

## Caracterización de las glicoproteínas de una cepa de virus respiratorio sincicial aislada en Cali<sup>1</sup>

Beatriz Parra, M.Sc.<sup>2</sup>, Isabella Borrero, M.Sc.<sup>3</sup>, Felipe García, Ph.D.<sup>4</sup>

### RESUMEN

Se empleó un aislado de virus respiratorio sincicial de un niño de dos meses de edad que presentó el primer episodio de infección aguda en un estudio longitudinal efectuado en Cali (1986-1990), para caracterizar molecular y antigénicamente las glicoproteínas virales que son importantes en los mecanismos de inmunopatogénesis en la infección respiratoria aguda generada por este tipo de virus. La caracterización electroforética de proteínas radiomarcadas in vitro con [<sup>3</sup>H]-Glucosamina permitió evidenciar las bandas de 98, 70, 30 kd como glicoproteínas que hacen parte de la envoltura del virus. La gp 70 es importante en la inmunopatogénesis porque aparece como efecto de protección de tipo IgG transmitida pasivamente por la madre. Se pudieron localizar dos sitios para la proteasa V8 en la gp70 aislada de ambas cepas. La F1 es una de las subunidades comprometidas en la generación de una respuesta inmune de tipo neutralizante determinada en sueros de la fase aguda y en hiperinmunes de conejo. Se demostró la similitud antigénica y estructural de la cepa Cali-0015 con la cepa de referencia Long.

Palabras claves: Virus sincicial. Glicoproteínas virales. Infecciones respiratorias.

El virus respiratorio sincicial (VRS), miembro del género **Neumovirus**, familia Paramyxoviridae, es la causa más importante de neumonías y bronquiolitis de origen viral en niños menores de 2 años. De esta forma produce reinfecciones comunes en presencia de anticuerpos neutralizantes transferidos pasivamente<sup>1</sup>.

Los mecanismos de patogénesis e inmunidad a la infección por VRS aún no son claros. Es posible que ciertas reacciones inmunopatológicas de tipo IgE específicas puedan potencializar el daño causado por la replicación del virus en el tracto respiratorio de infantes. Esto ha impedido que se pueda desarrollar una vacuna eficaz a pesar de la existencia de un solo serotipo viral<sup>2,3</sup>.

Un estudio longitudinal de infec-

ción respiratoria aguda efectuado en Cali desde 1986 hasta 1990, mostró que el VRS es el principal agente viral causante de la infección respiratoria aguda (IRA) en niños menores de un año (63% de los virus aislados)<sup>4,5</sup>. Estudios posteriores con respecto a la epidemiología del virus han demostrado su importancia como agente etiológico del cuadro clínico<sup>6</sup>.

Aunque se han realizado numerosos estudios para caracterizar estructural y funcionalmente los polipéptidos del virión, su identificación todavía no es completa. En general se describen en la literatura de 7 a 10 polipéptidos cuyas masas moleculares relativas (Mr) varían entre 10 a 200 kd<sup>7-9</sup>. Las glicoproteínas G y F participarían en la inmunoprotección durante el proceso de infección y enfer-

medad.

Los diferentes aislamientos del VRS, en general, se han clasificado en dos grupos si se tienen como criterio de caracterización, su reactividad diferencial contra anticuerpos monoclonales. Los miembros de estos dos grupos difieren en sus propiedades inmunológicas por lo menos en 4 proteínas estructurales, sobre todo en las glicoproteínas de la envoltura<sup>10</sup>.

En este trabajo se analizaron, mediante electroforesis, las glicoproteínas de la envoltura de los viriones del VRS y se valoró su inmunoreactividad en la técnica inmunoblot con sueros tanto monoclonales como policlonales obtenidos de conejos y de pacientes en distintos períodos del proceso de infección. Además se realizaron experimentos de fragmentación peptídica en la proteína de 70 kd de la cepa prototipo Long y de una cepa geográfica aislada de un niño con infección respiratoria en Cali.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Cepas del virus.** La cepa de VRS

1. Trabajo financiado con fondos del proyecto ARI-BOSTID-NSF.USA y la Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad del Valle, Cali.
2. Profesional Especializada, Departamento de Microbiología, Escuela de Medicina, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali.
3. Profesora Titular, Departamento de Microbiología, Escuela de Medicina, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali.
4. Profesor Titular, Departamento de Ciencias Fisiológicas y Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Escuela de Medicina, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali.

prototipo Long (subtipo A) ATCC-VR-26 se obtuvo en la American Type Culture Collection (Rockville, MD); el aislamiento geográfico, IRA 0015, se consiguió de un aspirado nasofaríngeo del primer episodio de IRA en un niño de dos meses de nacido perteneciente a la cohorte de un estudio longitudinal sobre IRA efectuado en Cali (1986-1990)<sup>4</sup>. Ambas cepas se reactivaron mediante 15 pases sucesivos en células Hep-2, tituladas y almacenadas a -70 ° C para su posterior utilización.

**Sueros.** Se emplearon los siguientes tipos de sueros: Suero humano correspondiente a la fase aguda del cuadro clínico de IRA donde se aisló el virus 0015; suero humano del período convaleciente al cuadro clínico de IRA causado por el aislamiento 0015; sueros hiperinmunes de conejo anti-RSV aislado 0015 (cepa Cali) y cepa prototipo Long; y anticuerpos monoclonales específicos de subtipo, Mab 92-11c específico para subgrupo E (proteína F) que fueron cedidos gentilmente por el Dr. L. Anderson del CDC en Atlanta, USA.

**Cultivo de los virus.** Los virus se replicaron por infección de monocapas de células Hep-2 con un inóculo de 100 U TCID<sub>50</sub>/1ml, hasta obtener un efecto citopático de 80% en la monocapa (cuarto día de cultivo). Se utilizó medio mínimo esencial sin suero fetal bovino, suplementado con L-Glutamina (400 mM) y una mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina 100U/100 µg/ml).

**Protocolos de purificación del virus.** Se aplicaron los protocolos descritos inicialmente por Fernie y Gerin<sup>11</sup> y Levine<sup>12</sup> con algunas modificaciones. La purificación de cada uno se inició de los virus obtenidos en el crecimiento de 30 frascos de 40 cm<sup>2</sup> de monocapas de células Hep-2 que presentaban efectos citopáticos

de 80%, las células se removieron mediante el raspado de la monocapa con varillas de vidrio y se resuspendieron en 5 ml de solución amortiguadora (MHN). Después de centrifugación, el sobrenadante se ensayó en pruebas de titulación por TCID<sub>50</sub><sup>13</sup>. La concentración de proteínas en cada ensayo se determinó por el método de Harlow y Lane<sup>14</sup>.

Los viriones se purificaron después de dos ciclos de ultracentrifugación en gradientes isopícnicos de sacarosa con colchones de 60% a 120,000xg 4 horas a 4° C mediante un rotor TH641 (Sorvall-Dupont). Se aisló la banda opalescente observada en la interfase del colchón que luego se ensayó según lo descrito en el párrafo anterior, con el fin de determinar la presencia y concentración de viriones en cada ensayo.

Las proteínas de las dos cepas de VRS estudiadas se separaron mediante electroforesis de proteínas en geles de poli(acrilamida). Algunos experimentos se efectuaron en condiciones reductoras y se adicionó 2-Mercaptoetanol; mientras que en otros casos se usaron condiciones no reductoras, para seguir la técnica de Laemmli<sup>15</sup> modificada por Studier<sup>16</sup>.

Las distintas fracciones de glicoproteínas de las envolturas del virión, se estudiaron por marcación en cultivos celulares infectados en pulsos con [<sup>3</sup>H]-Glucosamina, después de las fracciones obtenidas mediante electroforesis, se sometieron a fluorografía de acuerdo con Harlow y Lane<sup>14</sup>. En todos los casos las bandas de proteínas se visualizaron por tinción con nitrato de plata.

**Inmunoblot.** Las diversas proteínas obtenidas de las preparaciones purificadas en cada una de las cepas estudiadas, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante la metodología descrita por Towbin *et*

*al.*<sup>17</sup>; la transferencia se efectuó al aplicar una diferencia de potencial de 50 V durante 18 horas en un aparato transferidor (Bio-Rad). La determinación de las correspondientes bandas inmunorreactivas se hizo con proteína A radiomarcada con <sup>125</sup>I.

**Fragmentación proteolítica.** La banda de 70 kd de cada una de las cepas estudiadas, se purificó por electroelución a partir de geles de poli(acrilamida)<sup>18</sup>, que se dializaron de acuerdo con lo descrito por Sambrook *et al.*<sup>19</sup> Las bandas purificadas mediante el procedimiento anterior, se sometieron a digestión proteolítica con la proteasa V8 de *Staphylococcus* y la tripsina tipo II (Sigma) directamente en el gel de apilamiento. La reacción se efectuó durante una hora; una vez cumplido este tiempo se inició la corrida del correspondiente gel. Las bandas obtenidas por la digestión con cada una de las proteasas, se visualizaron por tinción con nitrato de plata<sup>14</sup> o mediante fluorografía.

## RESULTADOS

**Caracterización de las glicoproteínas virales.** Los patrones electroforéticos obtenidos de las proteínas extraídas de células infectadas con las cepas de VRS que se emplearon en este trabajo, permitieron el estudio de las glicoproteínas de la envoltura de cada una de ellas. Para este enfoque se efectuaron análisis electroforéticos en condiciones no reductoras y en geles reductores en presencia de 2-Mercaptoetanol.

En condiciones no reductoras se determinó la presencia de dos bandas de glicoproteína marcadas con [<sup>3</sup>H]-Glucosamina cuyas Mr calculadas fueron 95 y 70 kd, respectivamente. Las dos bandas fueron semejantes en las dos cepas de VRS estudiadas (Figura 1A). El patrón electroforético

observado para ambas cepas cuando se emplearon condiciones reductoras, reveló la presencia de cuatro bandas comigrantes cuyas masas moleculares relativas calculadas fueron 95, 70, 43.8 y 25 kd (Figura 1B). En los geles analizados bajo condiciones reductoras fue notable la disminución en la intensidad de la banda de 70 kd. De esta manera, la suma de los pesos moleculares de las dos nuevas glicoproteínas que aparecen en los geles sometidos a condiciones reductoras, es aproximadamente 70 kd. Esto puso en evidencia que la banda de 70 kd es un dímero cuyas subunidades poseen Mr de 43.8 y 25 kd, respectivamente.

**Caracterización de la reactividad antigénica por inmunoblot.** Al emplear la serie de sueros tanto de pacientes en distintas fases de la infección como sueros hiperinmunes obtenidos a partir de conejos, se determinó la reactividad antigénica de las diversas fracciones de proteínas del virión. En el Cuadro 1 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en los distintos experimentos de inmunoblot que se llevaron a cabo a partir de proteínas extraídas de la cepa Long y de la cepa Cali-0015 en los que se emplearon condiciones reductoras y no reductoras. Se determinó que la reactividad de los sueros de pacientes a proteínas virales en fase aguda y convaleciente fue distinta. Además, se definió que algunos epítopes son más reactivos en fase aguda que en la fase convaleciente. Por otro lado, los patrones de inmunoblot obtenidos a partir de sueros hiperinmunes para las dos cepas ensayadas, fueron idénticos en ambas condiciones. Con anticuerpos monoclonales se observó reactividad e identidad inmunogénica sólo con el anticuerpo monoclonal 92-11c que se unió con la banda de 70 kd bajo condiciones no reductoras tanto para

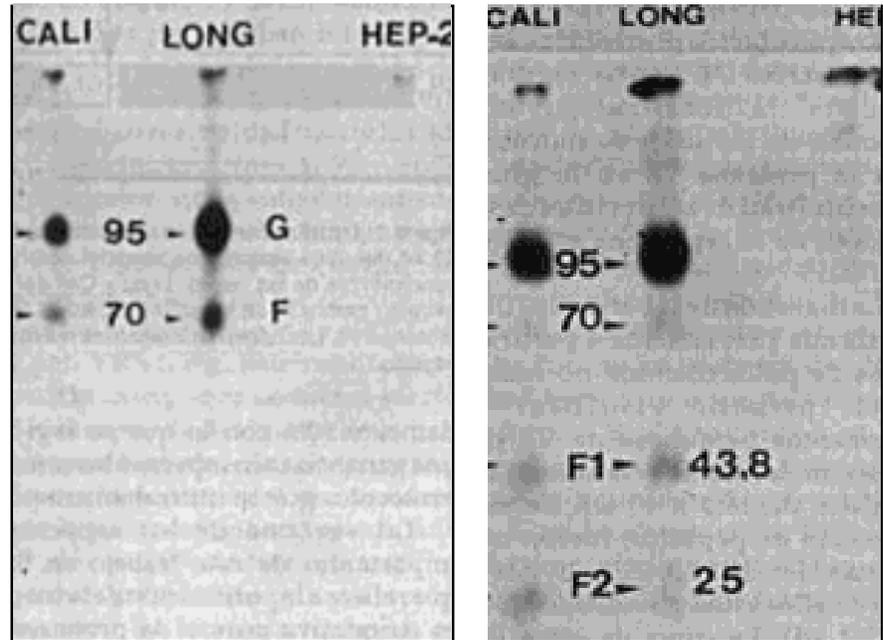


Figura 1. Patrón electroforético de la incorporación de <sup>3</sup>H-Glucosamina en las glicoproteínas de dos cepas del virus respiratorio sincicial. **A.** Patrón obtenido en condiciones no reductoras. **B.** Patrón obtenido por el tratamiento con 2-Mercaptoetanol que promueve condiciones reductoras. CALI: cepa obtenida de un episodio menor de un año con infección aguda producida por el VRS. LONG: cepa prototipo ATCC-VR-26. del VRS. HEP-2: control de células Hep-2 de carcinoma laríngeo humano no infectadas con el VRS. Los números que indican cada una de las bandas proteicas, corresponden a las masas moleculares relativas dadas en kilodaltons (kd).

**Cuadro 1**  
**Inmunorreactividad de las Proteínas de las Cepas Cali y Long del VRS a Diferentes Tipos de Sueros.**

Tipo de suero	Cepas Long		Cepas Cali	
	NR**	Mr (kd)	NR	Mr (kd)
Suero humano fase aguda	39,120,98,70	150,128,70,45	150,98,70,30	150,120,0,4,40,30
Suero humano fase convaleciente	150,98,70,40,30	98,70,45,48,30	15,98,70*,48,30	98,70,45,40,30
Suero hiperinmune de conejo anti-VRS Long	200,150,120,70*,30,40	30	200,150,120,79*,40,30	45,30
Suero hiperinmune de conejo anti-VRS Cali	200,150,120,70*,40,30	30	200,150,120,70*,40,30	70,45,30
Monoclonal 92-11C	70	-	70	-
Monoclonal 102-10B	-	-	-	-

R: condiciones reductoras  
kd: kilodalton

NR: condiciones no reductoras  
Mr: masa molecular relativa

la cepa Long como para la cepa Cali-0015 (Cuadro 1).

**Fragmentación proteolítica de la glicoproteína 70 kd.** La Figura 2 muestra la localización más probable de los sitios de hidrólisis con la proteasa

V8 en la glicoproteína 70 kd de la envoltura de los viriones de la cepa Long y la cepa Cali-0015.

La digestión de la banda de 70 kd purificada previamente a partir de geles de poliacrilamida no reductores, permitió visualizar 11 fragmentos peptídicos de V8 con masas moleculares relativas aproximadas de 16.9 a 40 kd. De esta colección de péptidos, fueron más intensas los de 34.3, 22.2, 20 y 16.9. Dos de ellos están glicosilados (34.2 y 22.2 kd). La suma de estos tres péptidos es equivalente a la masa total de la glicoproteína de 70 kd ( $70 \pm 0.5$ ).

El tratamiento de la misma banda de 70 kd con tripsina, no mostró ningún patrón de fragmentación tanto en los geles teñidos con nitrato de plata como en los sometidos a fluorografía.

## DISCUSIÓN

Desde el aislamiento del VRS como agente causal de cuadros de infección respiratoria aguda, el estudio bioquímico del mismo se ha visto dificultado por los problemas presentes en el aislamiento y purificación de las preparaciones obtenidas por la infección *in vitro*.

Actualmente se informan protocolos en los que la eficiencia de purificación es de 18%<sup>20</sup> y de 33%<sup>11</sup> de la infectividad inicial. Se ha determinado que 90% del virus producido no es liberado de la célula. Este hecho plantea un problema para lograr preparaciones relativamente no contaminadas por proteínas del citoesqueleto celular. En este trabajo las eficiencias obtenidas fueron de aproximadamente 50% con lo que se logró una ganancia con respecto a los otros protocolos que se utilizaban antes.

Tal vez uno de los aspectos importantes de este trabajo en lo que refiere

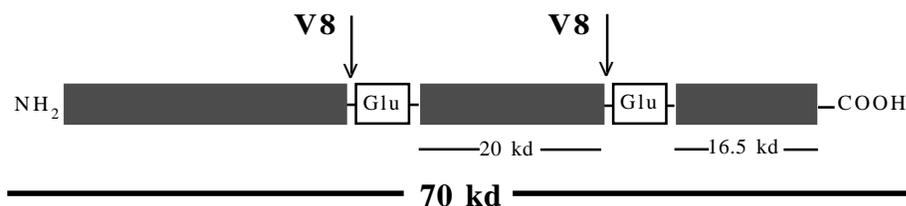


Figura 2. Localización de los sitios de hidrólisis para la proteasa V8 en la glicoproteína de 70 kd del virus respiratorio sincicial obtenidos por el tratamiento de bandas purificadas provenientes de las cepas Long y Cali del VRS. NH<sub>2</sub>, extremo amino de la gp70; COOH, extremo carboxilo de la gp70. Glu, ácido glutámico. Ø, localización del sitio de corte de la proteasa V8. Los números indican las masas moleculares relativas correspondientes a cada péptido.

a la purificación del virus, es su relativa pureza de proteínas celulares sin pérdida de la infectividad. Estos resultados permiten establecer que los procedimientos de purificación para este tipo de virus deben tener en cuenta la obtención de concentraciones de proteínas muy bajas pero con un alto grado de infectividad.

Los hallazgos previos con referencia a la caracterización electroforética de las distintas proteínas del virión son contradictorios. Los estudios realizados en la cepa Long, permitieron caracterizar siete polipéptidos estructurales con Mr que varían entre 10 y 200 kd<sup>12,21,22</sup>. Los cálculos de las masas moleculares relativas efectuados en este trabajo para las distintas bandas en electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no reductoras, coinciden con los previamente obtenidos por Trudel *et al.*<sup>23</sup>

Otra conclusión importante del presente trabajo es que las movilizadas de los polipéptidos obtenidos de la cepa Cali-0015 son similares a las de la cepa Long. En este sentido, los intentos para efectuar una caracterización en serotipos de acuerdo con patrones diferenciales, han mostrado que ese enfoque no es muy resolutivo. Solamente algunas pequeñas variaciones en el tamaño de la glicoproteína de 70 kd, han podido ser resueltas en geles largos; sin embargo, esto es difícil y poco práctico<sup>24</sup>.

Aunque Wranner y Pringle<sup>25</sup> identificaron en virus parcialmente purificados, la presencia de dos bandas de glicoproteína con pesos moleculares de 98 y 42 kd, en este trabajo se observaron tres bandas notorias de 70, 40 y 30 kd; sin embargo, los resultados obtenidos están en concordancia con los de Levine<sup>12</sup> quien identificó tres glicoproteínas principales a partir de viriones parcialmente purificados y marcados con <sup>3</sup>H-Glucosamina (VP1=79 kd; VP2=56 kd; VP3=25 kd). Además, en este trabajo se obtuvieron evidencias de una banda extra de 98 kd, observada en los geles no desnaturizantes analizados<sup>22</sup>.

El estudio electroforético de las glicoproteínas virales efectuado en condiciones reductoras, reveló la presencia de dos nuevos polipéptidos que aparentemente se derivan de la despolimerización de la banda 70 kd. Así se puede decir que la glicoproteína de 70 kd estaría conformada por polipéptidos con Mr de 43.8 y 21 kd unidos mediante puentes disulfuro. Los estudios de Gruber y Levine<sup>26</sup> y Fernie y Gerin<sup>27</sup>, determinaron que la glicoproteína F está compuesta por dos subunidades denominadas F1 (45 kd) y F2 (25 kd). Tales proteínas juegan un papel importante en la fusión de membranas y en la formación de sincicios *in vitro*. Estas dos subunidades también son caracterís-

ticas de los miembros de la familia Paramyxoviridae<sup>28</sup>.

El análisis de las proteínas virales mediante su reactividad evaluada por inmunoblot, permitió confirmar el origen viral de las glicoproteínas 98 y 70 kd a partir del polipéptido precursor de 150 kd, además de otras dos proteínas cuyas masas moleculares son 30 y 40 kd, respectivamente. Estas últimas no se habían determinado en geles de poliacrilamida sometidos a tinción con nitrato de plata.

La proteína de 30 kd podría corresponder a la proteína de la matriz (M) la p27 ó p28<sup>29</sup>, que no es una glicoproteína y se asocia sólo de manera parcial con la envoltura del virión. De otra parte el polipéptido de 40 kd correspondería a la proteína constitutiva de la nucleocápside viral cuya masa molecular Trudel *et al.*<sup>23</sup> calcularon previamente en 40 ó 41 kd.

El suero humano agudo ensayado en este trabajo exhibió una reactividad diferencial cuando se comparó con el de la fase convaleciente. La presencia de la banda de 40 kd en el suero recuperado de la fase aguda de la infección, en ambas cepas, puso de manifiesto un comportamiento antigénico diferencial para este péptido. Si se supone que los anticuerpos presentes en este suero son de origen materno, este hallazgo coincide con los resultados obtenidos por Ward *et al.*<sup>30</sup>, quienes encontraron que las madres de niños que no se enfermaban durante las epidemias de VRS en los primeros seis meses de edad, tenían niveles altos de anticuerpos contra la proteína 40 kd, en contraste con las madres de bebés que presentaban infecciones repetidas durante los primeros seis meses de vida y quienes no mostraban reactividad contra la P40.

Las glicoproteínas gp98 y gp70 presentaron sitios antigénicamente reactivos para el suero humano y el

suero hiperinmune de conejo. Sin embargo, la gp98 no fue reconocida por los sueros anticonejo VRS-Cali y anti VRS-Long. Este resultado se podría interpretar como un efecto de la respuesta del huésped al virus o de este huésped a la glicoproteína. En el primer caso, si se considera que la glicoproteína está glicosilada en más de 50% de su masa total<sup>31</sup> y que el patrón de glicosilación depende de la célula huésped, es posible postular que este antígeno estimuló la producción de anticuerpos en el conejo, en su mayoría hacia la fracción glicosilada. Tal interpretación podría explicar algunas reacciones cruzadas que se observaron en el caso de células no infectadas. Con el fin de probar esta hipótesis se pudo bloquear la inespecificidad de adsorción del suero en la monocapa contra glicoproteínas de las células y de la gp98 del virus, hecho que confirma la hipótesis propuesta.

Las principales subclases de IgG comprometidas en la inmunidad de moléculas altamente glicosiladas como la gp98 son de las subclases IgG2 e IgG4 cuya concentración es baja en bebés menores de un año. Cuando se examinó el patrón de sueros convalecientes, se pudo explicar la ausencia o baja reactividad a la gp98 como el resultado más bien de una respuesta de tipo IgM-anti-gp98, que no sería demostrable por el sistema utilizado de proteína A radioiodinada que se empleó en este trabajo.

El análisis de la inmunogenicidad de las proteínas que se separaron en condiciones reductoras indicó que la subunidad F1 de la banda 70 kd es reactiva en sueros humanos y de conejo. Es de interés observar que el efecto del 2-Mercaptoetanol suprimió la fuerte reactividad a la banda de 70 kd y apareció una nueva banda reactiva de 43.2 kd que corresponde

ría a la F1 (Cuadro 1); no se observó reactividad de los sueros contra la subunidad de 25 kd posiblemente porque el efecto reductor en los puentes disulfuro alteró la conformación del potencial epítipo. Sin embargo, en la literatura<sup>9</sup> se presenta una fuerte evidencia que los epítopos reactivos de F se localizan en la F1 y que tendrían un efecto neutralizante y desencadenador de la formación de sincicios.

Como se reconoce la importancia de las glicoproteínas del virus en el establecimiento de los mecanismos de inmunopatogénesis y con base en el papel fundamental que cumple la gp70, se iniciaron estudios para establecer diferencias a nivel de la estructura de las dos gp70 de las cepas que se analizaron. La caracterización proteolítica de las gp70 de ambos viriones con la proteasa V8 permitió por primera vez enfocar las semejanzas antigénicas de las posibles secuencias de aminoácidos y su importancia en la conformación molecular de los epítopos de esta glicoproteína viral. Los ensayos con esta proteasa pusieron de manifiesto la existencia por lo menos de dos residuos de Glu en la gp70. Los péptidos de 11 a 7 kd conservaron los determinantes de neutralización con el anticuerpo monoclonal y con los sueros policlonales de conejo. La posible localización de los epítopos en la gp70 de la cepa Long sería en la región amino terminal de F1. Esta evidencia abre la posibilidad de emplear la F1 como un marcador de tipo polimórfico porque se podrían ensayar los péptidos V8 terminales contra sueros de pacientes y así valorar la constancia de la respuesta a nivel poblacional.

## SUMMARY

An isolate of respiratory syncytial virus obtained from a two months old

child with acute respiratory infection included into an epidemiological study performed in Cali (1986-1990), was used to characterize by molecular and immunological methods the viral glycoproteins that play important role in the mechanism of immunopathogenesis of respiratory infection caused by this kind of virus. The characterization of *in vitro* radio-labeled proteins with <sup>3</sup>H-Glucosamine by electrophoresis, revealed glycoproteins of 98, 70, and 30 kd as structural components of viral envelope. Gp70 is immunopathogenically important because it exerts an IgE mediated protection passively transmitted by the mother. It was possible to characterize two protease V8 sites on the gp70 that were similar in Cali and Long viral strains. By immunoblot analysis, the F1 subunit of gp70 showed an important role in neutralizing immunoresponse in acute phase of human sera and hyperimmune sera from rabbits. Taken together results obtained showed the antigenic and structural similarities between the Cali and Long strains.

## REFERENCIAS

- Chanock RM, Kim HW, Brandt CD, Parrot RA. Respiratory syncytial virus. In Evans AS (ed.) *Viral infectious of humans: epidemiology and control*. New York; Plenum Publishing Corp., 1982, pp. 471.
- Kapikian AZ, Chanock RM, Suvedoff KA, Stewarth CE. An epidemiologic study altered clinical reactivity to respiratory syncytial virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am J Epidemiol* 1969; 89: 405-21.
- Parrot RM, Kin HW. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex. *Am J Epidemiol* 1973; 98: 289-300.
- Borrero I, Fajardo LP, Bedoya A, Zea A, Carmona F, Borrero M. Acute respiratory tract infections among a birth cohort of children from Cali, Colombia, who were studied through 17 months of age. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 5950-56.
- Berman S, Dueñas A, Bedoya A, Constain V, León S, Borrero I, Murphy J. Acute lower respiratory tract illnesses in Cali, Colombia: A two year ambulatory study. *Pediatrics* 1983, 71: 210-18.
- Núñez RM, Duque J, de González B. Viral and chlamydial etiology of acute infection of the lower respiratory tract in Colombian children. *Pediatr Infectol Dis J* 1988; 71: 69-70.
- Jonhson PR, Springs MK, Olmsted RA, Collins PL. The glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5625-29.
- Huang YT, Collins P, Wartz G. Characterization of the 10 proteins of human respiratory syncytial virus. Identification of a fourth envelope associated protein. *Virus Res* 1985; 2: 157-73.
- Trudel M, Nadon F, Seguin C, Payment P, Talbot P. Respiratory syncytial virus fusion glycoprotein: further characterization of major epitope involved in neutralization. *Can J Microbiol* 1987; 33: 933-38.
- Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BR, Stone YV, McIntosh K. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1985; 151: 626-33.
- Fernie B, Gerin J. The stabilization and purification of respiratory syncytial virus using MgSO<sub>4</sub>. *Virology* 1980; 106: 141-44.
- Levine S. Polypeptides of respiratory syncytial virus. *J Virol* 1977 21: 427-31.
- Lennet EH, Schimdt MJ. *Diagnostic, procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5th ed. Washington, American Public Health Association, 1979.
- Harlow ED, Lane D. *Antibodies. A laboratory manual*. New York; Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-85.
- Studier FW. Analysis of Bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J Mol Biol* 1973; 79: 237-48.
- Towbin H, Staehelm J, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-54.
- Cleavelad DW, Fisher SG, Kischner MW, Laemmli UK. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1977; 252: 1102-06.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York; Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. Pp. 17.3-17.8.
- Lambert DM, Pons MW, Mbuy GM. Nucleic acids of respiratory syncytial virus. *J Virol* 1980; 36: 837-46.
- Peeples M, Levine S. Respiratory syncytial virus polypeptides, their location in the virion. *Virology* 1979; 95: 137-45.
- Bernstein JM, Hruska JJ. Respiratory syncytial virus protein: Identification by immunoprecipitation. *J Virol* 1981, 38: 278-85.
- Trudel M, Nadon F, Seguin C. Immunovirological studies on human respiratory syncytial virus structural proteins. *Can J Microbiol* 1986; 32: 15-21.
- Norby E, Mufson MA, Shestiberedaran H. Structural differences between subtype A and B strains of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1986; 67: 2721-29.
- Wrunner WH, Pringle CR. Respiratory syncytial virus proteins. *Virology* 1976; 73: 228-43.
- Grubber C, Levine D. Respiratory syncytial virus polypeptides III. The envelope-associated proteins. *J Gen Virol* 1983; 64: 825-32.
- Fernie BF, Gerin JL. Immunochemical identification of viral and nonviral proteins of the respiratory syncytial virus virion. *Infect Immun* 1982; 37: 243-49.
- McIntosh K, Chanock RM. Respiratory syncytial virus. In Fields N (ed.) *Virology*. New York; Raven Press, 1985, pp. 1285-303.
- Walsh EE, Hruska J. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus protein. Identification of the fusion protein. *J Virol* 1983; 47: 171-177.
- Ward KA, Everson JS, Lambden PR, Watt RR. Antigens and structural variations in the major nucleocapsid protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1984; 65: 1749-57.
- Olmsted R, Murphy B, Lawrence LA. Processing, surface, expression and immunogenicity of carboxyterminally truncated mutants of G protein of human respiratory syncytial virus. *J Virol* 1989; 63: 411-20.