

Detección y tipificación del virus sincitial respiratorio mediante la técnica RT- PCR anidada en pacientes con infección respiratoria aguda*

MARÍA FERNANDA MOJICA[‡]
MARÍA FERNANDA ESCOBAR[‡]
MARTHA PATRICIA ESCALANTE[§]
CARLOS ALBERTO JARAMILLO[‡]
MARÍA DEL PILAR DELGADO[‡]

* Apoyo financiero: Esta investigación se financió con fondos de La Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

‡ Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Bioinformática, Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.

§ División de Virología, Laboratorio de Salud Pública, Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, Colombia.

Trabajo recibido: 08-V-2007; aceptado: 22-V-2008

Conflictos de intereses: Ninguno

92

RESUMEN

Antecedentes: El virus sincitial respiratorio (VSR) es uno de los principales agentes etiológicos de la infección respiratoria aguda (IRA), considerada como

Palabras clave: Virus sincitial respiratorio, infección respiratoria aguda, PCR anidada de transcripción reversa, diagnóstico molecular.

Key words: Respiratory syncytial virus, acute lower respiratory tract infection, reverse transcription-nested PCR, molecular diagnosis.

Objetivo: Desarrollo de un protocolo de RT-PCR anidada para la detección y tipificación del VSR en muestras respiratorias.

Métodos: Se incluyeron hisopados y aspirados nasofaríngeos provenientes de enfermos con clínica compatible con IRA, reportados como positivos o negativos para el VSR por inmunofluorescencia. Se

aplicó la técnica molecular RT-PCR seguida de un PCR anidada, para la detección y tipificación del VSR usando como blanco de amplificación el gen de la nucleocápside, que diferencia los tipos A y B gracias al tamaño de sus amplicones.

ABSTRACT

Background: Respiratory Syncytial Virus (RSV) is one of the main causes of acute lower respiratory tract infections (ALRTI), and one of the most important causes of morbidity and mortality in infants worldwide. Diagnosis of the entity and specifically, detection and characterization of certain etiological agents by conventional methods carries difficulties that molecular techniques such as reverse transcription PCR (RT-PCR) pretend to overcome.

Objective: To develop a nested RT-PCR protocol for the detection and typing of RSV in respiratory samples.

Methods: Nasopharyngeal swabs and aspirates from patients with symptoms compatible of ALRTI, that tested positive or negative for RSV by immunofluorescence assay, were used in this study. The molecular technique applied was a RT-PCR followed by a nested PCR using primers for the nucleocapsid gen, that discriminate RSV type A from B by the differential size of the amplicons.

Results: A total of 30 samples were processed, resulting in 2 positives for RSV type A, 16 for RSV type B, and 7 positive to both types; 5 were negative for RSV.

Resultados: Se procesaron en total 30 muestras, de las cuales 2 resultaron positivas para el VSR tipo A, 16 positivas para el VSR tipo B, y 7 mostraron una infección mixta por los tipos A y B; 5 fueron negativas para VSR.

Conclusión: Los resultados sugieren que el protocolo de RT-PCR aquí presentado ofrece una alternativa rápida y eficaz para la detección y tipificación del VSR a partir de muestras respiratorias.

INTRODUCCIÓN

El virus sincitial respiratorio (VSR) es uno de los principales agentes etiológicos de la infección respiratoria aguda (IRA), y representa una de las causas más importantes de morbilidad infantil en el mundo. Para la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, el 63.6% de los casos positivos para agentes virales durante 2005 fueron por el VSR.¹ La infección por el VSR se presenta en todos los grupos de edad, pero predomina en los niños menores de cinco años. Se reporta que más del 70% de los niños de un año han sido infectados por el VSR, y que el resto adquirirá la infección a los dos años.²

El diagnóstico de la infección respiratoria y específicamente la detección y caracterización de ciertos agentes *v.gr.*, el VSR, usando los métodos convencionales, presenta algunas falencias que pruebas moleculares como el PCR de transcripción reversa (RT-PCR) intentan resolver. Entre las técnicas diagnósticas, el cultivo se considera como la prueba de referencia o estándar de oro para el diagnóstico de la etiología de IRA, pero actualmente se cuestiona su papel debido a que, cuando es posible llevarlo a cabo, resulta laborioso, demorado y de sensibilidad variable.³ Para el caso particular, el método clásico para el diagnóstico del VSR es el aislamiento en cultivo celular, pero puede conllevar a resultados falsos negativos ya que este virus es muy lábil.⁴ Los ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA e inmunofluorescencia (IF) también presentan problemas de sensibilidad.⁵

Es probable que estas dificultades en el diagnóstico sean las responsables de que se desconozca la etiología en más del 50% de los casos de IRA;⁶ impidiendo el tratamiento adecuado de la enfermedad. Ante esta situación, se han venido

Conclusion: Our results suggest that this RT-PCR protocol represents a quick and effective alternative for the detection and typing of RSV from respiratory samples.

desarrollando técnicas moleculares para el diagnóstico de los virus causantes de IRA, con excelentes resultados. En uno de ellos, realizado en adultos, se compararon el RT-PCR con el cultivo, observándose que éste presentaba una sensibilidad del 39%, y la del RT-PCR de 73%, con especificidad cercana a 99%.⁷ No obstante, aún no hay consenso respecto a la técnica molecular que debe ser implementada; como consecuencia, el diagnóstico continúa siendo fundamentalmente clínico.

Con estos antecedentes, nuestro objetivo fue desarrollar un protocolo de RT-PCR anidada para la detección y tipificación del VSR en muestras respiratorias de niños con síntomas compatibles con IRA.

93

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio: Treinta pacientes de 0 a 5 años, con síntomas y signos compatibles con IRA, según el criterio de la Organización Mundial de la Salud.⁸

Las muestras fueron obtenidas entre julio de 2005 y enero de 2006 en diferentes centros hospitalarios de Bogotá, DC, Colombia; como parte del proyecto de "Vigilancia de la influenza y otros virus respiratorios en Bogotá", realizado por la Secretaría Distrital de Salud.

Especímenes: Las muestras respiratorias (hisopados o aspirados faríngeos o nasofaríngeos), fueron tomadas por médicos en varias instituciones centinela y remitidas al Laboratorio de Virología de la Secretaría de Salud de Bogotá (LVSSB). Se incluyeron en el estudio muestras que por la prueba de IF realizada en el LVSSB resultaron positivas, así como muestras negativas para el VSR.

Preparación del ácido ribonucleico (ARN). El ARN viral fue obtenido a partir de 140 μ L de

muestra con el QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qia- gen), según las recomendaciones del fabricante. De cada muestra se obtuvieron 2 alícuotas de 40 μ L cada una, las cuales fueron mantenidas a -20°C hasta su uso en la PCR.

Detección del agente. La detección del VSR se realizó amplificando la región comprendida entre los genes de nucleoproteína y la proteína fosforilada, por medio de la técnica de RT-PCR. Los cebadores utilizados fueron RS- VAB F (5'-GTCTTACAGCCGTGATTAGG-3') y RSVAB R (5'-GGGCTT-TCTTGTTACTTC-3'), descritos por Stockton.⁹ El volumen final de cada reacción correspondió a 25 μ L con una concentración de 0.2 mM de cada dNTPs, 2 mM de MgSO₄, 0.2 μ M de cada iniciador y una mezcla de transcriptasa reversa SuperScript II y Taq DNA polimerasa Platinum del kit SuperScript One-Step RT-PCR UIT Platinum Taq (Invitrogen).

Tipificación del VSR. Se realizó un PCR utilizando los iniciadores RSVA F (5'-GATGT- TACGGTG-GGGAGTCT-3') y RSVA R (5'- GTACACTGTAGTTAACACA-3') para el tipo A y RSVB F (5'-AATGCTAACATGGGGAGTTC-3') y RSVB R (5'-GAAATTGAGTTAACAGACAGC-3') para el tipo B, todos descritos por primera vez por Stockton.⁹ Los productos de amplificación esperados fueron de 334 pb y 183 pb para el tipo A y B, respectivamente.

Como control positivo se utilizaron cepas del VSR, provistas por el Instituto Nacional de Salud, instituto de referencia ubicado en Bogotá, Colombia, las cuales fueron confirmadas por PCR como tipo A y B. El blanco de reacción siempre fue agua estéril calidad Biología Molecular. Adicionalmente, cinco muestras negativas por IF y PCR para el VSR (denominadas C1, C2, C3, C4 y C5), pero positivas por la primera prueba para otros virus respiratorios (influenza y adenovirus), fueron incluidas a manera de controles negativos de la prueba.

Finalmente, alícuotas de 15 μ L resultado del PCR fueron sembrados en geles de agarosa al 2.0%. Una tinción posterior del gel, usando bromuro de etidio, permitió la visualización de los productos de reacción, tras realizar una electroforesis a 100 V durante 50 min.

RESULTADOS

Comprendieron 15 pacientes (53.3%) eran niños y 12 (40%) niñas, de los que 43.3% eran menores de 6 meses; se desconocen edad y sexo de los 3 restantes.

Los diagnósticos elaborados fueron neumonía- bronconeumonía, bronquiolitis y/o síndrome bronquiolítico agudizado, en el 43.3, 36.7 y 10%, respectivamente; definimos a la bronquiolitis como un primer episodio de sibilancias y fiebre o a un segundo episodio con estudio virológico positivo para VSR y síndrome bronquiolítico al conjunto de episodios que cursan con sibilancias y fiebre, no contemplados en la definición anterior. Los síntomas predominantes fueron hipertermia > a 38°C (88.9%) y dificultad respiratoria (50%). El 37% presentó sibilancias, ronquera y tos seca.

Del total de las 30 muestras incluidas, 25 resultaron positivas y 5 negativas para VSR cuando se aplicó la prueba de IF en el LVSSB.

La técnica del RT-PCR, aplicada a la totalidad de muestras mostró una concordancia del 100% con los resultados de la IF. Adicionalmente, la estandarización del protocolo aquí descrito permitió establecer que de las 25 muestras positivas para VSR, 16 correspondían al VSR tipo B, 2 al VSR tipo A y 7 a ambos tipos. La Figura 1 muestra algunos de los resultados obtenidos durante el proceso de estandarización de la prueba, la cual se llevó a cabo usando, tanto MgCl₂ (3.5 mM) como MgSO₄ (3.5 mM). En todos los casos, las bandas de peso molecular esperado fueron mejor visualizadas cuando se usó MgSO₄ en la concentración descrita. Esto se aprecia especialmente en las muestras 2 (pozos 2 y 3) y 17 (pozos 9 y 10), en donde se observa que cuando la reacción fue realizada empleando MgSO₄, las bandas correspondientes al VSR A y B se hacen evidentes, más claras y definidas.

La especificidad fue comprobada por la no amplificación de las denominadas muestras control, negativas por IF para el VSR. La sensibilidad de la reacción de PCR, evaluada por medio de diluciones del cDNA, como ha sido descrita por otros autores,¹⁰ se determinó en 20 pg/mL.

La Tabla I resume los resultados de las pruebas IF y RT-PCR, y algunas características demográficas como la edad y el sexo, así como el tipo

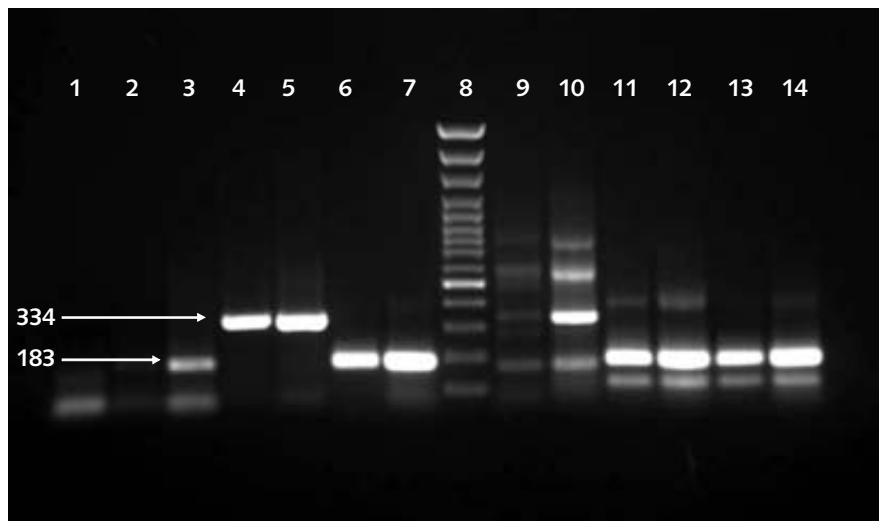


Figura 1. Detección y tipificación del VSR por RT-PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Pozo 1: control (-). Pozo 2: muestra 2 (c). Pozo 3: muestra 2 (s). Pozo 4: muestra 5 (c). Pozo 5: muestra 5 (s). Pozo 6: muestra 16 (c). Pozo 7: muestra 16 (s). Pozo 8: marcador de peso molecular. Pozo 9: muestra 17 (c). Pozo 10: muestra 17 (s). Pozo 11: muestra 18 (c). Pozo 12: muestra 18 (s). Pozo 13: muestra 19 (c). Pozo 14: muestra 19 (s). (c): $MgCl_2$; (s): $MgSO_4$. Se indican los tamaños moleculares aproximados de las bandas.

95

de muestra y el diagnóstico clínico de los pacientes incluidos en el estudio.

DISCUSIÓN

El diagnóstico de los agentes etiológicos de la IRA presenta grandes retos, principalmente por la gran variedad de agentes involucrados y la dificultad de obtener material representativo de las vías aéreas. Los signos clínicos específicos, el cultivo de muestras y las radiografías de tórax han mostrado tener poca correlación con el agente etiológico.¹¹ Igualmente, las técnicas de detección directa de antígenos *v.gr.*, la IF directa, aunque ofrecen resultados rápidos, carecen de sensibilidad, haciendo necesaria la realización de pruebas complementarias como el cultivo u otras pruebas adicionales de detección directa y/o indirecta de antígenos.^{5,12,13}

La alternativa RT-PCR es usada con mayor frecuencia por investigadores interesados en desarrollar pruebas moleculares que permitan un diagnóstico sensible y específico de agentes infecciosos difíciles de cultivar, entre ellos algunos de los virus que afectan el tracto respiratorio.

El protocolo de dos pasos aquí presentado incluye la ejecución de una PCR anidada realizada tras llevar a cabo un RT-PCR. El protocolo presenta una ventaja respecto a otras pruebas de este tipo, ya que permite al mismo tiempo la detección y tipificación de cepas del VSR presentes en las muestras.

La tipificación de cepas como A o B, se realiza con base en las diferencias de la región comprendida entre los genes de nucleoproteína y de la proteína fosforilada que se pueden hacer evidentes en los tamaños de los amplicones, los cuales corresponden a 334 pb para el primer tipo (Tipo A), y 183 pb para el segundo (Tipo B).

El procedimiento de RT-PCR aplicado en este estudio se basa en el propuesto por Stockton en 1998; el protocolo fue modificado por MF Escobar en el 2005 y posteriormente por Mojica *et ál* en el 2006. Para el proceso de estandarización se realizaron ensayos usando $MgCl_2$ o $MgSO_4$, encontrándose que al usar $MgSO_4$ a una concentración de 3.5 mM, las bandas presentes se hacen más evidentes y definidas, que cuando se usa $MgCl_2$ a la misma o en otras concentraciones, caso en los cuales se obser-

Tabla I. Detección del VSR en 28 muestras respiratorias por RT-PCR.

Muestra No.	Tipo de muestra	Sexo	Edad (en meses)	Diagnóstico clínico	Resultado IF	Resultado PCR
1	HN	M	2	N-B	VSR	VSR tipo B
2	AN	M	12	N-B	VSR	VSR tipo B
3	HN	M	5	B	VSR	VSR tipo B
4	AN	M	4	N-B	VSR	VSR tipo B
5	HN	F	13	N-B	VSR	VSR tipo A
6	AN	M	23	N-B	VSR	VSR tipos A y B
7	AN	F	8	SBA	VSR	VSR tipo B
8	N/E	F	5	B	VSR	VSR tipo A
9	N/E	M	2	B	VSR	VSR tipo B
10	AN	F	3	SBA	VSR	VSR tipo B
11	N/E	M	3	B	VSR	VSR tipo B
12	AN	F	5	N	VSR	VSR tipo B
13	N/E	F	7	B	VSR	VSR tipos A y B
14	AN	M	1	B	VSR	VSR tipo B
15	AN	M	6	N-B	VSR	VSR tipo B
16	N/E	M	10	N	VSR	VSR tipo B
17	N/E	N/E	N/E	N/E	VSR	VSR tipos A y B
18	N/E	F	4	B	VSR	VSR tipo B
19	N/E	N/E	N/E	N/E	VSR	VSR tipo B
20	N/E	M	11	B	VSR	VSR tipos A y B
21	AN	F	12	N-B	VSR	VSR tipo B
22	AN	M	24	N-B	VSR	VSR tipos A y B
23	N/E	F	5	B	VSR	VSR tipo B
24	N/E	M	5	N	VSR	VSR tipos A y B
25	AN	F	2	B	VSR	VSR tipos A y B
C1	AN	F	11	B	Negativo	Negativo
C2	AN	M	24	N-B	Negativo	Negativo
C3	HN	M	27	SBA	Negativo	Negativo
C4	AT	F	6	N-B	Negativo	Negativo
C5	AT	M	6	N/E	Negativo	Negativo

Abreviaturas = HN: Hisopado nasofaríngeo; AN: Aspirado nasofaríngeo; AT: Aspirado traqueal; N/E: No especificado; N: Neumonía; N-B: Neumonía-bronconeumonía; B: Bronquiolitis; SBA: Síndrome bronquiolítico agudizado; C: Controles (muestras negativas por IFI); IF: Inmunofluorescencia; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

van más tenues. Los resultados obtenidos permiten sugerir el uso del sulfato de magnesio en lugar del cloruro de magnesio, ya que el sulfato dio como resultado una mejor visualización de los productos, lo que condujo a mejorar la sensibilidad de la técnica. No obstante, es importante ser cuidadosos en la concentración específica de sulfato a usar, pues en algunos casos también se visualizan bandas no específicas. Lo anterior hizo necesario encontrar por titulación una concentración óptima de este compuesto, de manera que las bandas especí-

ficas sean claramente definidas minimizando al máximo el ruido de fondo.

Por otro lado, al comparar los resultados del RT-PCR con los de la IF, se observa que la RT-PCR anidada presenta una correlación del 100% en relación con los resultados de detección del VSR, mediante IF. Además, la misma prueba permitió la tipificación viral lográndose determinar que, entre los meses de julio de 2005 y enero de 2006, hubo una circulación paralela de los dos tipos VSR A y VSR B en la ciudad de Bogotá, Colombia, e incluso la presentación de infecciones

mixtas (28% de casos). Estos datos preliminares corroboran lo reportado en la literatura acerca del patrón de circulación del VSR en países del hemisferio norte y sur.^{14,15}

Con base en los resultados de este estudio piloto, se sugiere la aplicación de la técnica de RT-PCR descrita, usando un mayor número de muestras que incluyan las correspondientes a una población mayor de pacientes y una población de controles pareada, a fin de determinar si la situación observada en éste y otros estudios^{12,7,16} es o no similar.

En relación con los datos demográficos y clínicos de los pacientes, y sin intentar hacer asociación alguna, se observó que los más afectados fueron los niños ≤ a 6 meses, y que los diagnósticos clínicos con mayor frecuencia asociados a esta infección fueron la bronconeumonía y la bronquiolitis, al igual que lo reportado en la literatura.^{17,2}

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Faltó un grupo control, que no pudo ser incluido porque el estudio se realizó usando muestras provenientes de un proyecto de vigilancia centinela de virus respiratorios, por lo que los pacientes fueron seleccionados con base al diagnóstico clínico específico de IRA. Como consecuencia, no fue posible realizar cálculos de sensibilidad ni especificidad de la prueba, por lo que no se incluyó como parte de los objetivos.

Los resultados de este estudio preliminar, hacen evidente la necesidad de realizar otros que incluyan un mayor número de muestras y por períodos más prolongados de tiempo, preferiblemente ciegos, con el fin de tener un mejor acercamiento al conocimiento del posible patrón de circulación de los tipos del VSR, así como buscar correlaciones entre el diagnóstico clínico y/o síntomas y la infección por los diferentes tipos de VSR descritos, con el fin último de profundizar los conocimientos de manera que los datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio obtenidos permitan la prevención y/o control más eficaces de este agente a mediano plazo.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se empleó la técnica de RT-PCR para la detección y tipificación del VSR

en muestras respiratorias provenientes de pacientes con sintomatología compatible con IRA. Los resultados indican que, bajo las condiciones de reacción descritas, se logra una eficaz y rápida detección y caracterización de ambos tipos, VSR tipo A y VSR tipo B.

El protocolo establecido podría ser aplicado en estudios epidemiológicos de mayor escala, que busquen establecer el patrón de circulación los tipos A y B, así como su clínica asociada y las características demográficas que podrían hacer susceptible a nuestra población.

Agradecimientos

A los participantes del proyecto: Vigilancia Centinela de Virus Respiratorios- año 2005-2006, y miembros del Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Bioinformática. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias Bogotá, Colombia.

A los miembros de la División de Virología, Laboratorio de Salud Pública, Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, Colombia y al Fondo de Investigaciones de la Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia.

97

REFERENCIAS

1. Secretaría Distrital de Salud de Bogotá. Boletín ERA No. 21. Consultado: 02-VI-2005. Secretaría Distrital de Salud. Disponible en: [http://www.saludcapital.gov.co/secsalud/boletines_epidemiologicos/ERA/ERA%20\(PDF\)/BOLETIN%20ERA%20No%2021.pdf](http://www.saludcapital.gov.co/secsalud/boletines_epidemiologicos/ERA/ERA%20(PDF)/BOLETIN%20ERA%20No%2021.pdf)
2. Nokso-Koivisto J, Hovi T, Pitkäranta A. *Viral upper respiratory tract infections in young children with emphasis on acute otitis media*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2006;70:1333-1342.
3. Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, et ál. *Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses*. J Virol Methods 2005; 126:53-63.
4. Sarmiento L, Chacón D, Valdivia A, Savón C, Goyenechea A. *Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación del virus sincitial respiratorio*. Rev Cubana Med Trop 1997;49:21-23.
5. Syrmis MW, Whiley DM, Thomas M, et ál. *A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples*. J Mol Diagn 2004;6:125-131.
6. Fajardo LF, Borrero I. *Infección respiratoria aguda. Estudio epidemiológico de una cohorte I. Etiología*. Colombia Médica 1994;25:18-23.

7. Falsey AR, Formica MA, Walsh EE. *Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness*. J Clin Microbiol 2002;40:817-820.
8. Wright PF, Cutts FT. *Generic protocol to examine the incidence of lower respiratory infection due to respiratory syncytial virus in children less than five years of age*. World Health Organization 2000. Consultado: 27-II-2007. Organización Mundial de la Salud. Disponible en: http://www.who.int/vaccine_research/documents/en/syncytial_virus.pdf
9. Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. *Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses*. J Clin Microbiol 1998; 36:2990-2995.
10. Archundia SFJ, Alejandre CJE, Cabello GC, Rosete ODP, Manjarrez ZME. *Incorporación de la técnica de RT-PCR para la detección del virus sincitial respiratorio*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2000;13:145-152.
11. Rodrigues JC, da Silva Filho LV, Bush A. *Etiological diagnosis of pneumonia-a critical view*. J Pediatr (Rio J) 2002;78(Suppl 2):129-140.
12. Osiowy C. *Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay*. J Clin Microbiol 1998;36:3149-3154.
13. Fan J, Henrickson KJ. *Rapid diagnosis of human parainfluenza virus type 1 infection by quantitative re-*
- verse transcription-PCR-enzyme hybridization assay. J Clin Microbiol 1996;34:1914-1917.
14. 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.
15. Sato M, Saito R, Sakai T, et ál. *Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons*. J Clin Microbiol 2005;43:36-40.
16. Falsey AR, Formica MA, Treanor JJ, Walsh EE. *Comparison of quantitative reverse transcription-PCR to viral culture assessment of respiratory syncytial virus shedding*. J Clin Microbiol 2003;41:4160-4165.
17. Rowensztein H, Demirdjian G, Rodríguez J. *Carga de enfermedad y costos asociados a las internaciones por infección respiratoria aguda en niños*. Arch Argent Pediatr 2007;105:5-11. Accesible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/aap/v105n1/v105n1a03.pdf>

Correspondencia:

María del Pilar Delgado Perafán.
Universidad de los Andes,
Departamento de Ciencias
Biológicas, Facultad de Ciencias. Carrera
1 N° 18A-10. Edificio J. Laboratorio J
203. Bogotá, Colombia.
Teléfono: 3394999 - 3394949
ext. 3763 ó 3761.
Correo electrónico:
mdelgado@uniandes.edu.co