parte de las neumonías causadas por el VSR. El recuento leucocitario es normal o alto, los cultivos bacterianos suelen revelar crecimiento de la flora normal. La hipoxemia es frecuente y tiende a ser más importante, cuando es más intensa, va acompañada a menudo de hipercapnia y acidosis. ⁽¹⁰⁾

EPIDEMIOLOGIA

El VSR tiene una distribución mundial, con brotes anuales que duran varios meses con un patrón estacional para cada región. En países templados, la epidemia generalmente ocurre durante los meses de invierno, mientras que en países tropicales ocurre durante los meses de lluvia. Las epidemias suelen alcanzar su máxima incidencia en enero, febrero o marzo, pero también se han descrito máximos desde el mes de diciembre hasta el mes de junio. Durante el resto del año, las infecciones son esporádicas y poco frecuentes. ⁽¹⁰⁾

La distribución de la enfermedad grave por VSR con respecto a la edad, es similar en todo el mundo con un pico de incidencia en los dos primeros años de vida. ⁽²¹⁾

Se ha observado que los niños de 6 semanas a 9 meses de edad, desarrollan con mayor frecuencia neumonía o bronquiolitis severa, con un pico de incidencia entre los 2 meses y 7 meses de edad. En un 30% la infección por VSR es más común en el sexo masculino que en el femenino. En las zonas urbanas de los Estados Unidos, la infección por VSR es más frecuente en niños de color; sin embargo, la enfermedad de las vías respiratorias inferiores es más frecuente y precoz en los grupos de nivel socioeconómico bajo y en condiciones de hacinamiento. ⁽¹⁰⁾

Estudios en el Norte de Carolina y Newcastle, la hospitalización es más frecuente en niños cuya familia tiene un nivel socioeconómico bajo en donde un 75% de los niños menores de 1 año de edad con bronquiolitis y 22% con neumonía fueron hospitalizados; en otro estudio realizado en Washington con vigilancia durante 13 años se detectó un 43% de infección por VSR con un diagnóstico de bronquiolitis y un 25% con neumonía. También se encontró que este virus juega un papel menor en las bronquitis (10.6% de los casos) y en laringitis (9.8%). ^(16,21) En un grupo de

55 niños que asistieron al servicio de urgencias del Hospital Infantil de México con infección respiratoria baja (neumonía o bronquiolitis) detectaron al VSR en un 36%, lo que indica que el VSR juega un papel importante como agente etiológico en este tipo de infecciones.⁽²²⁾

La reinfección parece ser un evento frecuente, pues un estudio realizado en Houston la infección de VSR fue de 69.8% durante los primeros años de vida y 82% durante el segundo año. Todos los niños de 24 meses de edad que fueron infectados, el 50% tuvo reinfección. El riesgo de infección decrece a un 33.3% a los 48 meses de edad. El período de incubación desde la exposición al primer síntoma es de unos 4 días. El virus se excreta durante periodos variables, que probablemente dependen de la gravedad de la enfermedad y del estado inmunitario. Casi todos los lactantes con enfermedad del aparato respiratorio inferior secretan virus durante 5-12 días a partir de su ingreso en el hospital.⁽¹⁰⁾

Por otra parte las infecciones nosocomiales por VSR, son un problema en los hospitales pediátricos y recientemente se ha registrado un incremento en la frecuencia en adultos hospitalizados, especialmente en aquellos pacientes inmunocomprometidos, pues el virus suele propagarse de niño a niño a través de la participación del personal de salud.⁽²³⁾

La infección por VSR, principalmente se difunde por contacto directo con secreciones infectadas, ya sea por estornudos, fomites o contacto directo con niños infectados, el virus sobrevive por minutos en una variedad de superficies porosas, incluyendo, piel, papel, tela, guantes, cunas o camas. La enfermedad adquirida también da como resultado una estancia hospitalaria prolongada de los niños y puede presentar enfermedad fatal con otros problemas asociados. Debe tenerse en cuenta el aislamiento y un minucioso lavado de manos para el manejo de los niños infectados.^(21,22) Es probable que el VSR se introduzca en la mayoría de las familias a través de los hijos en edad escolar reinfectados. Es típico que, en el espacio de pocos días, los hermanos mayores y uno o los dos padres sufran resfriados, pero los lactantes presentan una enfermedad más grave con fiebre, otitis e infección de las vías respiratorias inferiores.⁽¹⁰⁾

La primoinfección, que ocurre habitualmente antes del año de edad, suele inducir cuadros más graves que la reinfección. En estudios realizados en USA se demostró por seroconversión que el 40% de los niños antes de cumplir un año de edad ya se habían infectado con VSR, al segundo año el 50% y a los 4 años el 100%.^(17,20)

DIAGNOSTICO

La radiografía de tórax se caracteriza por infiltrados difusos, en algunos pacientes también puede haber infiltrados lobulares transitorios. El recuento de leucocitos en los niños con neumonía viral tiene tendencia a ser normal o a elevarse ligeramente ($< 20\,000/\text{mm}^3$), con predominio de los linfocitos, la velocidad de sedimentación globular o la proteína C reactiva suelen estar normales o algo elevados, por lo que el diagnóstico definitivo exige el aislamiento del virus en una muestra obtenida del tracto respiratorio. El dilema para el diagnóstico de mayor importancia es una posible participación bacteriana. El diagnóstico de la infección por el VSR es por medio de la detección del virus o de sus antígenos en las secreciones respiratorias.^(10,12)

La muestra de elección para el diagnóstico de infección por VSR es el aspirado nasofaríngeo, obtenido en los primeros días de enfermedad, mediante aspiración con bomba de vacío, ya que cuando la muestra nasofaríngea se obtiene con jeringa o hisopo, disminuye la calidad de la muestra. El diagnóstico de VSR puede realizarse por los métodos de aislamiento en cultivo celular, considerado como método clásico, y que tiene una sensibilidad y especificidad del 57% y 100% respectivamente así como la detección de antígenos virales que son considerados de elección por ser métodos rápidos.⁽¹⁷⁾

Para el aislamiento de VSR en cultivo celular es fundamental un envío rápido de la muestra y conservarla a 4 °C, debido a la gran labilidad de este virus; además, el VSR crece en varias líneas celulares por ejemplo: en células HeLa derivadas del carcinoma de cérvix, células HEP-2 provenientes de un carcinoma de laringe, también en células Vero originadas de riñón de mono verde, etc. Pero la desventaja es que requiere un mínimo de 15 días para obtener los resultados.^(17, 24)

En cambio, la inmunofluorescencia que detecta antígenos de VSR en células nasofaríngeas, tanto directa como de manera indirecta (con anticuerpos policlonales o monoclonales) tiene una sensibilidad similar al aislamiento en cultivo celular, sin los inconvenientes de este, ya que los resultados se pueden obtener en pocas horas.⁽²⁴⁾

El método de análisis inmunoenzimático (ELISA) también es utilizado para la detección de antígeno de VSR en las células nasofaríngeas, tiene una sensibilidad de 87% y especificidad de 91.0% respectivamente la cual es ligeramente inferior a la de inmunofluorescencia, tiene una utilidad epidemiológica y permite definir la incidencia y prevalencia de diversos patógenos virales. El diagnóstico serológico no es muy útil, debido al tiempo que es necesario esperar la conversión serológica y a la leve respuesta humoral en los lactantes, sin embargo, para estudios epidemiológicos en niños mayores de 2 años de edad o adultos, la serología es adecuada.^(1,10,17.)

Indudablemente los métodos moleculares de diagnóstico como la PCR, prometen aumentar la sensibilidad y especificidad en la detección de agentes virales, teniendo gran valor en el diagnóstico viral por ser difíciles de detectar con técnicas inmunológicas.⁽²⁵⁾

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En 1983, el doctor Kary Mullis, postuló que se podrían producir copias múltiples de un fragmento de ADN, por un proceso bastante sencillo utilizando una enzima que normalmente se encarga de sintetizar el ADN y pequeños fragmentos de ADN complementarios (ADNc). La importancia de este descubrimiento fue reconocido en 1993 por el Comité del Premio Nóbel, el cual fue otorgado al doctor Mullis.⁽²⁶⁾

La PCR es un método de diagnóstico más rápido, sensible y específico que evita el aislamiento viral especial y tedioso, además se detecta al agente viable y no viable a baja concentración, ya que con la mínima cantidad de ARN, es posible la identificación viral, también amplifica secuencias del ADN desde 25 pares de bases hasta 10,000 pares de bases, utilizando solamente la secuencia blanco específica en lugar del genoma completo.⁽²⁷⁾

La PCR se ha utilizado para amplificar el ADN de una variedad de muestras incluidas en parafina, células de mucosa, cabello, células linfáticas o de semen, un cerebro momificado de 7000 años de antigüedad.^(9, 28)

La identificación por medio de la PCR, en la actualidad, es el instrumento de elección cuando los métodos tradicionales requieren demasiado tiempo o proporcionan resultados inexactos. Los epidemiólogos necesitan información acerca de la relación de las cepas bacterianas o virales, para investigar el origen de una epidemia, sobre todo en el medio hospitalario. El advenimiento de la identificación por medio de la PCR ha proporcionado un instrumento de alta tecnología y de alta precisión para identificar a los virus.⁽⁹⁾

En un estudio donde se detectó el VSR en niños con bronquiolitis, Cubi y col⁽²⁹⁾ mencionan que la Inmunofluorescencia es una prueba rápida de diagnóstico y que la detección de antígeno es más sensible que la detección por hibridación, pero consideraron de mayor importancia las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos en el estudio de virus, y que la PCR es indudablemente una técnica a emplear para el estudio de enfermedades respiratorias en niños. Gilbert demostró que la PCR puede ser usada para la detección de VSR y otros virus respiratorios.⁽³⁰⁾

TRATAMIENTO Y PROFILAXIS PARA VSR.

El tratamiento de neumonía causada por VSR, puede requerir de hidratación y administración de oxígeno ya que la mayoría de los pacientes presentan hipoxia, y si es necesario, se aplica ventilación asistida. Cuando existe dificultad para comer es útil emplear la vía intravenosa o la sonda.^(10,12) Cuando la neumonía por VSR es severa, se sugiere administrar ribavirina que ha mostrado ser efectiva.⁽¹⁶⁾ Los antibióticos son indicados en la neumonía de origen bacteriano, pero en el caso de neumonía por VSR no son útiles, por lo que en éste caso se debe evitar el uso indiscriminado de ellos.

El efecto protector de la leche materna ha sido demostrado eficientemente por lo que debe proporcionarse la lactancia prolongada, ya que proporciona la vitamina

A, la cual estabiliza la estructura y función de las superficie mucosa, participando en la respuesta inmune y en la producción de moco. Esta vitamina es necesaria durante los primeros 6 meses de vida y cubre la mayor parte de las necesidades hasta los 2 años de edad.⁽¹⁰⁾

PREVENCION

Dentro del hospital, las medidas preventivas más importantes son evitar la diseminación del VSR, mediante el aislamiento de todos los niños con sospecha o con infección por VSR, debiéndose tomar estrictas medidas de higiene como es, el lavado de manos, utilizar batas y guantes especiales.⁽²³⁾

Existen dos productos para la prevención de la infección por VSR que reducen la excreción de éste, como es la inmunoglobulina intravenosa de origen humano (IGIV-VSR), y recientemente esta en investigación la vacuna monoclonal de la fracción F de VSR, llamada Palivisumab, que ha sido aplicada por vía intravenosa en niños menores de 2 años de edad.⁽⁴²⁾

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El virus sincicial respiratorio es la causa frecuente de infecciones graves de vías respiratorias que particularmente conduce a neumonía y bronquiolitis en niños menores de 2 años de edad. En los Estados Unidos se ha estimado que dentro de la patología en vías respiratorias, el VSR es responsable de la mayoría de las admisiones hospitalarias, además juega un papel muy importante en la mortalidad infantil por enfermedades respiratorias. ^(2,3) En nuestro medio se desconoce la mortalidad asociada a esta infección en niños hospitalizados con enfermedad de las vías respiratorias, por éste motivo se desarrolló el método de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección del VSR en muestras de pulmón incluidas en parafina de niños menores de dos años de edad. Por tal motivo se hizo el siguiente planteamiento:

¿Cuál es la frecuencia con la que se identifica VSR en muestras de tejido pulmonar postmortem, mediante la técnica de la PCR en niños con diagnóstico de neumonía?

OBJETIVO

Determinar la frecuencia del virus sincicial respiratorio en muestras de tejido pulmonar postmortem en niños menores de 2 años de edad con neumonía o bronquiolitis, mediante la técnica de la PCR, usando oligonucleótidos específicos que codifican para la glicoproteína F de este virus.

HIPOTESIS

Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se identificará al VSR en más del 25% de las muestras de tejido pulmonar post-mortem de niños menores de 2 años de edad que fallecieron con neumonía.

METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio transversal, observacional, retrospectivo y descriptivo.

POBLACION

Se estudiaron un total de 98 muestras de tejido pulmonar incluido en parafina de niños menores de 2 años de edad, 57 casos del sexo masculino y 41 del sexo femenino, que fallecieron con diagnóstico anatomopatológico de neumonía en el Hospital de Pediatría de CMN-SXXI, durante el periodo de 1989–1997. El Departamento de Anatomía Patológica proporcionó los cortes de tejido pulmonar, que para incluir este tejido en parafina previamente siguió un proceso de endurecimiento, deshidratación, clareamiento e infiltración.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión

- Niños menores de 2 años de edad fallecidos con diagnóstico anatomopatológico de neumonía con tejido pulmonar disponible para estudio histopatológico y para realizar la PCR.

Criterios de exclusión

- Niños mayores de 2 años de edad.
- Que no cuente con muestras de tejido pulmonar suficiente.

VARIABLES:

Variable independiente: Metodología empleada en la técnica de la PCR.

Variable dependiente: Frecuencia del virus sincicial respiratorio en niños menores de dos años de edad fallecidos por neumonía.

TAMAÑO DE MUESTRA

Debido a que no existen valores epidemiológicos de la presencia de VSR en México, el tamaño de muestra fue determinada a través de los siguientes valores obtenidos en otros países empleando la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 (pq)}{d}$$

$$Z^2 = 1.96$$

$$p = 0.25 \text{ (Frecuencia esperada de acuerdo a reportes previos). }^{(7,41)}$$

$$q = 0.75 \text{ (1 - p)}$$

$$d = 0.10$$

De donde:

Z^2 = Factor que nos asegura que estamos dentro de los límites de error en el 95% de los casos.

p = Frecuencia esperada de acuerdo a reportes previos.

q = (1-p) 1 menos la frecuencia esperada.

d = Discrepancia máxima entre el valor verdadero de P y el que se obtendrá de la muestra.

n = 72 muestras de biopsias de niños menores de 2 años de edad.

MATERIAL DE LABORATORIO

REACTIVOS

- Aceite mineral estéril (Sigma).
- Acido acético glacial (Merck).
- Agarosa (Stratagene).
- Azul de bromofenol (Sigma).
- Bromuro de Etidio (Sigma).
- Cloroformo (Sigma).
- Cloruro de magnesio (Gibco BRL).
- Dietil pirocarbonato (Sigma).
- dNTP's (Sigma).
- Dodecil sulfato de sodio (Gibco).
- EDTA (Pharmacia Biotech).
- Etanol absoluto (Merck).
- Etanol 75% (Merck).
- Ficoll (Pharmacia Biotech).
- Isopropanol (Sigma).
- Oligonucleótidos: 1-6 (Clontech).
- Random primers (Gibco BRL).
- RNasin (Promega).
- Taq DNA Polymerasa (Gibco).
- Transcriptasa reversa (Gibco BRL).

Tris base (Pharmacia biotech).

Trizol[®] (Gibco BRL).

Xileno (Merck).

SOLUCIONES

Solución amortiguadora para AMV-RT (Gibco BRL).

Solución amortiguadora para PCR (Gibco BRL).

Solución KCl (Gibco BRL).

Solución MgCl₂ (Gibco BRL).

MATERIAL BIOLÓGICO

Biopsias de pulmón incluidas en parafina de niños que fallecieron con neumonía.

Células Vero infectadas con Virus sincicial respiratorio y no infectadas.

EQUIPO

Autoclave (Interamericana).

Balanza analítica (Sartorius).

Balanza granataria (Mettler-Toledo).

Cámara de electroforésis (Life technologies, Horizon 58).

Cámara fotográfica (Polaroid MP-4).

Campana de bioseguridad (Nuair).

Campana de extracción (HL S.A).

Espectrofotómetro (Beckman, DU 650).

Estufa (Thelco).

Fuente de poder modelo 250 (Life Technologies).

Horno de microondas (Samsung).

Lámpara de luz U.V de onda corta.

Microcentrifuga (Sorvall MC- 12).

Película Polaroid tipo 55 de 9 cm x 12 cm.

Placa de calentamiento con agitación (Corning).

Potenciómetro (Beckman RS-232).

Refrigerador de 4 °C, -20 °C, -70 °C (Puffer Hubbard, Fisher Scientific y Revco respectivamente).

Termociclador (Perkin Elmer).

Vortex (Genie, K-550-G).

MATERIAL EMPLEADO

Aceite mineral (Sigma).

Barra magnética (Cole-Parmer).

Bolsas para esterilizar en gas o vapor (PMG).

Espátula de acero inoxidable.

Frascos con tapón de rosca de 100 mL 250 mL y 500 mL (Schott).

Gasas.

Gradillas.

Guantes de hule no estériles (Tru-Touch).

Matraz Erlen meyer de 250 y 500 mL (Kimax).

Membranas de filtración para esterilización con poro de 0.22 μ M y 0.45 μ M (Millipore).

Micropipetas de 2 μ L, 10 μ L, 200 μ L y 1000 μ L (Gilson).

Papel aluminio (Reynolds).

Papel parafilm (American Company).

Pipeta graduada de 1 mL, 2 mL, 5 mL y 10 mL (Pyrex).

Portafiltro (Swinner-0.22 μ M-Millipore).

Puntas para micropipeta Gilson de 5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 1000 μ L.

Tubos Eppendorf estéril de 0.5 mL y 1.5 mL.

Vasos de precipitado de 100 mL (Pyrex).

ANALISIS ESTADISTICO

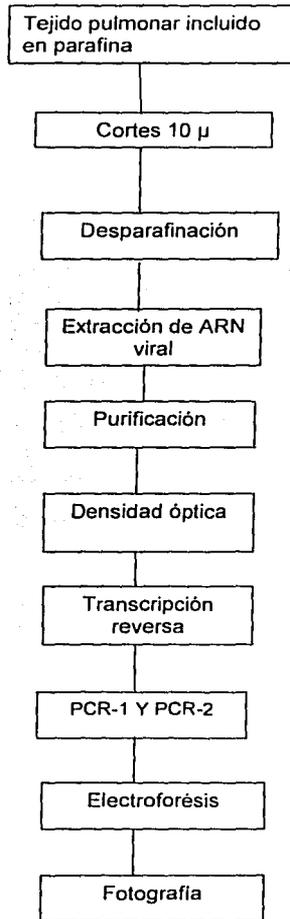
1. Se utilizó estadística descriptiva:

- Frecuencias simples.
- Prevalencia = $\frac{\text{N}^\circ \text{ casos en los que se encontró VSR}}{\text{N}^\circ \text{ total de casos}}$

2. Los resultados se presentan en tablas de frecuencias.

3. Prueba de Fisher's.

Diagrama de flujo para la detección de VSR en muestras de tejido pulmonar incluidas en parafina.



TECNICAS

OBTENCION DE LA MUESTRA.

Las muestras trabajadas fueron biopsias de pulmón incluidas en parafina, de niños menores de 2 años de edad que fallecieron con neumonía, en el Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional S-XXI. Al Departamento de Anatomía Patológica se pidió de cada muestra 36 cortes de 10 μ c/u de tejido pulmonar, de los cuales se repartieron en 3 tubos eppendorf estériles por cada caso. Para seleccionar las muestras que se utilizaron en el estudio, el patólogo empleó los siguientes criterios para el diagnóstico anatomopatológico en el tejido pulmonar postmortem. Definiendo como **neumonía viral** a la observación de engrosamiento de los septos alveolares, e infiltrado linfocitario intersticial. **Neumonía bacteriana**, a la observación de exudado inflamatorio agudo con la presencia de leucocitos polimorfonucleares en alvéolos, bronquiolos y bronquios, además la presencia de bacterias.⁽³³⁾

El tejido pulmonar incluido en parafina fue procesado por el técnico histopatólogo de la siguiente manera: el tejido se fijó en una solución de formalina al 10% para endurecerlo. Posteriormente se deshidrató con alcohol al 96 % y 100 % durante 5 horas, realizándose el clareamiento con xilol durante 1 hora y finalmente la infiltración de la parafina durante 2 horas.

EVALUACIÓN DE LA PCR.

Antes de aplicar la metodología a las biopsias de pulmón incluidas en parafina, la PCR fue evaluada con 30 muestras de tejido pulmonar, tomando 10 casos de neumonía viral con alta probabilidad de infección por VSR (Grupo I), otros 10 casos con diagnóstico anatomopatológico de neumonía bacteriana con probabilidad indeterminada (Grupo II) y 10 casos con diagnóstico anatomopatológico sin neumonía con muy baja probabilidad de infección por VSR (Grupo III).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DESPARAFINACION.

De cada muestra de pulmón incluida en parafina se pidieron 36 cortes que fueron distribuidos en 3 tubos eppendorf, a cada uno se adicionó, 700 μ L de xileno, dejándolo 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 12, 000 r.p.m por 3 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se repitió el paso anterior. El sedimento del tejido pulmonar, se lavó 2 veces con 700 μ L de etanol al 100% para remover el solvente, centrifugando a 12, 000 r.p.m por 3 minutos a temperatura ambiente, dejándose secar en la campana de extracción. Después se agregaron 500 μ L de Trizol[®], dejándolo durante 1 hora en hielo, finalmente las muestras se guardaron a -20° C, toda la noche. Los controles incluidos en parafina de células Vero positivo (infectadas con VSR) y negativo (no infectadas con VSR) se trabajaron en las mismas condiciones.

EXTRACCION Y PURIFICACION DE ARN TOTAL.

Se descongeló la muestra previamente desparafinada a temperatura ambiente e inmediatamente fue colocada en un homogenizador de vidrio para triturar la muestra a la cual se adicionó 1 ml de Trizol[®], dejándose en hielo durante 1 hora, realizándose la extracción del ARN con 200 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 2 minutos. Se centrifugó a 14, 000 r.p.m. por 15 minutos a 4° C. La fase acuosa fue separada en un tubo eppendorf y se adicionaron 500 μ l de cloroformo; se centrifugó a 14, 000 r.p.m. durante 15 minutos a 4° C. El ARN total de la fase acuosa fue purificado mediante precipitación con 1 mL de isopropanol dejando en hielo por 30 minutos. La muestra fue centrifugada en las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se dejó secar a temperatura ambiente dentro de la campana de extracción; finalmente se lavó con etanol al 75% centrifugándose a 14, 000 r.p.m. por 15 minutos, y se dejó secar el sedimento para disolverlo en 5 μ L de dietil pirocarbonato 0.01% en agua, procediéndose a determinar en una alícuota la densidad óptica (DO), guardándose a -70° C.

Lectura de densidad óptica.

La suspensión de ARN total purificado se llevó a 65° C por 5 minutos e inmediatamente se colocó en hielo, de esta suspensión se tomó 1 μ l y fue colocado en un tubo eppendorf, adicionándose 99 μ L de agua DEPC (dilución 1:100). Finalmente se procedió a leer la densidad óptica en el espectrofotómetro a 260

nm/280 nm. Debido a que fue necesario 1 µg de ARN para realizar la transcripción reversa del ARN total, llevándose a cabo los siguientes cálculos:

$$\text{ARN total purificado} = (\text{Ab. 260 nm}) (40 \mu\text{g} / \text{mL}) (100) (\text{Vol. final}) = \mu\text{g/mL}$$

En donde:

40 µg /mL = Factor de conversión de absorbancia relativa para la concentración
 100 = Factor de dilución

TRANSCRIPCIÓN REVERSA

En un tubo eppendorf para PCR de 0.5 mL, se colocó el equivalente a 1 µg de ARN purificado de la muestra de pulmón y de los controles positivo y negativo de células Vero los cuales, fueron llevados a 65°C por 5 minutos, se colocaron en hielo y se adicionó la siguiente mezcla de reactivos correspondiente a la Tabla 1.

Tabla 1

Reactivos	Concentración	µL
dNTPs	40 mM	0.625 c/u
Rnasin	20 U	0.5
Hexameros	100 pm	1.33
Buffer AMV RT	5X	4.00
KCl	50 mM	8.00
Transcriptasa reversa	2.5 U	1.00
Agua DEPC	0.01%	cbp 20.00
Aceite mineral		20.00

La mezcla de reacción anterior se llevó al termociclador, en donde la desnaturalización se realizó a 23 °C por 20 minutos, la síntesis a 42 °C por 45 minutos y la inactivación de la enzima a 95 °C por 10 minutos. Finalmente el ADNc se guardó a -20 °C, hasta continuar con el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

Para llevar a cabo la PCR-1 se utilizaron dos oligonucleótidos específicos (1 y 2) que codifican para una región del gen F del VSR y que amplifican 390 pares de bases (pb).

- 1) 5' GGT - GTT - GGA - TCT - GCA - ATC - GCC - A.
- 2) 5' AAC - TTT - TTC - TGA - TCA - TTT - GT.

Se preparó en un tubo eppendorf la mezcla de reactivos correspondiente a la Tabla 2.

Tabla 2

Reactivo	Concentración	μ L
Buffer PCR	10 x	10.00
MgCl ₂	50.0 mM	3.00
dNTPs	40.0 mM	0.5 c/u
Oligonucleótido 1	0.5 μ M	2.5
Oligonucleótido 2	0.5 μ M	2.5
Taq-polimerasa	2.5 U	0.5
Agua inyectable		cbp 100.00
Aceite mineral		75.0

A ésta mezcla de reactivos se colocaron 9 μ l de ADNc de la muestra, así como de los controles, llevándose al termociclador en donde la desnaturalización del ADNc fue a 94 °C por 30 segundos, alineación a 55°C por 30 segundos, y extensión a 72 °C por 60 segundos. Esto se realizó en una serie de 35 ciclos. Llevándose a cabo una segunda amplificación (PCR-2) del VSR, utilizando un par de oligonucleótidos (3 y 4) anidados, que amplifican 207 pb, empleando las mismas condiciones de la PCR-1, la secuencia de los oligonucleótidos es la siguiente:

- 1) 5' AAG - TGC - TCT - ACT - ATC - CAC - A.
- 2) 5' CAC - TAA - ATT - CCC - TGG - TAA - TC.

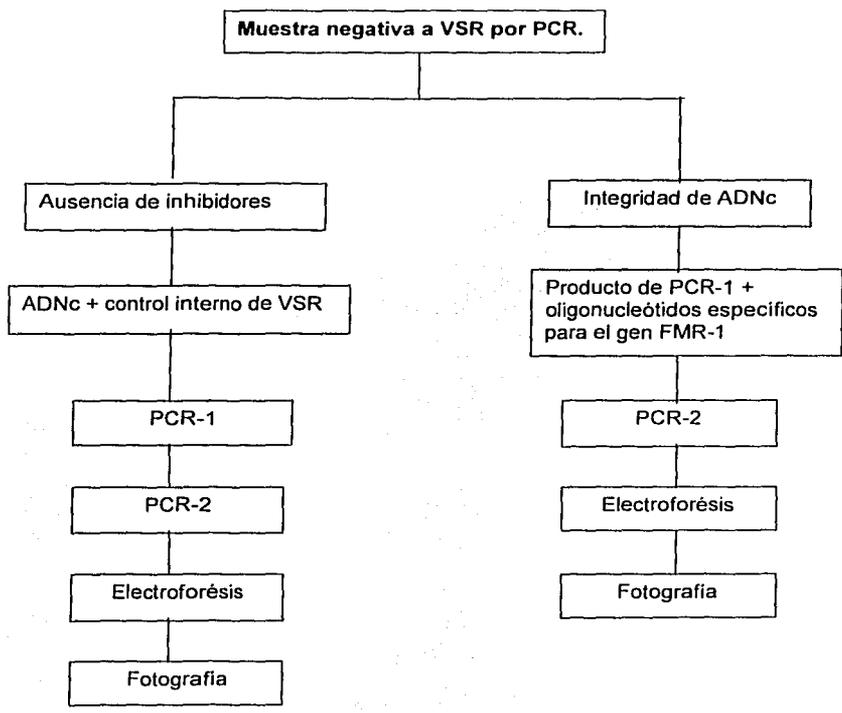
El ADNc amplificado se guardó a -20 °C.

ELECTROFORESIS

Alicuotas de 10 μ L de las muestras de ADNc amplificado por la PCR-1 y la PCR-2, así como un marcador de pesos moleculares, se colocaron en un gel de agarosa al 1.5 %, adicionándose a cada una de ellas 2 μ L de buffer de corrida.

El corrimiento electroforético se llevó a cabo en buffer TAE 10X, empleando 86 volts durante 45 minutos. Finalmente el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio al 0.05% durante 15 minutos, se retiró el gel de esta solución y se tomó una fotografía. Observándose en los casos positivos a VSR las bandas de 390 pb y 207 pb de los productos del PCR-1 y PCR-2, respectivamente.

Diagrama de flujo para demostrar la ausencia de inhibidores inespecificos e integridad de ADNc en muestras de tejido pulmonar negativas a VSR por PCR.



En las muestras que resultaron negativas a VSR por PCR, se demostró la ausencia de inhibidores inespecíficos utilizando un control interno de VSR y se comprobó la integridad del ADNc usando oligonucleótidos específicos (5 y 6) para gen FMR-1 del cromosoma X humano por PCR.

AUSENCIA DE INHIBIDORES INESPECIFICOS

En un tubo eppendorf se preparó la siguiente mezcla de reactivos para PCR-1.

Tabla 3

Reactivo	Concentración	μ l
Buffer PCR	10x	10.00
MgCl ₂	1.5 mM	3.00
dNTPs	0.2 mM	0.5 c/u
Oligonucleótido 1	0.5 μ M	2.5
Oligonucleótido 2	0.5 μ M	2.5
Taq-polimerasa	2.5 U	0.5
ADNc control interno de VSR (10^{-2})		9.0
Agua inyectable		cbp 100.00
Aceite mineral		75.0

A esta mezcla de reactivos, se adicionó 9 μ l del ADNc de la muestra y 9 μ l de los controles de células Vero positivo (control infectado con VSR) y negativo (no infectado con VSR), llevándose al termociclador, para realizar la desnaturalización del ADNc a 94°C por 30 segundos, alineación a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 60 segundos, esto se llevó a cabo en una serie de 35 ciclos. Posteriormente se realizó una segunda amplificación (PCR-2 anidado) empleando las mismas condiciones de la PCR-1. Finalmente se realizó una electroforesis con los productos de la PCR-1 y PCR-2, de las muestras y los controles observándose las bandas de 390 pb y 207 pb del VSR respectivamente, que confirmó la ausencia de inhibidores inespecíficos.

INTEGRIDAD DE ADNc

A partir del producto de la PCR-1 de las muestras negativas a VSR, se comprobó la integridad del ADNc, usando oligonucleótidos específicos 5 y 6 para una región específica del gen FMR-1 del cromosoma X humano, realizándose la siguiente mezcla de reactivos de la Tabla 4. La secuencia de los oligonucleótidos es la siguiente:

5) 5' AAC – TGG – CAG – CCT – GAT – AGG – CAG – ATT – C.

6) 5' TAG – CTA – ACC – ACC – AAC – AGC – AAG – GC.

Tabla 4

Reactivo	Concentración	μL
Buffer PCR	10 x	10.0
MgCl ₂	1.5 mM	3.0
dNTPs	0.2 mM	0.5 c/u
Taq-polimerasa	2.5 U	0.5
Oligonucleótido 5	1.0 nmol	2.0
Oligonucleótido 6	100.0 pmol	2.0
Agua inyectable		cbp 100.00
Aceite mineral		75.0

A ésta mezcla de reactivos se adicionaron 9μl de ADNc de la muestra negativa. La muestra y los controles se llevaron al termociclador, siguiendo el mismo programa para la PCR-1. El ADNc obtenido de la PCR-2 fue corrido junto con un marcador de pesos moleculares así como de los controles positivo y negativo, en un gel de agarosa al 1.5 %, empleando 86 volts por 45 minutos y teñido con bromuro de etidio, observándose una banda de 146 pb, de una región del gen FMR-1 del cromosoma X humano, que confirmó la integridad del ADNC. ⁽³⁷⁾

RESULTADOS

Evaluación de la PCR

En la evaluación de la PCR mostrada en la Tabla 5 se observa que de 30 muestras de tejido pulmonar postmortem de niños menores de 2 años de edad, se encontró que en el Grupo I con diagnóstico anatomopatológico de neumonía viral se presentó el 70% de positividad al VSR, en el Grupo II con diagnóstico de neumonía bacteriana se encontró el 30% de positividad a VSR, y ningún caso positivo en el Grupo III con diagnóstico anatomopatológico de sin neumonía. Encontrando diferencia significativa entre el Grupo con alta probabilidad de infección por VSR (Grupo I) y el Grupo de baja probabilidad de infección por VSR ($P=0.0015$).

Tabla 5

Detección del VSR por PCR en tejido pulmonar incluido en parafina en 30 niños menores de 2 años de edad fallecidos con o sin neumonía.

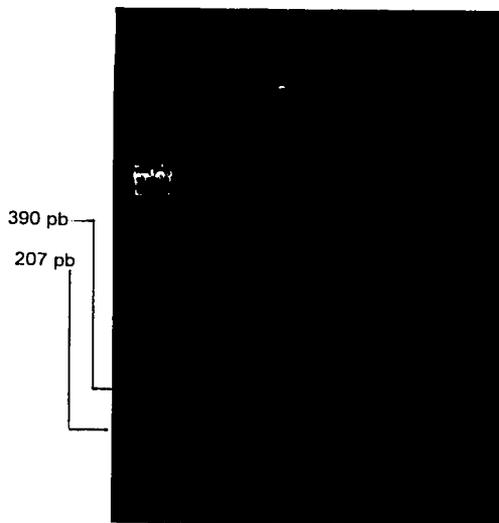
Grupo	Diagnóstico anatomopatológico	Positividad a VSR por grupo
I	Neumonía viral (Alta probabilidad de infección por VSR)	7/10 (70%)
II	Neumonía bacteriana (Probabilidad indeterminada de infección por VSR)	3/10 (30%)
III	Sin neumonía (Muy baja probabilidad de infección por VSR)	0/10 (0%)

Grupo I vs Grupo III, $P=0.0015$. prueba exacta de Fisher's

Electroforésis en gel de agarosa al 1.5% mostrando: (M) marcadores de pesos moleculares, (B) Banda de 390 pb que corresponde al PCR-1 del control positivo de células Vero infectadas con VSR, (C) PCR-2 del control negativo de células Vero, (D) banda de 207 pb que corresponde al PCR-2 del control positivo de células Vero.

Gel 1

M A B C D

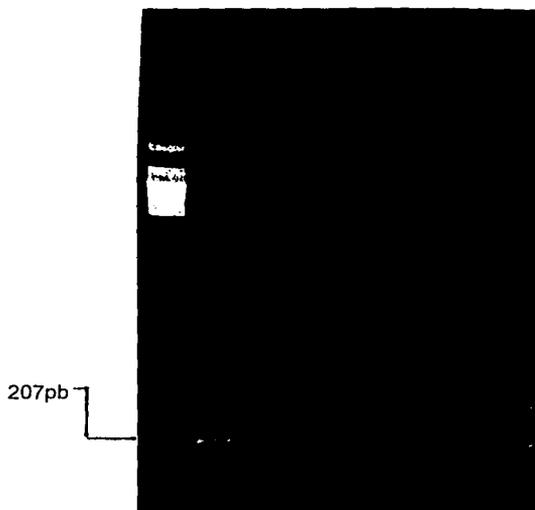


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Electroforésis en gel de agarosa al 1.5% mostrando: (M) marcador de pesos moleculares, (A) PCR-2 de un caso positivo a VSR con diagnóstico anatomopatológico de neumonía viral, (B) PCR-2 de un caso negativo a VSR de neumonía viral, (C) PCR-2 de un caso positivo a VSR con diagnóstico anatomopatológico de neumonía bacteriana, (D) caso negativo de neumonía bacteriana, (E) PCR-2 de un caso con diagnóstico anatomopatológico sin neumonía, (F) PCR-2 de control negativo, (G) PCR-2 de control positivo de células Vero infectadas con VSR.

Gel 2

M A B C D E F G



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la Tabla N° 6, la columna uno de PCR-2 indica que de 98 muestras de tejido pulmonar postmortem, 29 fueron positivas a VSR y 69 negativas por PCR, la segunda columna representa las pruebas de ausencia de inhibidores inespecificos e integridad de ADNc que se llevaron a cabo en los 69 casos negativos a VSR, ya que cada uno de ellos presentaron las bandas de 207pb y de 146pb correspondientes al control interno y a la región del gen FMR-1, respectivamente.

Tabla 6

	PCR-2	PRUEBAS DE AUSENCIA DE INHIBIDORES E INTEGRIDAD DE ADNc
No. de casos positivos	29	0
No. de casos negativos	69	69

La Tabla 7 muestra que de un total de 98 muestras de tejido pulmonar postmortem de niños menores de 2 años de edad que fallecieron con neumonía, el 30% fueron positivos a VSR por la PCR. De estas muestras, el 62% de positividad correspondió a niños con diagnóstico anatomopatológico de neumonía viral y el 25 % fueron de niños con diagnóstico anatomopatológico de neumonía bacteriana. Observándose diferencia significativa entre estos dos grupos (P=0.018).

Tabla 7

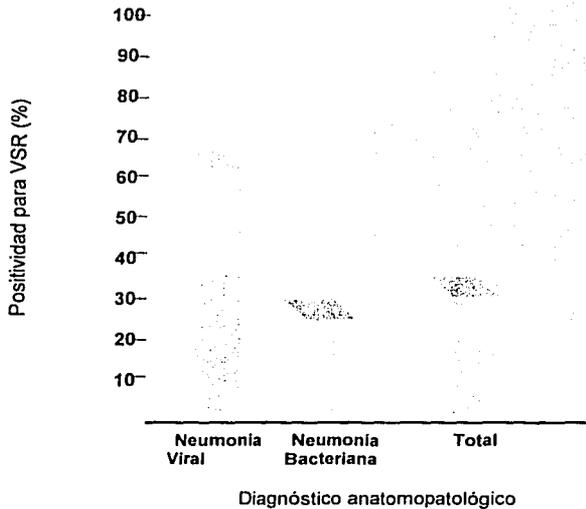
Frecuencia de infección por VSR mediante la PCR en biopsias de pulmón de niños menores de 2 años de edad que fallecieron con neumonía, de acuerdo al patrón anatomopatológico.

Diagnóstico anatomopatológico	Número de casos	Positividad para VSR (%)
Neumonía viral	13	8/13 (62)
Neumonía bacteriana	85	21/85 (25)
Total	98	29/98 (30)

P=0.018, prueba exacta de Fisher's

A continuación se presenta en la Gráfica 1 los resultados de la Tabla 7

Gráfica 1



Se muestra la frecuencia de infección por VSR en muestras de tejido pulmonar postmortem respecto al diagnóstico anatomopatológico. Presentando una mayor frecuencia de infección a VSR (62%) en las neumonías virales que dentro en las neumonías bacterianas (25%), por lo que se deben considerar las infecciones mixtas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la siguiente tabla los resultados se analizaron para observar la frecuencia de VSR en los niños menores de 2 años de edad que fallecieron con neumonía de acuerdo a la estación del año; encontrando, que en los niños que fallecieron con neumonía viral, el 80% fueron positivos a VSR en la temporada de Primavera – Verano y el 50% en la temporada Otoño-Invierno, no se encontró diferencia significativa (P=0.56). Con respecto a los casos de neumonía bacteriana observamos que en la temporada Primavera – Verano, el 22% fueron positivos a VSR y el 27% durante la temporada Otoño – Invierno, no encontrándose diferencia significativa (P=0.84). Cuando se analizaron de manera global los casos de neumonía, tampoco se observó diferencia significativa en ninguna de las estaciones del año (P= 0.95).

Tabla 8

Frecuencia de infección por VSR mediante la PCR en biopsias de pulmón de niños menores de 2 años de edad que fallecieron con neumonía, de acuerdo a la estación del año.

Estación	DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLÓGICO		
	Neumonía viral/ positividad para VSR (%)	Neumonía bacteriana positividad para VSR (%)	Neumonía global/ positividad para VSR (%)*
Primavera-Verano (Marzo – Agosto)	4/5 (80)	8/36 (22)	12/41 (29)
Otoño-Invierno (Septiembre-Febrero)	4/8 (50)	13/49 (27)	17/57 (30)
Total	8/13 (62)	21/85 (25)	29/98 (30)
	P=0.56	P=0.84	P=0.95

P= prueba exacta de Fisher's

*porcentaje = $\frac{\text{casos positivos a VSR}}{\text{total de casos}}$

DISCUSION DE RESULTADOS

Este estudio aporta la primera información epidemiológica en nuestro país respecto a la frecuencia con la que el virus sincicial respiratorio infecta a niños menores de 2 años de edad que fallecieron con neumonía, durante el período de 1989-1997. La frecuencia global de infección por VSR obtenida de 98 biopsias de pulmón de niños que fallecieron con diagnóstico anatomopatológico de neumonía, fue de 30%. En estudios previos del Reino Unido, se encontró que el VSR estaba infectando entre 25% a 28%, de niños menores de 6 meses de edad que fallecieron por enfermedad respiratoria sugestiva de neumonía.^(6,12)

En nuestro estudio, la frecuencia de infección por VSR en niños con diagnóstico de neumonía viral, fue elevada (62%) a pesar de los pocos casos estudiados. Mientras que en los niños que fallecieron con diagnóstico de neumonía bacteriana, se encontró una frecuencia de 25%. Este dato sugiere que se debe considerar la posibilidad de infección mixta, ya descrito previamente por otros investigadores que han encontrado una frecuencia de VSR con asociación bacteriana desde 1.2% hasta de 39%, en niños con neumonía.^(34,35) Aunque existe controversia respecto a los porcentajes elevados de infección por VSR ya que se ha reportado que es bajo el riesgo con asociación bacteriana en la infección por este virus.

De las muestras de pulmón positivas a VSR en las que no se observó la banda de 390pb, por la PCR-1, al realizar la PCR-2, se observó la banda de 207 pb, ya que se aumenta la sensibilidad y especificidad del método. Este aspecto ya ha sido mencionado por otros investigadores.⁽²⁹⁾

Para la detección del VSR en las muestras de tejido pulmonar, se desarrolló el método de la PCR, el cual se considera sensible y específico para la detección de secuencias de ácidos nucleicos. Del ADNc resultante de la transcripción reversa se llevó a cabo la amplificación mediante la PCR-1 y la PCR-2 observando las bandas de 390pb y de 207pb, respectivamente, ya descritas previamente por Okamoto y col.⁽²⁷⁾ Esto mostró que la PCR identifica como positivo las células Vero infectadas por VSR. Dada la falta de estudios con esta metodología (PCR), también fue necesario evaluar la prueba, con 30 biopsias de tejido pulmonar postmortem incluido en parafina. Encontrando en esta evaluación que la PCR es útil para discriminar entre muestras de pacientes con alta y muy baja probabilidad de infección por VSR ($P=0.0015$). Estos datos sugieren que el método es sensible y específico, y que es útil para discriminar entre muestras de pacientes con alta y muy baja probabilidad de infección por este virus.

De las 98 muestras estudiadas, 69 fueron negativas y para confirmar que estas muestras, no fueran falsas negativas, se comprobó la integridad del ADNc en cada

una de las muestras, utilizando oligonucleótidos específicos para una región del gen FMR-1 ⁽³⁷⁾, que al observar la amplificación de la banda de 146 pb en cada una de las muestras, se demostró que el ADNc estaba integro. También se demostró la ausencia de inhibidores inespecíficos utilizando un control interno de VSR observándose la banda de 207 pb. El trabajar en un área estéril, con material estéril y exclusivo para PCR, evitó que hubiera contaminación en las muestras, todas estas recomendaciones también fueron utilizadas por otros investigadores. ⁽²⁴⁾

Con respecto a la frecuencia de infección por VSR en los niños menores de 2 años de edad fallecidos con neumonía en los que se relacionó la temporada del año, no se encontró diferencia significativa que nos indicara lo observado por otros investigadores, que señalan que VSR presenta un patrón estacional. ⁽³⁸⁾

Los resultados obtenidos en esta investigación, indican que la infección por VSR es común ya que en 3 de cada 10 niños menores de 2 años de edad que fallecieron por neumonía, se encontró involucrado este agente viral. Siendo la infección por VSR más común en los casos con patrón anatomopatológico de neumonía viral, pero también se identificó como infección mixta en aquellos casos con patrón anatomopatológico de neumonía bacteriana. Esto sugiere que la mortalidad asociada a esta infección es alta en niños menores de 2 años de edad con enfermedad pulmonar.

Los datos obtenidos en este estudio, ⁽⁴³⁾ muestran que la tercera parte de los niños menores de 2 años de edad fallecidos con neumonía es causado por VSR, informando al clínico la importancia de realizar el diagnóstico rápido de este virus en el ambiente hospitalario. Por este motivo, la PCR desarrollada en células Vero y aplicada a tejido pulmonar en este estudio, ya fue adaptada a muestra nasofaríngea en niños menores de 5 años de edad con neumonía hospitalizados en el IMSS de Tlaxcala, e Hidalgo, para conocer la concordancia entre este método y la IFA. Observándose una reproducibilidad excelente para la determinación de VSR, ya que los mismos casos positivos fueron detectados por ambos métodos. ⁽⁴⁴⁾ Basados en estos resultados, se deberá llevar a cabo, un estudio de prueba diagnóstica para determinar la sensibilidad y especificidad por IFA y la PCR desarrollada por nosotros, para poder seleccionar el método más preciso y así obtener el diagnóstico temprano de VSR en muestra nasofaríngea de niños de alto riesgo hospitalizados por neumonía, para que puedan recibir tratamiento antiviral oportuno, ⁽²⁾ evitando el uso indiscriminado de antibióticos, así como, impedir las infecciones nosocomiales. ⁽³¹⁾

CONCLUSIONES

- El método de la PCR para la detección de VSR en biopsias de tejido pulmonar postmortem, es útil para discriminar entre muestras de pacientes con alta y muy baja probabilidad de infección por VSR.
- La frecuencia global de VSR encontrada por la PCR en 98 biopsias de pulmón de niños menores de 2 años de edad que fallecieron con neumonía, fue de 30%. En los niños que fallecieron con neumonía viral fue de 62% y en los niños que fallecieron con neumonía bacteriana fue de 25%.
- No se observó una diferencia significativa en la frecuencia de infección por VSR detectado por PCR, en las muestras de niños menores de 2 años de edad que fallecieron con neumonía cuando se analizaron por temporada del año.

PREPARACION DE REACTIVOS

- Agua DEPC 0.1%.

Dietil pirocarbonato..... 0.05 mL
Agua deionizada..... 49.95 mL

Homogenizar, dejar reposar toda la noche a temperatura ambiente y finalmente esterilizar durante una hora en autoclave. Guardar en frasco ámbar y cada vez que se abra el frasco emplear condiciones de esterilidad.

- Etanol 75 %.

Etanol absoluto..... 75.0 mL
Agua DEPC.....c.b.p 100.0 mL

Mezclar y guardar en un frasco ámbar en condiciones de esterilidad el mismo día que se utilice, dejar enfriar la solución antes de usar.

- Buffer TAE 50X.

Tris base..... 121.0 g
Ác. acético glacial..... 28.5 mL
EDTA 0.5 M..... 50.0 mL
Agua desionizada..... c.b.p. 500.0 mL

Mezclar y agitar hasta disolver el Tris base, ajustar pH 8, esterilizar por filtración (filtro millipore 0.22 μ M), finalmente guardar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

- Buffer de carga 10X.

Ficoll..... 2.0 g
EDTA 0.1 M..... 1.0 mL
SDS..... 0.1 g
Azul de bromofenol..... 0.025 g
Agua desionizada..... 10.0 mL

Mezclar y agitar hasta disolver, usar frasco ámbar y guardar a temperatura ambiente.

- Bromuro de Etidio 10 μg / ml.

Bromuro de etidio..... 50.0 mg
Agua desionizada..... 5.0 mL

Mezclar y agitar hasta disolver, guardar en frasco ambar a temperatura ambiente.

- Gel de agarosa 1.5 %.

Agarosa..... 0.375 g
Buffer TAE 50X..... 0.5 mL
Agua deionizada..... 24.5 mL

Disolver la agarosa en horno de microondas, dejar enfriar un poco para adicionar el buffer TAE 50X, agitar y finalmente vaciar en un soporte de plástico de 6.5 cm x 8.5 cm y colocarlo en la cámara de electroforésis. Dejándose solidificar por 30 minutos.

GLOSARIO

Acidosis: Disminución de la reserva alcalina de la sangre.

Anoxia: Oxidación insuficiente.

Anticuerpo: Inmunoglobulina esencial para el sistema inmune, producida por el tejido linfóide.

Antígeno: Sustancia que introducida en el organismo provoca la formación de anticuerpos.

Amplificación: Generación de múltiples copias de un gen.

Apnea: Suspensión transitoria de la respiración.

Biopsia: Extracción de una pequeña pieza de tejido de un órgano que mediante el examen histopatológico establece o confirma un diagnóstico.

Bronquitis: Inflamación aguda o crónica de la mucosa de los bronquiolos.

Bronquiolitis: Inflamación de los bronquiolos.

Cápside: Cubierta proteica de un virión o de una partícula viral.

Cianosis: Coloración azul o livida de la piel y mucosas por causa de oxigenación insuficiente de la sangre.

Disnea: Dificultad en la respiración.

dNTPs: Mezcla de dioxinucleótidos (dATP, dGTP, dTTP y dCTP).

Electroforésis: Movimiento de partículas cargadas en suspensión a través de un medio líquido, como respuesta a los cambios de un campo eléctrico.

Enfermedad: Alteración o desviación del estado fisiológico en una o varias partes del cuerpo.

Epidemia: Enfermedad accidental, transitoria, generalmente infecciosa, que ataca al mismo tiempo y en el mismo país o región a gran número de personas.

Estertor: Sonido respiratorio anormal percibido por auscultación torácica producido por el paso del aire a través de exudados bronquiales.

Fibrosis quística: Transtorno hereditario de las glándulas exocrinas que hace que produzcan una secreción densa de moco.

Fijación del complemento: Reacción inmunológica en la que un antígeno se combina con un anticuerpo en presencia del anticuerpo y eritrocitos de glóbulos rojos de carnero.

Genoma: Conjunto de todos los genes de un individuo.

Gen: Unidad de material hereditario que ocupa un locus definido en un cromosoma.

Hidrofilico: Compuesto soluble en agua.

Hidrofóbico: Compuesto insoluble en agua.

Hipercapnia: Cantidad excesiva de CO₂ en la sangre.

Hiperexpansión: Posición de máxima extensión.

Hipoxia: Anoxia moderada.

Huésped: Organismo en el que vive otro organismo parasitario.

Infeción: Implantación y desarrollo en el organismo de seres vivos patógenos.

Inmunofluorescencia: Técnica rápida empleada para identificar un antígeno o anticuerpo, exponiéndolo a un anticuerpo o antígeno conocido, marcados con fluoresceína y observándose la reacción fluorescente de antígeno o anticuerpo con lámpara de luz ultravioleta.

Jadeo: Patrón de ventilación caracterizado por una respiración rápida y superficial.

Lábil: Inestable, que se caracteriza por una tendencia a cambiar fácilmente.

Mortalidad: Número proporcional de muertes en una población y tiempo determinados.

Morbilidad: Número proporcional de personas que enferman en una población y tiempo determinados.

Nosocomial: Perteneciente o relativo al hospital.

Oligonucleótido: Secuencias complementarias y específicas de un segmento de ADN ó ARN el cual es amplificado.

Otitis: Inflamación aguda o crónica del oído.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Patógeno: Organismo capaz de producir enfermedad.

Pb: Pares de bases.

PCR: Método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa empleado para la amplificación de ADN o ARN.

Retracción de tórax: Hundimiento visible de los tejidos blandos del tórax entre y alrededor de los tejidos más firmes de las zonas cartilaginosas y óseas de las costillas.

Rinorrea: flujo abundante de moco nasal.

Sincicio: Célula simple o masa de protoplasma con muchos núcleos.

Taquipnea: Respiración acelerada, superficial.

Templado: Contiene el ADN extraído a partir de muestras o de un control.

Tos: Expulsión súbita, ruidosa, más o menos repetida y violenta de aire de los pulmones.

Viremia: Presencia de virus en la sangre.

REFERENCIAS

1. Hall CB. Respiratory Syncytial Virus. In: Feigen RD, Cherry JD, Cherry JD, eds. Textbook of pediatrics infections disease. 4th ed. Vol 2. Philadelphia: Saunders, 1998: 2084-11.
2. Moscona A. Management of respiratory syncytial virus infections in the immunocompromised child. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19:253-4
3. Chanock RM, Mc Intosh, Murphy BR. Respiratory syncytial virus. In Evans As ed. *Viral infections of humans*. New York: Plenum, 1989:1-3
4. Reported by: Respiratory and enteric viruses, National center for infectious diseases, CDC. Update: Respiratory syncytial virus activity United States, 1997 - 1998 Season. *JAMA*, 1998; 279: 264 - 5.
5. Downhan MAPS, Gardener PS, Mc Quillin J, Ferris JA. Role of respiratory viruses in and childhood mortality. *Br Med J* 1975; 1:235-9.
6. Gardner PS, Turk DC, Aherne WA, Bird T, Holdawag MD. Deaths associated with respiratory tract infection in childhood. *Br Med J* 1967;4:316-20
7. Anderson LJ, Peker RA, Strikas RL. Association between respiratory syncytial virus out breaks and lower respiratory tract deaths of infants and young children 1990;161:640-1.
8. Swierkosz EM, Flanders R, Melvin L, Miller JD, Line Mw. Evaluation of abbot testpack RSV enzyme immunoassay for detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal swab specimens. *J. Clin Microbiol* 1989; 27:1151-7.
9. Wright PA, Wynford-Thomas D. The polymerase Chain reaction: Miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J. Pathol* 1990;162:99-101. Wallace RA, King JL. Evolución y Microorganismos. Trillas México; 1990,2:110- 2.
10. Behrman R E Kliegman R M, Arvin AM,. Nelson Tratado de Pediatría. Vol 1, 15^a ed, Madrid: editorial Mc Grawll-Hill, 1997: 29,897-9.
11. Kumate Jesús, Onofre Muñoz, González Gutiérrez, José Ignacio Santos. Manual de Infectología. 13 ed. Editores Méndez. 1992, México.
12. Latham-Sadler BA, Morell VW. Viral and atypical penumonias. *Primary Care* 1996; 23: 837-48.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

13. White DO, Fenner FJ. *Medical Virology*. 3ª ed. Orlando Florida: Academic Press, 1986:4-7,521-39.
14. Rhodes AJ, Rooyen CE. *Tratado de Virología*. Barcelona: Ediciones Toray, 1989: 481- 3.
15. Escobar GA, Valdespino JL, Sepúlveda AJ. *Vacunas, Ciencia y Salud*. México: Secretaría de Salud, Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo, 1992: 409-20.
16. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Virology*. 3ª ed. Vol 1. Philadelphia: Editorial Lippincott-Raven, 1996:1313-37.
17. Carballal G, Oubiña JR. *Virología Médica*. Buenos Aires: Librería el Ateneo Editorial, 1991: 131-7.
18. Webster RG, Granoff A. *Encyclopedia of Virology*. Vol.3, San Diego: Academic Press: 1994: 1210-25.
19. Jawetz E. y col. *Microbiología Médica*. México: Manual Moderno, 1990: 372, 376, 379-81.
20. Zinsser, Wolfgang K.J, Willett HP, Amos BD. *Microbiología*. 18ª ed. Buenos Aires: Panamericana, 1989: 1191-4.
21. Elaine EL, Wang MD, Barbara JL. Respiratory syncytial virus infection in pediatric patients. *Sem Ped Inf Dis* 1998;9:146-53.
22. Murguía de Sierra T, Casasola FJ, Rosales US, Nava IV, Navarrete NS. Brote de infección por virus sincicial respiratorio en una unidad de cuidados intensivos neonatales en la ciudad de México. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1993, 50: 709-15.
23. Joanne M. Langley, John C. Leblanc, Elaine E.L Wang, Barbara J. Law, Noni E. MacDonald, Ian Mitchell, Derek Stephens. Nosocomial Respiratory syncytial virus infection in Canadian Pediatric Hospitals: a pediatric investigators collaborative Network on infections in Canada study. *Pediatrics* 1997;100: 943-6.
24. Freymuth G, Eugene G, Vabret A, Petitjean J, Gennetay E, Brouard J, Duhamel JF. Detection of Respiratory Sincytial Virus by Reverse Transcription-PCR and Hibridization with a DNA enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3352 - 5.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

25. Wilbert Alfaro. Infecciones virales del tracto respiratorio inferior en niños: etiología y diagnóstico. Rev Méd Hosp Nal. Niños Costa Rica 1994;29: 45-54.
26. Sweet C A, Santos PS. Avances en el diagnóstico molecular de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Gac Méd Méx 1997; 133: 111-6
27. Okamoto Y, Kudo K, Shirotori K, Nakasawa M, Togawa K, Patel JA. Detection of genomic sequences of respiratory syncytial virus in otitis media with effusion in children. Ann Otol Rhinol Laryngol 1992;101:7-9.
28. Tompkins LS, Warford AL. DNA: Nueva era en diagnóstico. Atención Médica 1993;12:35-41-5.
29. Cubie HA, Inglis JM, leslie EE, Edmunds AT, Totapally B. Detection of Respiratory Syncytial virus in acute bronchiolitis in infants. J Med Virol 1992 38:283-6.
30. Lara LG, Azzeddine D, Bonnie MB, Thomas EE. Diagnosis of viral respiratory tract infections in children by using a reverse transcription-PCR panel. J Clin Microbiol 1996; 34:140-3
31. Rodríguez WJ, Gruber WC, Groothuis JR, Simoes EA, Rosas AJ y col. Respiratory syncytial virus immune globulin treatment of RSV lower respiratory tract infection in previously healthy children. Pediatrics 1997; 100: 937-42.
32. Lwanga SK, Lemeshow S. Sample size determination in health studies. A practical manual. Geneva: World Health Organization, 1991: 1-8.
33. Kobzick L, Shoen FJ. The lung: Cotran RS, Robbins SL. Eds. Pathologic. Basis of disease. Philadelphia: WB Saunders, 1994: 673-9.
34. Korppi M, Leinonen M, Koskela M, Mäkelä H, Launiala K. Bacterial coinfection in children hospitalized with respiratory syncytial virus infections. Pediat Infect Dis J 1989; 8: 687-92.
35. Hall BC, Powell RK, Schnabel CK, Gala ChL, Pincus HA. Risk of secondary bacterial infection in infants hospitalized with respiratory syncytial viral infection. J.Pediatr 1988; 113: 266-71.
36. Eisenstein BI. The polimerase Chain reaction. N Engl J Med 1990;322:178-83.
37. Pieretti M, Zhang F, Ying-Hui F, Stephen TW, Oostra AB, Caskey TC, Nelson DL. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. Cell 1991; 66: 817- 22.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

38. Meqdam MM, Rawashdeh MO, Masaadeh H, Shurman AA, Abuharfeil N. Respiratory Syncytial Virus infection in infants hospitalized with respiratory illness in Northern Jordan. *J Trop Pediatric* 1998; 44: 92-94.
39. Meissner H C. Respiratory syncytial virus and nosocomial disease. *Neonatal Intensive Care* 1994; January/February :54-9.
40. Mitchell AA, Ballou EF, Buddo E, Dowding G, Voegler J, Spillan B. Manual of histologic and special staining technics. Editorial Mc Graw-Hill, 1957. 1, 6-8.
41. Jacobs JW, Peacock DB, Corner BD, Cau ED, Clarke SK. Respiratory Syncytial and other viruses associated with respiratory disease in infants. *Lancet* 1996;4:316-20.
42. Committee on infectious Diseases. RED Book. 25th Edition. American Academy of pediatrics. 2000, 483-7.
43. Bustamante-Calvillo ME, Velásquez-Castillo FR, Peña-Arguelles AL, Reyes-Morales H, Guiscafre-Gallardo J, Torres-López J, Muñoz-Hernández O. Comparative detection of Respiratory Syncytial Virus (RSV) infection by IFA and RT-PCR in Mexican children hospitalized with pneumonia. Resumen 701. Infectious Diseases Society of America. 1999 Annual Meeting. Philadelphia, PA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN