

*Rev Biomed 1999; 10:7-15.*

## ***Evaluación de un ultramicro-ELISA para la detección de la infección por el virus sincitial respiratorio.***

**Artículo Original**

Johandra Miguez-Lorenzo, Yahisel Tejero-Suárez, Clara Savón-Valdés, José Laferté-Serrano, Rosa Ma. Rodríguez-Calle, Angel Goyenechea-Hernández, Grehete González-Muñoz, Bárbara Hernández-Espinosa.

Departamento de Virología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Ciudad Habana, Cuba.

### **RESUMEN.**

**Objetivo.** El presente trabajo tuvo como objetivo la evaluación de un ensayo de ultramicroELISA (UME) de doble anticuerpo para la detección rápida de anticuerpos IgG al Virus Sincitial Respiratorio (VSR) en monosueros y muestras de sueros pareados.

**Materiales y métodos.** Se evaluaron 1567 muestras de suero por las técnicas de UME y Fijación de Complemento (FC), de ellas 619 eran monosueros de niños menores de 15 años y 474 pares pertenecientes al Programa Nacional de Vigilancia Seroepidemiológica de las Infecciones Respiratorias Agudas. En el UME de doble anticuerpo se utilizó un anticuerpo monoclonal específico a la proteína F del VSR.

**Resultados.** Para los monosueros el UME con respecto a la FC mostró una sensibilidad de 98.9%, una especificidad de 56.05% y una coincidencia de 63.9%. Para los sueros pares la sen-

sibilidad fue de 92.7%, mientras que la especificidad y la coincidencia aumentaron a un 79.3% y 80.1% respectivamente.

**Conclusiones.** La utilización del anticuerpo monoclonal permitió la inclusión de preparaciones antigénicas crudas en lugar de fracciones purificadas, disminuyendo notablemente la reactividad obtenida con el control de antígeno. Los resultados obtenidos respaldan la utilización de este método como una herramienta complementaria en estudios seroepidemiológicos a gran escala y con fines diagnósticos. (*Rev Biomed 1999; 10:7-15*)

**Palabras clave:** Virus sincitial respiratorio, ultramicroELISA, infecciones respiratorias agudas.

### **SUMMARY.**

**Evaluation of an ultramicroELISA for the detection of infection by the respiratory**

*Solicitud de sobretiros: Johandra Miguez Lorenzo. MSc, Instituto de Medicina tropical "Pedro Kourí", Apartado 601. Marianao 13. Ciudad de la Habana, Cuba. E-mail : johandra@ipk.sld.cu*

*Recibido el 20/Mayo/1998. Aceptado para publicación el 21/Octubre/1998.*

*Este artículo esta disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb991012.html>*

**Vol. 10/No. 1/Enero-Marzo, 1999**

**syncytial virus.**

**Objective.** The present study was aimed at evaluating antibody ultramicroELISA for rapid detection of IgG antibodies to Respiratory Syncytial virus in single and pair sera.

**Materials and methods.** 1567 serum samples were evaluated by both complement fixation (FC) and ultramicroELISA (UME) techniques: 619 single serum samples from children under 15 years and 474 pair serum samples from the national surveillance seroepidemiological program for acute Respiratory Diseases. In the double antibody UME technique, a specific monoclonal antibody against the F protein of RSV was used.

**Results.** When comparing the ultramicroELISA with the FC technique, values obtained for single serum samples were: sensitivity was 98.9 %, specificity 56.05% and agreement 63.9 %. And for the pair serum samples sensitivity was 92.7 %, while specificity and agreement increased in a 79.3 % and a 80.1 % respectively.

**Conclusions.** The use of this monoclonal antibody allowed the inclusion of rough antigen preparation instead of purified fractions, leading to a remarkable decrease in the reactivity obtained with antigen control. These results back up the use of this method as a complementary tool in seroepidemiological studies carried out on a large scale and for diagnostic purposes.

*(Rev Biomed 1999; 10:7-15)*

**Key words:** Respiratory syncytial virus, ultramicroELISA, acute respiratory diseases.

**INTRODUCCIÓN.**

Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) que afectan a la población infantil son frecuentemente de etiología viral. Dentro de los agentes virales responsables de estas infecciones se encuentra el Virus Sincitial Respiratorio (VSR), patógeno principal del tracto respiratorio bajo en lactantes y niños pequeños causando

una variedad de manifestaciones clínicas y hospitalizaciones frecuentes. Estudios previos han revelado que más del 50% de estos niños presentan problemas pulmonares meses o años más tardes (1). Este virus es además responsable de infecciones nosocomiales y cada vez es más necesario tener presente su capacidad para producir infecciones oportunistas en adultos inmunocomprometidos (2). Para el diagnóstico de esta entidad clínica se han utilizado técnicas como el aislamiento viral en cultivos celulares a partir de exudados y lavados nasofaríngeos, así como métodos serológicos que detectan un aumento significativo en el título de anticuerpos.

En nuestro país se realiza la vigilancia seroepidemiológica de las IRA mediante la técnica de Fijación de Complemento (FC), que es de baja sensibilidad y con la cual se reporta una baja prevalencia de anticuerpos fijadores de complemento al VSR (3), así como una lenta aparición de los mismos (4). Esto unido al consumo de tiempo, laboriosidad y subjetividad del método, además de las variables que pueden afectar su sensibilidad y confiabilidad justifican la búsqueda e introducción de métodos novedosos que faciliten un diagnóstico rápido de este agente.

La aplicación de la tecnología SUMA al diagnóstico de las enfermedades infecciosas, ha permitido incorporar los UME fluorescentes al diagnóstico virológico, los cuales han mostrado numerosas ventajas prácticas entre las que cuentan la alta sensibilidad, el bajo costo de las determinaciones, reducción del tiempo total del ensayo, obtención de los resultados cualitativo y cuantitativos de acuerdo con un programa de cálculo preestablecido (5-8).

En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos durante la validación de un UME para la detección de anticuerpos IgG al VSR en monoseros y muestras pareadas. El método fue comparado con la técnica de FC durante un período de un año y los resultados obtenidos nos permiten recomendar la aplicación

### *Ultramicro-ELISA para virus sincitial respiratorio.*

del nuevo método en la vigilancia de esta enfermedad y así contar con un sistema automatizado útil para procesar un gran número de muestras en corto tiempo.

#### **MATERIALES Y MÉTODOS.**

**Muestras.** Se evaluaron un total de 1567 muestras de sueros que fueron divididas en dos grupos:

Grupo I: 619 monosueros de niños menores de 15 años, que acudieron a consulta externa del hospital Pediátrico Docente de Centro Habana con enfermedades somáticas no respiratorias, con estudios clínicos indicados por otras patologías. Estas representaron el 51.5% de las muestras enviadas al laboratorio para la vigilancia de las IRA durante un período de un año.

Grupo II: 474 pares de sueros tomados del programa nacional de vigilancia seroepidemiológica de las IRA que representan el 47.15% del total de muestras enviadas al laboratorio y pertenecían a sujetos sospechosos de presentar infección por VRS. El tiempo de observación del estudio fue el mismo que para el grupo anterior.

**Antígeno.** Para la obtención del antígeno empleado en el UME, se utilizaron células VERO, (American Type Culture Collection) infectadas con la cepa Long del VSR con 10 pases. Al presentar efecto citopático de más del 80%, las células fueron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , descongeladas a temperatura ambiente (TA) y centrifugadas a 3500 r.p.m. a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. El precipitado fue desechado y el sobrenadante fue concentrado 50 veces utilizando el sistema Amicon, USA, con vaso de 300 mL (presión positiva) y membrana XM - 300 con un tamaño de poro para moléculas con peso molecular mayor de 300,000 daltons. La misma metodología se siguió para la preparación del control celular (CC). A ambos productos obtenidos se le estimó el contenido de proteínas mediante el método del Lowry (9), resultando 6.08 mg/mL para el antígeno y 2.4 mg/mL para el

control celular. Ambos se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

**Anticuerpo monoclonal.** Se utilizó un anticuerpo monoclonal específico a la proteína F del VSR, el cual fue gentilmente donado por Dr J. Gavilondo del centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Ciudad de la Habana.

**Técnicas de referencia.** Fijación de Complemento: Se realizó según la metodología descrita por Palmer y Whales, 1986 (10). Inmunofluorescencia Indirecta: Se realizó según la metodología reportada por Gardner y Mc Quillin en 1968 (11).

**UltramicroELISA de doble anticuerpo.** El ensayo se realizó según la metodología descrita por Savón y colaboradores (12), que utiliza como fase sólida una placa de Cloruro de Polivinilo (PVC) SUMA, CIE, Ciudad de la Habana, de 96 pocillos recubierta con el anticuerpo monoclonal anti proteína F del VSR (Cepa Long), a una concentración final de  $10\ \mu\text{g/mL}$ . El antígeno y control fueron añadidos a una concentración final de  $1\ \text{mg/mL}$  en tampón TRIS 15 mM conteniendo Tween 20 al 0.05% y suero de carnero al 5% (BD), y se incubaron durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Los sueros de referencia y las muestras fueron añadidos a una dilución de 1:40 en BD. El conjugado utilizado fue antiIgG humana/ fosfatasa alcalina a una dilución 1:1000 en el mismo buffer que las muestras, e incubado 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Como sustrato fluorogénico fue utilizado el 4- metilumbeliferil fosfato.

Los componentes en exceso se eliminaron en lavados sucesivos entre cada paso con buffer TRIS-Tween 15 mM, pH 7.8. Los resultados fueron expresados en porcentos de fluorescencia con relación al valor de corte del ensayo (0.3) y el título de anticuerpos a punto final de cada uno de los sueros al VSR fue calculado por referencia a una curva patrón. A través de esta curva los porcentos de fluorescencia son convertidos a título a punto final, utilizando una dilución única de los sueros (12).

**Análisis estadístico.** Los porcentos de

sensibilidad, especificidad y coincidencia con la técnica de referencia fueron calculados según Griner y colaboradores, 1981 (13). Para la comparación de los títulos de anticuerpos entre las técnicas, se realizó una prueba de correlación con transformación logarítmica de los datos y una correlación por rangos de Spearman. Se incluyó además un análisis de distribución de frecuencias para el procesamiento de los datos.

## RESULTADOS.

### Comparación de la reactividad del UME y la FC' utilizando 619 monosueros de niños menores de 15 años (Grupo I).

El cuadro 1 muestra los resultados obtenidos de la evaluación de los sueros correspondientes al Grupo I por las técnicas de FC' y UME. Mediante esta última el 79.3% de las muestras presentaron títulos de anticuerpos mayores o iguales que 1:40 y el título promedio geométrico (TPG) de las mismas fue de 93.07. En contraste sólo el 44.2% resultó reactivo por la técnica de FC, siendo el TPG de 7.62. Los resultados obtenidos por ambos métodos no mostraron correlación ( $r_s = 0.07$ ,  $p > 0.001$ ), a pesar de haberse realizado transformación logarítmica de los datos ( $r = 0.03$ ,  $p > 0.001$ ).

**Cuadro 1**

#### Comparación de la FC y el UME utilizando 619 monosueros de niños menores de 1 año.

	FC	UME
Número evaluado	619	619
Número de positivos	274	491
Porcentaje de positivos	44.2	79.3
TPG	7.62	93.07

FC=Fijación de complemento

UME=Ultramicro-ELISA.

TGP=Título promedio geométrico

Los títulos de anticuerpos por UME re-

sultaron muy superiores a los detectados por la FC, presentando un comportamiento ascendente con relación a la edad (cuadro 2).

Se obtuvieron en total 223 muestras con resultados discordantes, 220 de ellas fueron negativas por FC y reactivas por UME, mientras que las 3 restantes fueron reactivas por FC y negativas por UME. De estas 3 últimas, 2 muestras también resultaron reactivas cuando fueron evaluadas por la técnica de IFI, la cual fue utilizada como técnica alternativa.

El UME con respecto a la FC, presentó un 98.9% de sensibilidad, un 63.9% de coincidencia y un 56.05% de especificidad.

**Cuadro 2**

#### Título promedio geométrico por rangos de edades en el total de monosueros evaluados (Grupo I).

EDAD	Título Promedio Geométrico	
	FC	UME
< 1 año	6.95	36.83
1-4 años	8.15	78.89
5-14 años	7.51	117.787

De los 220 sueros discordante que resultaron negativos por FC y reactivos por UME, 100 de ellos fueron confirmados por IFI. Como resultado de esta evaluación utilizando la técnica alternativa se obtuvo que el 96% de los sueros analizados (96 sueros), fueron reactivos para la presencia de anticuerpos al VSR.

### Comparación de la FC y el UME utilizando 474 sueros pareados correspondientes al Grupo II.

En la evaluación de los sueros correspondientes al grupo II por las técnicas de UME y FC, se detectó incremento de 4 veces o más en el título de anticuerpos IgG entre el primero y el segundo suero en 117 pares (24.6%) por UME y en 27 pares (5.6%) por FC. El UME con respecto a la FC presentó un 92.7% de sensibilidad,

*Ultramicro-ELISA para virus sincitial respiratorio.*

79.3% de especificidad y un 80.1% de coincidencia.

Se obtuvieron un total de 94 pares de suero con resultados discordantes, 92 resultaron reactivos en UME y negativos en la FC y 2 fueron reactivos en la FC y negativo por UME. Estos últimos resultaron negativos cuando fueron evaluados en la técnica de IFI.

Los títulos de anticuerpos detectados por ambos métodos en el total de pares de sueros analizados, al igual que para los monosueros, no mostraron una buena correlación ( $r_s = 0.15$ ,  $p > 0.001$ ), siendo los estimados por la curva patrón del UME muy superiores a los detectados por la FC.

**Evaluación del efecto del Control Celular (CC) sobre la detección de anticuerpos al VSR en el UME.**

Con la finalidad de evaluar la funcionalidad del CC como sustrato antigénico de la placa de UME, se realizó un análisis de distribución de frecuencias de las respuestas observadas en un grupo de 120 monosueros seleccionados (negativos y positivos próximos al valor de corte), sin considerar su reactividad con CC. Al comparar los resultados con aquellos en que se tuvo en cuenta la reactividad con el CC se observó que con un ligero ajuste en el valor de seropositividad de la prueba (0.39) se podía obtener el mismo valor de reactividad en ambas distribuciones (22%).

Teniendo en cuenta estos resultados se analizó que efecto tenía no considerar la reactividad de los pares de suero frente al CC. Con este fin se evaluaron un total de 321 pares de sueros donde se incluían todas las seroconversiones detectadas en el UME anteriormente descrito. En general se observó que cuando no se considera la reactividad con el CC, la diferencia mínima entre una pareja de sueros que presentaban seroconversión se reduce a un valor de 2 y este valor sólo incluía 14 pares (4.3%) de las que no presentaban seroconversión (cuadro 3).

**Cuadro 3**  
**Evaluación del efecto del Control Celular (CC) en la detección de la infección reciente por VSR utilizando el UME.**

	UME S/CC (Criterio >2)	
	Positivo	Negativo
<b>Positivo</b>	37	0
UME C/CC (Criterio >4)		
<b>Negativo</b>	14	270

Sensibilidad: 100%

Especificidad: 95%

Coincidencia: 95.6%

VSR=Virus sincitial respiratorio

UME=Ultramicro-ELISA

**DISCUSIÓN.**

En el presente trabajo se realizó un estudio a doble ciegas entre la técnica de FC y el UME. Se procesaron un total de 1567 muestras de suero, las cuales representaron el 47.15% de los sueros pareados y el 51.5% de los monosueros enviados al laboratorio durante un período de 1 año para dicha vigilancia.

En la comparación realizada de los resultados obtenidos en el Grupo I por ambas técnicas se observó que el UME con respecto a la FC presentó un 98.9 % de sensibilidad, un 56.05% de especificidad y 63.9% de coincidencia. Los bajos valores obtenidos en los dos últimos parámetros, se deben al alto número de resultados incongruentes encontrados en el estudio (223 monosueros). La causa fundamental de tal incongruencia se debe a la gran diferencia existente entre el método utilizado como patrón de oro (FC) y el método a evaluar (UME). Muchos autores en estudios similares han reportado que los métodos inmunoenzimáticos presentan una mayor sensibilidad cuando se comparan con técnicas de ejecución engorrosa e interpretación subjetiva de los resultados como es el caso

de la FC (4,8,14-16). Teniendo en cuenta lo anterior y considerando tanto el incremento en la sensibilidad que aporta la incorporación de un sustrato fluorescente (17-19), como el empleo en el UME de un anticuerpo monoclonal específico a la proteína F del VSR, era esperado obtener una mayor positividad de las muestras utilizando este método. En nuestro caso no fue posible la utilización de otra técnica como patrón de oro debido a que la FC es la técnica utilizada en nuestro laboratorio para la vigilancia seroepidemiológica de las IRA.

Otra de las posibles causas de los resultados incongruentes entre los métodos pudiera ser la utilización de preparaciones antigénicas diferentes. Esto al igual que para otros agentes infecciosos podría propiciar la detección de poblaciones de anticuerpos diferentes (20).

En nuestro estudio se utilizó la técnica de IFI como técnica alternativa para confirmar algunos resultados que no coincidieron por ambos métodos, ya que la misma ha sido recomendada por otros autores como técnica de referencia (15,21,22). De las tres muestras de suero que resultaron negativas en el UME y positivas en FC, sólo una resultó realmente positiva cuando fue evaluada nuevamente por la técnica de IFI. De la misma forma se realizó la confirmación del 45.5% de los sueros (100 sueros) que resultaron positivos por UME y negativos por FC, obteniéndose que el 96% de los mismos (96 sueros) también resultaron positivos por IFI, lo que demuestra que eran falsos negativos de la FC.

Edward y colaboradores (23) reportaron una disminución de la especificidad del ELISA (IgG e IgM) respecto al tiempo de almacenamiento o conservación de los sueros a  $-20^{\circ}\text{C}$ , incluyendo sueros de un mes de conservación. Esto se hizo más marcado para sueros con más tiempo de almacenados. A pesar de utilizar procedimientos como la sustracción de la reactividad con el CC o aumento de la concentración de antígeno, la especificidad de la prueba sólo pudo ser restablecida con el tratamiento de los sueros

con Kaolin. En nuestro caso a pesar del tratamiento de los sueros y sustraer la reactividad frente al CC no se logró mejorar la correlación entre ambos métodos (UME y FC). Esto demuestra que la calidad de la muestra y el tiempo de almacenamiento son aspectos muy importantes a tener en cuenta cuando se pretende introducir ensayos de este tipo.

Con respecto a los sueros correspondientes al grupo II, pensamos que este inconveniente de las muestras no interfiera en los resultados, debido a que el criterio de seropositividad se basa en un incremento de 4 veces o más en el título de anticuerpos entre el primero y el segundo suero y no en la reactividad con respecto a un valor de corte.

Los TPG en el UME resultaron ser mayores que los observados en la FC y se comportaron de forma ascendente con relación a la edad (cuadro 2). Estos resultados reflejan que a medida que se incrementa la edad aumenta la probabilidad de exposición al VSR. En niños menores de 1 año la mayor parte de los anticuerpos detectados son fundamentalmente producto del paso a través de la barrera transplacentaria (3). Sin embargo en los resultados obtenidos por FC este aumento en los títulos de anticuerpos no pudo ser detectado. Los mismos se mantuvieron constantes y bajos, lo que puede deberse a que los anticuerpos fijadores del complemento tienden a disminuir con el tiempo (24). Este comportamiento en los títulos de anticuerpos IgG obtenidos en nuestro laboratorio coincide con los obtenidos por Meurman y colaboradores (4), donde se observó que los títulos de anticuerpos fijadores del complemento se mantuvieron generalmente bajos y que la magnitud de la respuesta de IgG fue dependiente de la edad de los pacientes.

Considerando que el diagnóstico serológico del VSR realizados por las técnicas de FC e IFI se basa en el criterio de seroconversión o aumento de 4 veces o más del título de anticuerpos entre el primero y el segundo suero, en nues-

*Ultramicro-ELISA para virus sincitial respiratorio.*

tro estudio se extrapoló este criterio para determinar la positividad de las muestras en el UME, siendo también utilizado por Pilaipan y colaboradores en 1995 (16).

A pesar de que para los sueros correspondientes al grupo II los porcentajes de especificidad (79.3%) y coincidencia (80.1%) resultaron ser superiores a los obtenidos por los monosueros, también se observaron diferencias en la detección de anticuerpos entre las técnicas. En este caso el mayor número de resultados positivos detectados por el UME se debe fundamentalmente a la mayor sensibilidad del UME, específicamente en lo referente a la estimación del título a punto final de cada suero mediante la curva patrón, con lo cual se logra detectar la separación real entre los títulos de anticuerpos de un par de sueros (5).

Los pares de sueros negativos en el UME y positivo en FC, resultaron negativos cuando fueron evaluados en la técnica de IFI, obteniéndose al igual que para los monosueros un mejor ajuste entre IFI y el UME.

Los datos mostrados en el presente trabajo concuerdan con los obtenidos por otros autores (4,14,25), los cuales encontraron resultados discordantes entre ambos métodos, siendo mayor el número de pares de sueros con incremento significativo por ELISA que por FC.

A pesar de las ventajas del uso del CC en los ensayos que emplean como antígenos extractos crudos (fundamentalmente la relacionada con el incremento de la especificidad)(5,26-30), su inclusión en estas pruebas incrementa el costo de producción del antígeno y de la prueba en general, dificulta la ejecución práctica y afecta el número de muestras que pueden ser procesadas por duplicado.

La inclusión de un anticuerpo monoclonal anti-proteína F del VSR aporta ventajas prácticas al sistema de UME, obteniéndose una baja reactividad de los sueros con el CC (12). En nuestro estudio se observó una reactividad homogénea para el total de sueros evaluados fren-

te a este control, por lo se consideró la factibilidad de realizar el UME sin incluir la reactividad de las muestras con el CC. En este sentido se evaluaron un total de 441 muestras de suero: 120 monosueros cercanos al valor de corte y 321 pares que incluyeron todas las seroconversiones detectadas en el UME con CC (cuadro 3). Se observó que con un ligero ajuste en el valor de corte de la prueba (de 0.300 a 0.390) se podía obtener el mismo valor de positividad para el grupo de los monosueros (22.0%), sin que se afectará la distribución de las respuestas.

Teniendo en cuenta estos resultados, se esperaba que para los pares de sueros ocurriera una disminución en la separación de los títulos de anticuerpos del primero y el segundo suero. Considerando el incremento de 2 ó más en el título de anticuerpos, se pudieron detectar todos los pares de sueros con incremento significativo en el título de anticuerpos al VSR, sin embargo se incluyeron 14 pares de sueros que no habían sido previamente detectados (cuadro 3). Estos resultados pueden resolverse siguiendo la misma metodología que se utiliza para confirmar los pares que resultan inicialmente positivos en el UME, pero en este caso la reevaluación se realizaría incluyendo el CC.

Considerando que en la práctica el UME se utiliza como método de pesquisa inicial y sus resultados se complementan con los obtenidos por otros métodos de diagnóstico virológico, se podría establecer la evaluación inicial de las muestras de sueros (monos y pares) sin CC.

En caso de detectarse un incremento significativo entre los títulos de anticuerpos de los sueros de un par (mayor o igual que 2), se deberá entonces confirmar el resultado incluyendo el CC.

En nuestro trabajo se procesaron un total de 1565 muestras de suero para las cuales se necesitó un total de 9 mL de CC, sin embargo utilizando este reactivo biológico para confirmar se necesitan solo 3 mL del mismo para obtener

*J Miguez-Lorenzo, Y Tejero-Suárez, C Savón-Valdés y col.*

iguales resultados. Este procedimiento contribuiría a aumentar la especificidad del primer ensayo, posibilitando la confirmación sólo de aquellos pares con incremento significativo en el título de anticuerpos, contribuyendo además a disminuir el costo de producción del antígeno y de la prueba además de mejorar los aspectos prácticos relacionados con su ejecución.

La aplicación de esta nueva tecnología además de significar un ahorro de reactivos y tiempo, permite mejorar la calidad del diagnóstico de esta entidad en la red de Microbiología del MINSAP.

**AGRADECIMIENTOS.**

Al Dr. J Gavilondo del CIGB por haber donado el anticuerpo monoclonal para la realización de nuestro trabajo y al Dr. A Otero por su estimable ayuda.

**REFERENCIAS.**

- 1.- Goldman DA. Nosocomial viral infections: recent developments and new strategies. *Europ J Microbiol Infect Dis* 1989; 8:75-81.
- 2.- Englund JA, Sullivan CJ, Jordan MC, Dehner LP, Vercelotti GM, Balfour HH. Respiratory Syncytial virus infections in immunocompromised adults. *Ann Intern Med* 1988; 109:203-8.
- 3.- Parrot RH, Kim HW, Brant CD, Beem MO, Richardson L, Gerin JL, Chanock RM. Respiratory syncytial virus. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, 5ta ed, Washington D C: American Public Assoc Inc.; 1979. p. 695-708.
- 4.- Meurman O, Russkanen O, Sarkkinen H, Hanninen P, Halonen P. Immunoglobulin class-specific antibody response in respiratory syncytial virus infection measured by enzyme immunoassay. *J Med Virol* 1984; 14: 67-72.
- 5.- Jomarrón L, Otero A, Alvarez M, Marrero M, Laferté J, Roges G. Design of standard curve for the measurement of IgG antibodies against human cytomegalovirus in a single serum dilution by ultramicro-ELISA. *Biotec Aplic* 1993; 10:200-3.
- 6.- Laferté J, Savón C, Goyenechea A, Vázquez S, Otero A, Tejero Y, et al. Estimación del título de anticuerpos

IgG a adenovirus utilizando una curva patrón y un ensayo de ultramicroELISA indirecto. *Rev Cub Med Trop* 1996; 48:102-8.

7.- Ribas M A, Otero A, Alvarez M, Marrero M, Vázquez S. Diseño de una curva patrón para la detección de inmunoglobulina G humana contra herpes simple a partir de una dilución única del suero. *Rev Cub Med Trop* 1994; 46:32-6.

8.- Rivas M, Laferté J, Alberti A, Rosario D, González G. Algunas aplicaciones del Sistema Ultramicroanalítico al diagnóstico de las enfermedades infecciosas. *Rev Cub Med Trop* 1992; 44:226-7.

9.- Lowry OR, Rosebrowgh N J, Randall R J. Protein measurement with the Folin- phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.

10.- Palmer DF, Whales C. Complement Fixation Test. En: Rose NR, Friedman H, Fahey JL eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. New York: Am Soc Microbiol; 1986. p. 57-66.

11.- Gardner PS, McQuillin J. Application of immunofluorescent antibody technique in rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *Br Med J* 1968; 3:340-3.

12.- Savón C, Laferté J, Goyenechea A, Valdivia A, Morier L, Tejero Y. Normalización de un ensayo ultramicroELISA para la detección de anticuerpos IgG al Virus Sincitial Respiratorio. *Rev Cub Med Trop* 1996; 48 (en prensa).

13.- Griner PF, Mayewski R J, Musilin A I, Green Land P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. *Principles and Applications*. *Ann Intern Med* 1981; 94:553-600.

14.- Meddens JMM, Herbrink P, Lindeman J, Willemien C, Dijk V. Serodiagnosis of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection in Children as Measured by detection of RSV-Specific Inmunoglobulins G, M, and A with Enzyme-Linked Inmunosorbent Assay. *J Clin Microbiol*, 1990; 28:152-5.

15.- Grandien M, Petterson CA, Gadner PS, Linde A, Stanton A. Rapid viral diagnosis of acute respiratory assay and the immunofluorescence technique for detection of viral antigens in nasopharyngeal secretion. *J Clin Microbiol* 1985; 22:757-60.

16.- Pilaipon P, Supreeda H, Rachaneeporn T, Chantapog



---

*Ultramicro-ELISA para virus sincitial respiratorio.*

- W. Serological response to respiratory Syncytial virus infection in pediatric patients with a comparison to immunofluorescence and isolation. *J Allerg Immunol* 1995; 13:37-41.
- 17.- Ali A, Ali R. Enzyme-linked immunosorbent assay for anti-DNA antibodies using fluorogenic and colorigenic substrates. *J Immunol Methods* 1983; 56:341-46.
- 18.- Hildreth SW, Beaty BJ, Meegan JM, Frazier CL, Shope RE. Detection of La Crosse arbovirus antigen in mosquito pools: application of chromogenic and fluorogenic enzyme immunoassay systems. *J Clin Microbiol* 1982; 15:879-84.
- 19.- Yolken RH, Stopa PJ. Enzyme-linked fluorescence assay: ultrasensitive solid-phase assay for detection of human rotavirus. *J Clin Microbiol* 1979; 10:317-21.
- 20.- Van Enk RA, James KK, Thompson KD. Evaluation of three commercial enzyme immunoassays for *Toxoplasma* and Cytomegalovirus Antibodies. *J Clin Pathol* 1991; 95:428-34.
- 21.- Hornst A, Fries B, Kraslinikof PA. Detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretion by biotin-avidin ELISA more sensitive than the fluorescent antibody techniques. *J Med Virol* 1986; 18:113-7.
- 22.- World Health Organization. Rapid laboratory techniques for the diagnosis of viral infections. Report of WHO scientific group. WHO Tech Rep Ser; 1981. p. 661.
- 23.- Edward J, Shillito E. Decline in specificity of the ELISA due to storage of serum, and its recovery by adsorption with kaolin. *J Virol Methods* 1982; 4:241-8.
- 24.- Katz S, Jordan WS, Badger J, Dingle J. Studies of complement-fixing and neutralizing antibodies against certain adenovirus. *J Immunol* 1957; 78:118-21.
- 25.- Richardson LA, Yolken RH, Belshe RB, Camango E, Kim HW, Chamock RM. Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of serological response to Respiratory Syncytial virus infection. *Infect Immunity* 1978; 20:660-4.
- 26.- Boteler WL. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of measles antibody. *J Clin Microbiol* 1983; 17:814-8.
- 27.- Laferté J, Marrero M, Alvarez M, Jomarrón L, García S, Vasquez S, et al. UltramicroELISA indirecto para la detección de anticuerpos totales al Citomegalovirus en suero humano. *Rev do Inst Med Trop Sao Paulo* 1992; 34:43-7.
- 28.- Rice G P, Casali P, Oldestone M B. A new solid phase enzyme linked immunosorbent assay for specific antibodies for measles virus. *J Infect Dis* 1983; 147:1055-9.
- 29.- Soler M, Rosario D, Laferté J, Guzmán G. Estandarización de un sistema de ultramicroELISA indirecto para la detección de anticuerpos totales al virus del Sarampión. *Rev Cub Med Trop* 1992; 44:192-6.
- 30.- Weigle K A, Murphy M P, Brunell P A. Enzyme linked immunosorbent assay for evaluation of immunity measles virus. *J Clin Microbiol* 1984; 19:376-9.