



Incorporación de la técnica de RT-PCR para la detección del virus sincitial respiratorio

Francisco Javier Archundia Sánchez*

Jorge Evaristo Alejandro Cruz*

Carlos Cabello Gutiérrez*

Dora Patricia Rosete Olvera*

María Eugenia Manjarrez Zavala*

Palabras clave: Virus sincitial respiratorio, virus respiratorios, diagnóstico de virus respiratorios, diagnóstico molecular de virus, reacción en cadena de la polimerasa, inmunofluorescencia, cultivo celular.

Key words: Respiratory syncytial virus, respiratory viruses, respiratory virus diagnostic, virus molecular diagnostic, polymerase chain reaction, immunofluorescence, cellular culture.

RESUMEN

Objetivo: Estandarizar e incorporar técnicas de biología molecular, RT-PCR para la detección del virus sincitial respiratorio que complementen y enriquezcan el diagnóstico.

Material y métodos: se utilizaron cepas de referencia del virus sincitial respiratorio de los grupos A y B (virus stock ATCC), las cuales se propagaron y titularon en células HEp-2. Se realizaron pruebas de inmunofluorescencia indirecta y de la prueba RT-PCR. Para ello se extrajo el ARN del virus con trizol, se realizó una transcripción reversa para obtener ADNc y, para la PCR se utilizaron oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen de la proteína G del virus sincitial respiratorio. Para comprobar la especificidad de la prueba se utilizaron virus de la misma familia (sarampión y parainfluenza) y virus de

diferentes familias (influenza y adenovirus). Al evaluar la sensibilidad se utilizaron diferentes diluciones del ADNc viral.

Resultados: en el cultivo, el efecto citopático se puede observar claramente del cuarto al octavo día. La prueba de inmunofluorescencia como se sabe es una técnica sensible y específica para el virus. La RT-PCR que se desarrolló, fue efectiva para la amplificación del ADNc; además, mostró ser específica para el virus sincitial respiratorio, ya que no amplifica material genético de otros virus incluyendo a aquellos que pertenecen a la misma familia. La sensibilidad de la prueba es alta, alcanzando a amplificar hasta picogramos de ADNc.

Conclusiones: la rapidez de la inmunofluorescencia, permite dar un diagnóstico presuntivo que después puede ser comprobado por el aislamiento y propagación del virus en cultivo celular. La técnica de RT-PCR con los oligonucleótidos que utilizamos fue sensible, específica y rápida, por tanto debe ser tomada en cuenta para el apoyo al diagnóstico clínico. Con lo anterior, no se trata de sustituir las técnicas tradicionales, sino contar con mayores opciones y además reforzarlas; de esta manera, se podrá fundamentar mejor el diagnóstico de las infecciones virales.

* Departamento de Investigación en Virología, INER.

Correspondencia:

Dra. Ma. Eugenia Manjarrez Zavala. Departamento de Investigación en Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
Calzada de Tlalpan 4502, colonia Sección XVI, México, D.F., 14080

Tel: 56 66 45 39 ext-123

Trabajo recibido: 14-IX-2000; Aceptado: 28-IX-2000

ABSTRACT

Objective: To standardize and incorporate the molecular biology technique of RT-PCR to the

detection of respiratory syncytial virus (RSV) to complement and enrich the diagnosis.

Material and methods: RSV reference strains from groups A and B (virus stock ATCC) were propagated and titered with HEP-2 cells. Indirect immunofluorescence and RT-PCR tests were performed. For this, RNA was extracted with trizol and cDNA was obtained by retrotranscription. For the PCR, oligonucleotides were obtained which amplify the fragment of the gene coding for protein G of RSV. To test specificity, viruses from the same family, measles and parainfluenza, and of different families, influenza and adenovirus, were used. Sensitivity was tested with several dilutions of viral cDNA.

Results: The cytopathic effect may be clearly observed from the fourth to the eighth day. Immunofluorescence is, as known, a sensitive and specific test for the virus. The RT-PCR was effective for the amplification of cDNA and also proved to be so for RS, since it does not amplify genetic material of other viruses, even if they belong to the same family. The sensitivity of the test is high; it amplifies amounts as small as picograms of cDNA.

Conclusion: The speed of immunofluorescence may be used to give a presumptive diagnosis which can be confirmed by isolation and propagation of the virus in cell culture. The RT-PCR technique with the oligonucleotides used was sensitive, specific and quick, and can therefore be used to support the clinical diagnosis. This does not imply that previous techniques should be substituted but may it does add to the options and gives support to the diagnosis of viral infections.

INTRODUCCIÓN

En México, las infecciones respiratorias agudas (IRA) ocupan uno de los primeros lugares entre las enfermedades transmisibles, principalmente en el grupo de menores de cinco años. Para 1999, la OMS reportó 4,039,000 de muertes por IRA en el ámbito mundial y una tasa de morbilidad de 1 301.7 por cada 10,000 habitantes¹. La principal causa de las IRA son las infecciones virales, destacando en importancia el virus sincitial respiratorio (VSR), el cual produce una amplia variedad de enfermedades en el aparato respiratorio, desde un ligero resfriado hasta una agresiva y mortal neumonía, además es el agente más importante de neumonía y bronquiolitis en niños menores de 1 año²⁻⁴.

A pesar de que en nuestro país las IRA representan un problema de salud importante, son pocos los laboratorios que realizan un diagnóstico viral, también son pocos los estudios epidemiológicos de virus respiratorios, así el conocimiento de los virus que circulan en nuestro país es reducido. Además, cuando se aísla una bacteria, el tratamiento suele orientarse sólo con antibióticos y no se buscan agentes virales.

Omitir el diagnóstico viral tiene varias razones, entre ellas: 1) Resulta demasiado costoso, 2) No se cuenta con

antivirales efectivos, lo que hace pensar al médico que, el diagnóstico no representa ninguna ventaja, si no se cuenta con un tratamiento efectivo y 3) Los resultados requieren tanto tiempo que son de poco valor. Para tener resultados adecuados en el caso de pruebas inmunológicas para la detección de anticuerpos séricos, se requiere de dos tomas de muestras de sangre, una al inicio del cuadro y otra dos semanas después, lo cual permite observar una diferencia en los títulos de anticuerpos, sin embargo alarga el tiempo de tener un diagnóstico.

CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO

El VSR es un miembro de la familia *Paramyxoviridae* y del género *Pneumovirus*, tiene un genoma de ARN de cadena sencilla no segmentado y de polaridad negativa, que lo hace más susceptible a mutaciones y codifica para 11 proteínas (Figura 1)⁵; dos de las cuales son glucoproteínas: la proteína F, responsable de la fusión de la membrana viral a la célula y de la formación de sincitios en cultivos celulares⁶ y, la glucoproteína de unión llamada proteína G, las dos son importantes para la respuesta inmune del hospedero y generalmente en ellas se basa el diagnóstico del virus. También son el blanco al que van dirigidas las estrategias para el desarrollo de vacunas, de manera particular la proteína G. Dicha proteína está glucosilada en su extremo aminoterminal con oligosacáridos, en su forma madura forma alrededor del 60% de la masa viral.

Desde el punto de vista clínico, algunos autores clasificaron al VSR en cepas de diferente patogenicidad: alta, moderada y baja, posteriormente fueron asociadas a los grupos virales, pues con base en las características bioquímicas de la proteína G, se han identificado y caracterizado dos tipos o grupos de VSR el A y el B⁷. Al grupo A, se le asocia con cuadros clínicos de mayor severidad. Recientemente se han descrito mutaciones del virus que condicionan variaciones en los epítopes que generan anticuerpos neutralizantes^{8,9}. Estas variaciones se presentan principalmente en el gen de la proteína G, y se ha observado que son más frecuentes en las cepas del grupo A¹⁰. Por secuenciación del gen, se han identificado seis diferentes variantes de los genotipos del VSR del grupo A, denominados linajes SHL1 a SHL6¹¹. Estudios filogenéticos con secuencias del gen de la proteína G, han sugerido que las mutaciones en esta proteína parecen tener un papel importante en la diversificación del virus y que una de las características, derivadas de la variabilidad del virus, es la severidad de la infección; siendo la variante SHL5 del grupo A, a la que se le ha asociado a los cuadros más severos^{8,11}.

Se han descrito técnicas altamente específicas que permiten: detectar y aislar al virus, o bien, detectar a los componentes virales, como las proteínas del virus o su ácido nucleico. El cultivo del virus en líneas celulares, corresponde al primer tipo, con él podemos identificar la presencia del virus al observar el efecto citopático (ECP) que origina en las células infectadas, este ECP es característico del VSR y consiste en la formación de sincitios reconocidos como células gigantes multinucleadas. En el segundo tipo se tienen

Tabla I. Mezcla para transcripción reversa.

Componente	Muestra	Control(+)	Control (-)
Solución de 1-5 mg de ARN total de la muestra	11mL	–	11mL ARN de células sin infectar
ARN control (50 ng/mL)	–	1mL	–
Oligo (dT) (0.5 mg/mL)	1mL	1mL	1mL
H ₂ O DEPC	–	10mL	–
Volumen final	12mL	12mL	12mL

Tabla II. Solución MIX transcripción reversa.

Componente	Cantidad por reacción
10x PCR buffer	2mL
25 mM MgCl ₂	2mL
10mM dNTP mix	1mL
0.1M DTT	2mL
Total	7mL

Tabla III. Solución MIX para PCR de VSR.*

Componente	Cantidad por tubo
MgCl ₂ 50mM	1.2mL
PCR Buffer 10X	2mL
10 Mm d NTP	0.4mL
Oligos RSV1	0.4mL
Oligos RSV2	0.4mL
Oligos RSV3	0.4mL
Taq. Polimerasa	0.4mL
Total	5mL

* Las secuencias de cada oligonucleótido se muestran en material y métodos.

técnicas como la inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos marcados con fluoresceína que van dirigidos contra antígenos virales presentes en las células infectadas. Más recientemente se han implementado técnicas de biología molecular que permiten detectar el ácido nucleico de los virus, una de ellas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se basa en la amplificación del ácido nucleico del virus, utilizando oligonucleótidos que presentan secuencias específicas de los genes deseados, en el caso del VSR, el más

utilizado es el de la proteína G. Utilizando los oligonucleótidos específicos se puede incluso tipificar el grupo viral A o B.

La aplicación de estas técnicas puede ayudar a determinar la etiología de la infección, a tener mayor información sobre cuáles son los tipos de virus que más frecuentemente aquejan a la población mexicana y a implementar medidas de prevención en un momento dado, o también diseñar estrategias como son vacunas contra los tipos virales más frecuentes en nuestro país.

Así, los objetivos de este trabajo son: Estandarizar e incorporar técnicas de biología molecular y RT-PCR que complementen y enriquezcan el diagnóstico del VSR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de muestra

Se utilizaron cepas de referencia del VSR de los grupos A y B (cepas grupo A: A2, 9320, Long; cepas grupo B, CH18J37), propagados y titulados en células HEp-2, con medio esencial mínimo (MEM) (*in vitro*), suplementado con antibióticos (Estreptomycin-penicilina, 1%) (Sigma).

Cultivo celular

Se propagó la línea celular HEp-2 (carcinoma laríngeo humano) en MEM (Gibco BRL) suplementado con estreptomycin-penicilina al 1% (Sigma). Conteniendo además, 12.5 mL de bicarbonato de sodio estéril para mantener un pH final de 7.4 y enriquecido con suero fetal de bovino al 10% (*in vitro*), al medio con suero se le denomina medio completo.

PROPAGACIÓN VIRAL

En cajas de 80 cm³, se propagaron células HEp-2, cuando la monocapa estaba a una confluencia del 80% se infectaron

Tabla IV. Condiciones para la amplificación del genoma del VSR.

	Temperatura	Número de ciclos y tiempos
Pre-desnaturalización	95°C	7 minutos 1 ciclo
Extensión	95°C	30 seg 30 ciclos
	62°C	30 seg 30 ciclos
	72°C	30 seg 30 ciclos
Posextensión	72°C	7 minutos 1 ciclo

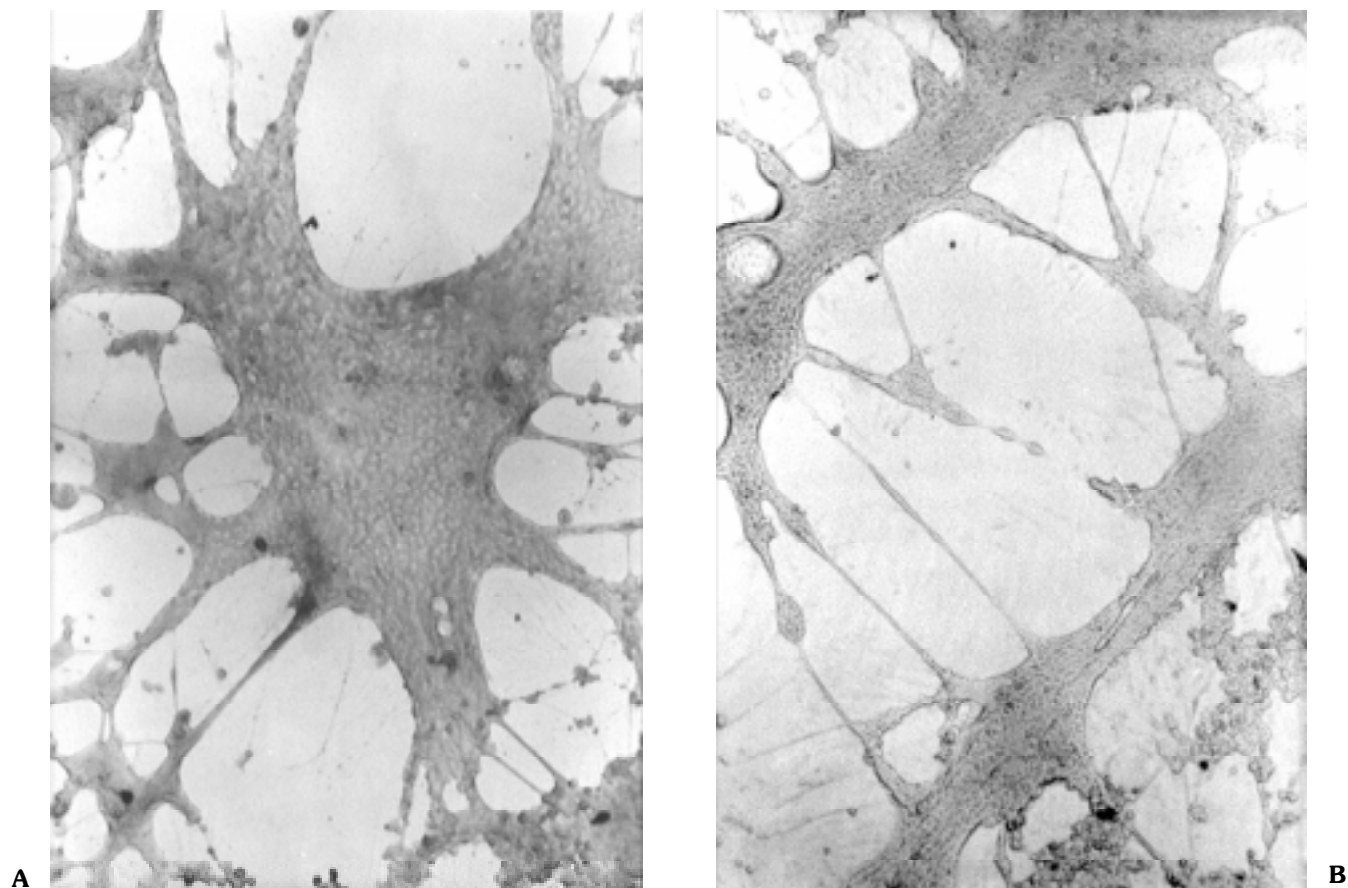


Figura 2. El efecto citopático (ECP) del VSR es la formación de sincitios. La observación del ECP, nos indica la presencia del virus, pero no permite distinguir entre los grupos virales, ya que no hay diferencia entre los sincitios por los dos grupos: **A)** ECP del grupo A; **B)** ECP del grupo B.

Posteriormente se disolvió el botón en 30mL de agua DEPC. Cuando es difícil resuspender se colocan los tubos 10 minutos a 55°C. Se incubó con ADNasa (GIBCO, BRL) libre de ARNasa a 37°C por 30 minutos. Se incubó a 90°C por 10 minutos para inactivar la acción de la ADNasa. Finalmente se cuantificó el ARN total por espectrofotometría a una densidad óptica de 260nm¹⁵.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Para esta prueba se hicieron adaptaciones de las condiciones ya descritas por otros autores¹⁴⁻¹⁶. Se prepararon tubos de acuerdo a la Tabla I, en la que se indican los reactivos y cantidades necesarias. Se incubó a 70°C por 10 minutos y se pasó a hielo un minuto. Por separado se preparó una mezcla etiquetada como MIX. En la Tabla II, se muestran los reactivos y cantidades indicadas y se agregaron 7mL de MIX a cada uno de los tubos de muestra, control positivo y control negativo y se agitó suavemente. Los tubos se incubaron 5 minutos a 42°C. A cada tubo se le adicionó 1mL (200 U) de enzima transcriptasa reversa SuperScript II (GIBCO BRL). Suavemente se mezcló e incubó durante 50 minutos a 42°C. Para detener la reacción se incubó a 70°C por 15 minutos y se pasó a hielo. Se agregó a cada tubo 1mL

de ARNasa (GIBCO BRL) y se incubó 20 minutos a 37°C para obtener el ADNc. A partir de esta reacción puede iniciarse la PCR.

PCR

Para esta prueba, se utilizaron los oligonucleótidos reportados por Gottschalk¹⁷, con ligeras modificaciones (en la tabla III se muestran las cantidades utilizadas). A partir del ADNc obtenido en la transcripción reversa, se obtienen amplificados de 217 y 283 pares de bases dependiendo del tipo A o B de VSR. Se preparó un tubo Ependorf etiquetado con MIX con el contenido por tubo, como se muestra en la Tabla III.

Las secuencias de los diferentes oligonucleótidos son: RSV1 (5' ATGCAACAAGCCAGATCAAG3') que amplifican el segmento del gen de la proteína G que se encuentra entre las 248 y 267 pares de bases del VSR tipo A; RSV2 (5' ACTCATCCAACAACCCACA3') que amplifican el segmento del gen de la proteína G localizado entre las 314 y 333 pares de bases del VSR tipo B; RSV3 (5' GGAACAAAATTGAACACTTC3') para el segmento del gen de la proteína G antisentido contenido entre 511 y 530 pares de bases; también se utilizaron iniciadores para el control de la PCR, CI

y CII CI (5'GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGCC3') y CII(5'GATGAGTTCGTGTCCGTACAACCTGG3') que amplifican 500 pares de bases del gen del fago 1. Las condiciones de temperaturas, número de ciclos y tiempos que se utilizaron para la amplificación del genoma viral se muestran en la Tabla IV. El orden de los tubos y su contenido se encuentra en la Tabla V. Para comprobar el producto de amplificación se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% y para teñir el ADN se usó bromuro de etidio y se observó en un sistema Ultralum Electronic Multi Wave Transiluminator.

RESULTADOS

El VSR induce la fusión de las membranas celulares, por lo que su ECP sobre células infectadas es la formación de sincitios. Comúnmente el ECP se observa entre el 5-8° día (Figura 2), cuando se usa algún colorante para teñir núcleos los sincitios se observan como células gigantes multinucleadas.

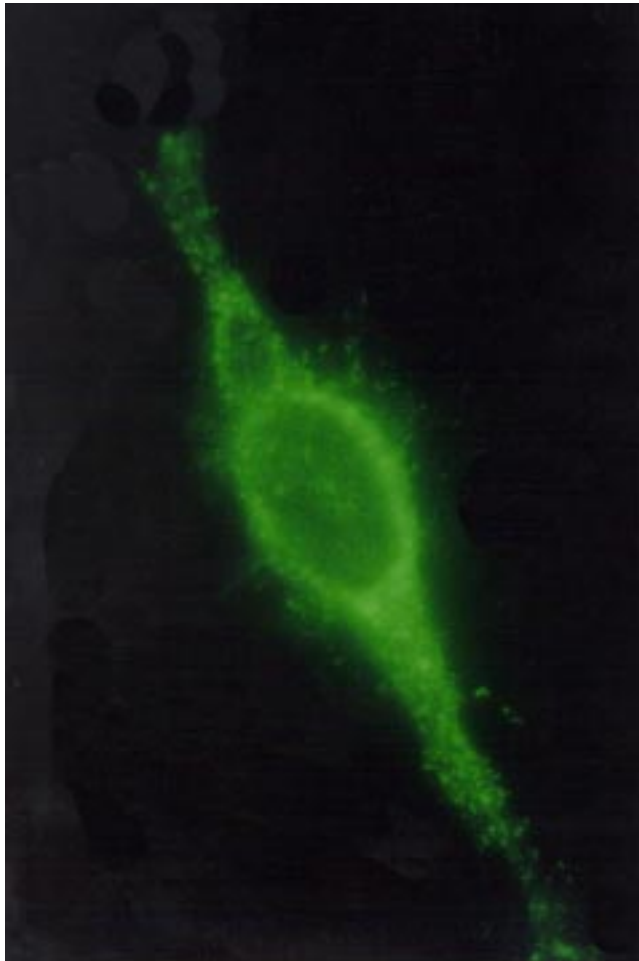


Figura 3. La inmunofluorescencia es una técnica rápida y eficaz para detectar los antígenos del VSR. Los anticuerpos monoclonales marcados con una sustancia fluorescente, se unen a las glucoproteínas de superficie del virus, formando un complejo antígeno-anticuerpo, el cual se puede visualizar en un microscopio de epifluorescencia. Las células se observan fluorescentes sobre un campo oscuro.

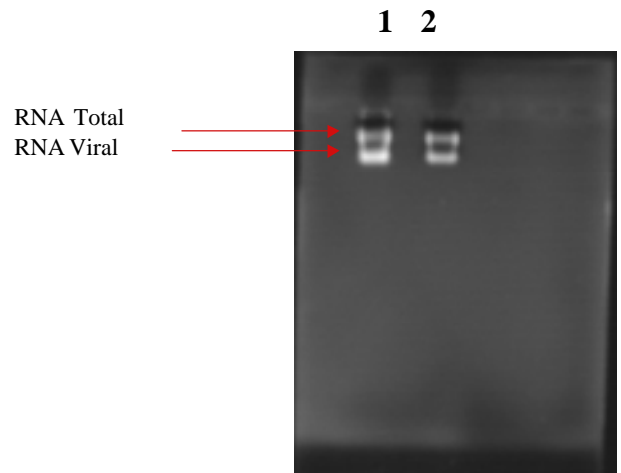


Figura 4. Resultados de la purificación de ARN. Células HEp-2 fueron infectadas con los grupos A y B del VSR y se obtuvo el ARN: Carril 1; VSR grupo A (cepa 9320), la banda superior, corresponde al ARN celular y la banda inferior al ARN viral; carril 2, VSR grupo B (cepa CH18J37), la banda superior, corresponde al ARN celular y la banda inferior al ARN viral.

El ECP se ve claramente, pero no permite distinguir entre grupo A y B (Figuras 2A VSR grupo A y, 2B VSR grupo B).

La IF es una técnica rápida y eficaz para detectar y localizar los antígenos virales. En la Figura 3, se pueden observar los antígenos virales en el citoplasma de las células infectadas con el VSR, las proteínas virales se ven de color verde fluorescentes sobre un campo oscuro. Como control negativo usamos células HEp-2 sin infectar.

Para montar la técnica RT-PCR, utilizamos oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen de la proteína G. En la Figura 1, se muestra el orden de los genes del virus, y la Figura 4 corresponde a un gel de agarosa en el que se pueden apreciar las bandas que corresponden al ARN celular y viral; en las Figuras 5A y B se observan las bandas correspondientes a los amplificadores según el VSR A y B. Para el tipo A se obtienen fragmentos de 283 pb y para el tipo B fragmentos de 217 pb. Con el fin de corroborar la sensibilidad y especificidad de la prueba, se realizaron los siguientes ensayos: para la especificidad, se utilizaron dos virus de la misma familia (sarampión y parainfluenza) y virus de diferente familia (influenza y adenovirus), realizando PCR sin que ninguno amplificara (Figura 6A). Para evaluar la sensibilidad se utilizaron diluciones conocidas del ADNc viral (Figura 6B), el límite de amplificación fue de 200 pg.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Tanto la IF como el aislamiento en cultivo celular, son pruebas que se han utilizado desde años atrás para el diagnóstico de virus. La identificación de antígenos virales por una técnica como la IF, tiene la ventaja de ser una prueba muy específica y rápida, de tal manera que las células infectadas que se descaman y son raspadas de piel

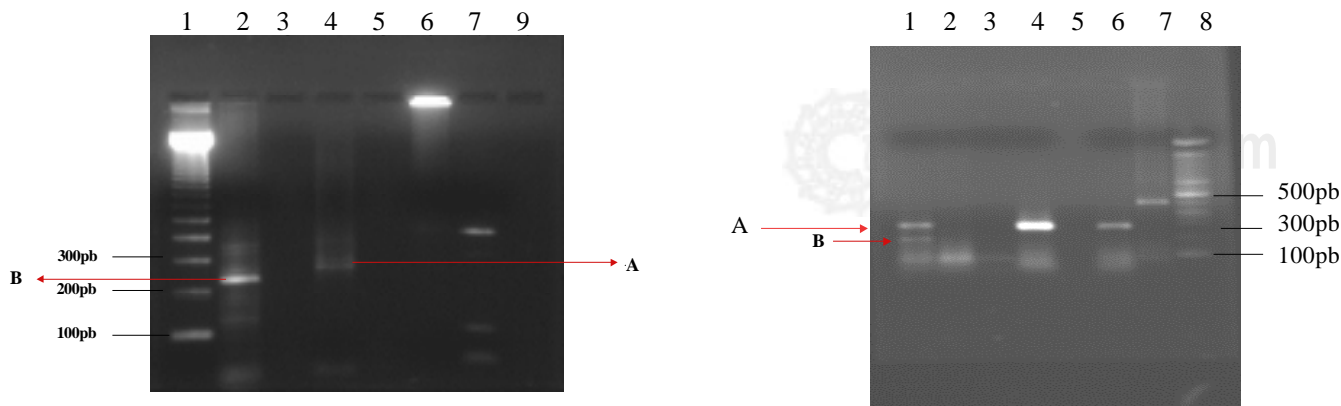


Figura 5. A): Resultados de la amplificación del ADNc del VSR: carril 1, marcador de PM; carril 2, VSR del grupo B (cepa CH18J37) 217pb; carril 3 vacío; carril 4, VSR del grupo A (cepa 9320) 283pb; carril 5 vacío; carril 6, control negativo con células HEp-2 sin infectar; carril 7 control positivo de la prueba de amplificación ADN de 500pb; 8 vacío. **B):** Resultados de la amplificación de ADNc del VSR: carril 1, VSR del grupo A (cepa 9320) 283pb y VSR del grupo B (cepa CH18J37) 217pb; carril 2, control negativo células HEp-2 sin infectar; carril 3, vacío; carril 4, VSR del grupo A2 (cepa A2) 283pb; carril 5, vacío; carril 6, VSR del grupo B (cepa CH18J37); carril 7, control positivo de amplificación ADN 500pb; carril 8, marcador de peso molecular.

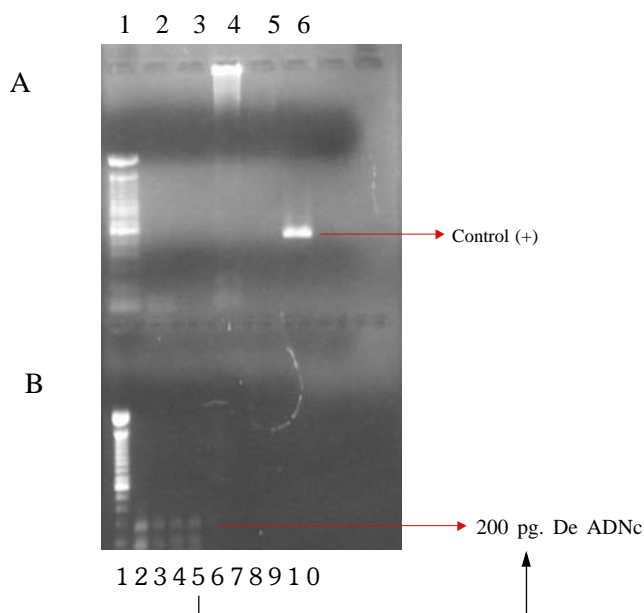


Figura 6. Pruebas de especificidad y sensibilidad de la RT-PCR para el VSR. **A):** En el gel se muestran los resultados obtenidos al utilizar virus de la misma familia (*Paramyxoviridae*) del VSR; carril 1, marcador de PM; carril 2, virus del sarampión; carril 3, virus de parainfluenza; carril 4, virus de influenza; carril 5 adenovirus; carril 6 control de amplificación ADN de 500pb. **B):** Se muestran los resultados de las pruebas de sensibilidad, se utilizaron diferentes concentraciones de ADNc: carril 1 marcador de PM; carril 2, ADNc del VSR 2mg; carril 3, 200mg; carril 4, 20mg; carril 5, 200pg.

o de membranas mucosas, tienen cantidades importantes de antígenos virales y en casos de emergencia (cuando es necesario obtener un diagnóstico presuntivo), la localización de los antígenos virales por IF, se puede realizar directamente en las células de descamación; o bien, cuando no es urgente el resultado, después del aislamiento viral en cultivo celular, la IF nos ayuda a caracterizar al virus aislado. La prueba tiene una sensibilidad de 96-99%. El aislamiento viral en cultivo de células, además de permitir la propagación del virus, también permite observar el ECP. Para el aislamiento del VSR se recomienda el uso de líneas celulares como HEp-2 y A549 (células de carcinoma laríngeo y carcinoma de pulmón respectivamente), en las cuales el virus produce el ECP característico, ya que aún siendo la misma línea celular hay variación en sensibilidad hacia el virus, el cual podrá propagarse sin causar el ECP. De forma tal que el ECP no con todas las muestras ni con todas las líneas celulares se puede observar de manera rápida y clara; no obstante las ventajas del cultivo celular, el proceso es demasiado largo ya que el ECP para el VSR se observará después de varios días, por lo que se sugiere que en casos de emergencia, se corra al mismo tiempo una prueba de IF, aunque subsecuentemente se continúe esperando el ECP.

La biología molecular ofrece un grupo de nuevas metodologías, una de ellas es la transcripción reversa (RT) con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ya se utiliza en el diagnóstico de algunos virus respiratorios. Nosotros la hemos implementado en nuestro laboratorio para el diagnóstico de VSR y se está montando para otros virus. Esta técnica tiene la ventaja de permitir tipificar al virus en grupo A o B, dicha metodología se ha caracterizado por su alta sensibilidad y alta especificidad, lo cual es importante pues el aislamiento o detección de antígenos virales se dificulta por la poca cantidad de virus presente en las muestras. La prueba se basa en la amplificación de

genes, a partir de los cuales se diseñarán iniciadores, oligonucleótidos específicos con el fin de identificar y amplificar el gen deseado para tener como resultado un tamaño específico del ADN. Con el VSR, al tener ARN como material genético es necesario realizar una transcripción reversa (RT), para así, partiendo del ARN aislado obtener un ADN complementario (ADNc) y llevar a cabo la PCR, quien utiliza ADN como material biológico^{16,17}.

Los resultados de sensibilidad y especificidad muestran que es una técnica sensible, específica y rápida, características que deben ser tomadas en cuenta para el apoyo al diagnóstico clínico. Es necesario dejar a un lado el desaliento de buscar intencionalmente los virus porque no existe tratamiento eficiente o cuando ya se ha encontrado una bacteria en los cultivos ya que el papel de la co-infección no ha sido totalmente determinado. Las infecciones bacterianas que cursan además, con infección de algunos virus respiratorios tienen un pronóstico más severo. Asimismo, es necesario que nuestro país genere sus propias estadísticas sobre los virus y si es posible sobre los grupos o tipos virales que enferman a los mexicanos ya que éste es uno de los fines de la estandarización de la RT PCR; es decir, además de ofrecer diagnóstico clínico a pacientes, permite realizar estudios de epidemiología molecular, que ayudarán a comprender más específicamente al virus y a planear campañas de prevención.

Finalmente, cada técnica ofrece ventajas y desventajas, por tanto, el montar diversas técnicas permite tener mayores opciones; en otras palabras, no se trata de sustituir técnicas tradicionales sino más bien de reforzarlas y de esta manera, fundamentar mejor el diagnóstico de las infecciones virales.

REFERENCIAS

1. WHO. *List of Member States. Region and mortality stratum*. 1999; 204-205.
2. Peret CT, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. *Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community*. J Gen Virol 1998; 79(Pt9):2221-2229.
3. Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, et al. *Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children*. J Infect Dis 1990;162:1283-1290.
4. Cane Pa, Weber M, Sanneh M, Dackour R, Pringle CR, Whittle H. *Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in The Gambia*. Epidemiol Infect 1999; 122:155-160.
5. Collins PL, McIntosh K, Chanock R. *Respiratory syncytial virus*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology*. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven, 1996: 1313-1351.
6. Pastey MK, Crowe Jr JE, Graham BS. *RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation*. J Virol 1999; 73: 7262-7270.
7. Cane PA, Pringle CR. *Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus: a review of the use of reverse transcription-polymerase chain reaction in the analysis of genetic variability*. Electrophoresis 1995;16:329-333.
8. Plows DJ, Pringle CR. *Variation in the fusion glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus subgroup A*. Virus Genes 1995;11:37-45.
9. Ball LA, Young KK, Anderson K, Collins PL, Wertz GW. *Expression of the major glycoprotein G of human respiratory syncytial virus from recombinant vaccinia virus vectors*. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:246-250.
10. Coggins WB, Lefkowitz EJ, Sullender WM. *Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital*. J Clin Microbiol 1998; 36:3552-3557.
11. Cane Pa, Pringle CR. *Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus: rapid identification of subgroup A lineages*. J Virol Methods 1992 ;40:297-306.
12. Manjarrez ME, Montufar E, Rosete D, Chapela R, Calderón I, Villalba J. *Infección en pacientes con inflamación y enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma*. Rev Inst Nal Enf Resp Méx 1999; 12 :101-106.
13. Chomczynski P, Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Ann Biochem 1987; 162:156-159.
14. Sullender WM, Sun L, Anderson LJ. *Analysis of respiratory syncytial virus genetic variability with amplified cDNA*. J Clin Microbiol 1993;31:1224-1231.
15. Jin H, Clarke D, Zhou HZ, Cheng X, Coelingh K, Bryant M, et al. *Recombinant human respiratory syncytial virus (RSV) from cDNA and construction of subgroup A and B chimeric RSV*. Virology 1998; 251:206-214.
16. Zheng H, Peret TC, Randolph VB, Crowley JC, Anderson LJ. *Strain-specific reverse transcriptase PCR assay: means to distinguish candidate vaccine from wild-type strains of respiratory syncytial virus*. J Clin Microbiol 1996; 43:334-337.
17. Gottschalk J, Zbinden R, Kaempf L, Heinzer I. *Discrimination of respiratory syncytial virus subgroups A and B by reverse transcription-PCR*. J Clin Microbiol 1996; 134: 41-43.