



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**ESTUDIO MOLECULAR Y EVOLUTIVO DEL GEN DE LA
GLUCOPROTEÍNA G DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO Y SU
RELACIÓN CON LA CIRCULACIÓN LOCAL Y GLOBAL EN UN
PERÍODO DE SEIS AÑOS**

Mariana Viegas

Directora: Dra. Alicia S. Mistchenko

AÑO 2010

Viegas, Mariana

Estudio molecular y evolutivo del gen de la glucoproteína G del virus sincicial respiratorio y su relación con la circulación local y global en un período de seis años. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2012.

E-Book.

ISBN 978-950-34-0816-2

1. Sistema Respiratorio. 2. Tesis de Doctorado. I. Título
CDD 611.2

Fecha de catalogación: 25/11/2011

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Alicia Mistchenko, mi Directora de Tesis, por haberme dado la libertad de trabajar, crear y crecer con los virus, cosa que no es muy común en los ámbitos de la investigación. Y por dar “rienda suelta” a la imaginación propia.

A Pao Barrero por ser mi “Co-equiper”, guía, y maestra en todo lo que he hecho. ¡Por transmitirme su pasión por la evolución! ¡Y sobre todo por su gran amistad y apoyo en todo!

A mis padres Jorge y Graciela, por darme siempre libertad, confianza y seguridad de expresarme en todos los aspectos y momentos de mi vida y mostrarme que defender lo que uno piensa vale y mucho.

A mis hermanos, Gachi y Santi con los que siempre he sido muy compañera, y me han seguido en todas las etapas de mi vida, participando en todos los aspectos: con sus sobrinos e interesándose por mi trabajo. ¡Gachi gracias por la ayuda incondicional, Santi gracias por tus creaciones electrónicas!

A mi amor Lisandro, que siempre me ha apoyado y ha sido uno de los impulsores de que yo siga este camino en mi vida. Y por sobre todas las cosas por haberme ayudado a crear mi mayor éxito, nuestros dos preciosos hijos Bautista y Gregorio a los cuales intentaremos mostrarles la pasión por lo que a uno le gusta.

A mi tía Lia, por apoyarme siempre en todo y sobre todo en mis comienzos en el camino de mi “vida independiente” en La Plata.

A mis amigas y compañeras de laboratorio, Marie y Pao CH. por los mates de amistad!!! Y por tantas charlas evolutivas y de virus, y sobre todo de cosas familiares a la vez, con lo que siempre decíamos:-se puede congeniar.

A Coco Grinstein, el creador del Laboratorio de Virología del HNRG, por permitirme entrar en su laboratorio allá lejos y hace tiempo. ¡Y por fomentar la discusión científica en los eternos seminarios!

A Patri Riveiro, por su eterna ayuda a guardar los virus, y por su graciosa amistad junto con la de Tere. Al resto de mis compañeros de laboratorio (Marcela, Richard, Gusy, Patricia, Ma Victoria) por las enriquecedoras discusiones científicas.

A Alberto Maffey, neumonólogo pediátrico, por su gran aporte a esta tesis desde el punto de vista clínico, y por su eterna buena predisposición para todo lo que se le plantea.

Al Dr. José A. Melero del Instituto de Salud “Carlos III”, Madrid, España, por su generosa colaboración en el trabajo que realizamos en conjunto, y por su calidez y apoyo casi paternal en los Simposios de RSV a los cuales asistí.

A Alfonsina Trento y Mónica Galiano, con las cuales no sólo realizamos un trabajo en colaboración parte de esta Tesis sino que desarrollamos una cálida amistad gracias a transitar las tres el mundo del RSV.

TRABAJOS PUBLICADOS EN RELACIÓN CON ESTA TESIS

Viegas M., Barrero PR, Maffey AF, Mistchenko AS. 2004. Respiratory virus seasonality in children under five years of age in Buenos Aires, Argentina: a five-year analysis. *J Infect*; 49:222-228.

Viegas M., Mistchenko AS. 2005. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroup A over a six-year period (1999-2004) in Argentina. *J Med Virol*; 77:302-310.

Trento A*, **Viegas M***, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS, Melero JA.(*). contributed equally to this work. 2006. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. *J Virol*; 80:975-984.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AcMos	Anticuerpos monoclonales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANF	Aspirados nasofaríngeos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BA	Buenos Aires
BrEt	Bromuro de etidio
BQL	Bronquiolitis
cap	Caperuza
C	Cisteína
Cys	Cisteína
dA	Desoxiadenosina
DEPC	Dietil pirocarbonato
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DS	Desviación estándar
ECP	Efecto citopático
ELISA	Enzimoimmunoensayo (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EV	Enterovirus
Flu H5N1	Virus de influenza H5N1
FluA	Virus de influenza A
FluB	Virus de influenza B
GAGs	Glucosaminoglicanos
GE	Señal de terminación (<i>gene end</i>)
GS	Señal de iniciación (<i>gene start</i>)
h	Horas
HAdV	Adenovirus humanos
HBD	Dominio de unión a heparina
HNRG	Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez
HR	Humedad Relativa
HRSV	<i>Human respiratory syncytial virus</i>
IC	Intervalo de confianza
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IL-1	Interleuquina 1
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
INF	Interferón
IRAA	Infección respiratoria alta
IRAB	Infección respiratoria aguda baja
IRF	<i>IFN regulator factor</i>
Kb	Kilobases
kDa	kilodaltons
LB	Luria Bertani
LTh	Linfocitos T cooperadores
M	Molar
MEM	Medio mínimo Esencial
min	Minutos
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 α
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NM	Neumonía

MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MPV	Metaneumovirus
MRCa	Ancestro común más reciente
MV	Máxima Verosimilitud
MW	<i>Molecular weight</i>
N	No sinónimas (sustituciones)
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nt	Nucleótidos
OPS	Organización Panamericana de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIV1	Virus de parainfluenza tipo 1
PIV2	Virus de parainfluenza tipo 2
PIV3	Virus de parainfluenza tipo 3
pmoles	Picomoles
Rad	Radiación
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa
RV	Regiones variables
s	Segundos
S	Sinónimas (sustituciones)
SFB	Suero fetal bovino
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
SOC	Medio SOB (<i>Super Optimal Broth</i>) con glucosa
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TCID₅₀/ml	<i>Tissue Culture Infectious Dose₅₀ per ml</i>
Ti	Transiciones
TLR4	<i>Toll like receptor 4</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
Tv	Transversiones
U	Unidades enzimáticas
UCIP	Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos
UFP	Unidades formadoras de placa
UV	Ultravioleta
vs	Versus
μg	Microgramo
μl	Microlitros
μM	Micromolar

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Enfermedades respiratorias agudas bajas producidas por virus en pacientes pediátricos. Epidemiología General en el mundo y en la Argentina	12
1.2. IRAB por HRSV: Epidemiología del HRSV en mundo y Argentina.....	14
1.3. Aspectos clínicos de la infección por HRSV en pediatría.....	16
1.4. Patogénesis de la bronquiolitis producida por RSV	17
1.5. Inmunidad frente a HRSV	18
1.6. Diagnóstico de laboratorio de IRAB producida por HRSV	20
1.7. Tratamiento	21
1.8. Profilaxis	22
1.8.1. Vacunas	22
1.8.2. Inmunoprofilaxis pasiva.....	23
1.9. Aspectos específicos del RSV.....	23
1.9.1. El virus	23
1.9.1.1. Historia	23
1.9.1.2. Clasificación y estructura	24
1.9.2. Genoma del RSV, ARNm y elementos actuantes en cis.....	26
1.9.3. Proteínas	27
1.9.3.1. Proteínas no estructurales	27
1.9.3.2. Proteínas de la nucleocápside	28
1.9.3.3. Proteína de matriz	30
1.9.3.4. Proteínas de superficie.....	30
1.9.4. Ciclo replicativo.....	36
1.9.4.1. Fijación y entrada.....	36
1.9.4.2. Síntesis de ARN y regulación.....	37
1.9.4.3. Morfogénesis viral	39
1.10. Grupos antigénicos, diversidad y evolución del HRSV	40
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	44
2.1. Hipótesis.....	44
2.2. Objetivos generales.....	44
2.3. Objetivos particulares	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
3.1. Obtención y procesamiento de muestras	46
3.1.1. Muestras clínicas.....	46
3.1.2. Cepas patrones utilizadas	47

3.2. Aislamiento por plaqueo de las cepas patrones Long/56 y CH18537/63 y determinación del título de las mimas.	47
3.2.1. Cultivo de los virus en línea celular.....	47
3.2.2. Purificación de virus por plaqueo	48
3.2.3. Titulación del HRSV por el método de dilución límite (determinando unidades formadoras de placa (UFP)).....	48
3.3. Análisis molecular.....	49
3.3.1. Extracción de ARN total	49
3.3.2. Clasificación del HRSV en subtipos A y B a partir de los ANF.	49
3.3.3. Análisis de genotipos del HRSV mediante el estudio de la glucoproteína G.	50
3.3.3.1. Amplificación de la glucoproteína G:	50
3.3.3.2. Purificación de los productos de amplificación.....	51
3.3.3.3. Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para el subtipo A.	51
3.3.3.4. Secuenciación directa de los productos de amplificación	52
3.3.4. Análisis de la variabilidad intramuestra del HRSV.	52
3.3.4.1. Amplificación de muestras para análisis de cuasiespecies.....	52
3.3.4.2. Ligación de los productos de amplificación.	53
3.3.4.3. Preparación de bacterias competentes.....	54
3.3.4.4. Transformación de bacterias competentes.....	54
3.3.4.5. Selección y análisis de clones recombinantes	55
3.3.4.6. Extracción de ADN plasmídico y digestión enzimática del mismo para su cuantificación.	55
3.3.4.7. Secuenciación de los clones.....	56
3.4. Análisis Bioinformático	56
3.4.1. Análisis y alineamiento de las secuencias obtenidas	56
3.4.2. Reconstrucción de árboles filogenéticos.....	57
3.4.3. Análisis de asociación y movimiento de variantes virales dentro de los genotipos a través del tiempo	58
3.4.4. Cálculo de la tasa de evolución y determinación del ancestro común más reciente (MRCA).	59
3.4.5. Predicción de los perfiles de antigenicidad.....	59
3.4.6. Predicción de los sitios potenciales de N-glicosilación y O-glicosilación.....	59
3.4.7. Análisis de recombinación	60
3.5. Análisis Estadístico	60
3.6. Números de acceso a GeneBank.....	61
4. RESULTADOS.....	62
4.1. Marco Epidemiológico De Las IRAB En Pacientes Pediátricos En La Ciudad De Buenos Aires.	62
4.2. Análisis Molecular Intermuestras.....	68
4.2.1. Distribución de subtipos del HRSV	68
4.2.2. Análisis molecular del HRSV subtipo A	69
4.2.2.1. Distribución de patrones de restricción	69
4.2.2.2. Análisis filogenético y patrones de distribución de genotipos	71
4.2.2.3. Análisis de la variabilidad de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas	80
4.2.3. Análisis molecular del HRSV subtipo B.....	87
4.2.3.1. Detección de los HRSV subtipo B con la duplicación de 60 nt	87

4.2.3.2. Análisis filogenético y molecular	88
4.2.3.3. Comparación de las secuencias Argentinas (BA) con las cepas del HRSV con la duplicación de 60 nt aisladas en otras partes del mundo.	92
4.2.3.4. Análisis de la variabilidad nucleotídica y aminoacídica dentro de la duplicación de 60 nt.....	97
4.2.3.5. Estimación de la fecha del ancestro común más reciente (MRCA) de las secuencias con la duplicación de 60 nt.	102
4.3. Análisis Molecular Intramuestras.....	104
4.3.1. Análisis de cuasiespecies y su rol en la generación de variabilidad genética del HRSV. Selección de las muestras analizadas.	104
4.3.2. Caracterización molecular de las variantes encontradas en cada muestra clínica....	106
4.3.3. Dinámica y evolución de las variantes encontradas en las muestras clínicas analizadas	111
5. DISCUSIÓN.....	127
5.1 Marco Epidemiológico De Las IRAB En Pacientes Pediátricos En La Ciudad De Buenos Aires, Argentina.....	127
5.2. Análisis Molecular Intermuestras.....	131
5.2.1. Distribución De Subtipos Del HRSV Durante El Período Analizado	131
5.2.2. Análisis Molecular Del HRSV Subtipo A.....	132
5.2.3. Análisis Molecular Del HRSV Subtipo B.....	142
5.3. Análisis Molecular Intramuestras. Rol De Las Cuasiespecies En La Evolución Del HRSV	149
6-CONCLUSIONES-RESUMEN	161
7-BIBLIOGRAFÍA.....	166
8- APÉNDICES	192

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microscopía electrónica de la liberación del RSV de la superficie apical de células polarizadas Vero C1008 (15750X).....	25
Figura 2. Estructura esquemática del virión del RSV.	26
Figura 3. Representación esquemática del genoma, antigenoma y ARNm de RSV.....	27
Figura 4. Representación esquemática del modelo de estructura tridimensional de la glucoproteína G (Melero, 1997).....	33
Figura 5. Representación de la estructura primaria de la glucoproteína G.....	35
Figura 6. a) Diagnóstico clínico diferencial de las IRAB producidas por HRSV, BQL: bronquiolitis, NUF: neumonía focal; NMF: neumonía multifocal y Nderr: neumonía con derrame; b) Distribución de edades de los pacientes con diagnóstico del HRSV positivo.	64
Figura 7. Correlación negativa entre la edad en meses y el número de pacientes previamente sanos con diagnóstico del HRSV positivo.....	64
Figura 8. Correlación negativa entre la edad en meses y el número de casos con: a) bronquiolitis (BQL) y b) neumonía (NM).	65
Figura 9 (Página siguiente). Distribución mensual de los virus respiratorios analizados en el período 1999-2004.	65
Figura 10. Distribución estacional de la incidencia del HRSV asociado a la temperatura media mensual, humedad relativa media mensual, radiación UVB media mensual (período 1999-2004).	67
Figura 11. Determinación de la sensibilidad de la <i>multiplex</i> RT-PCR anidada.....	68
Figura 12. Análisis de RFLP. Patrones de restricción individuales de los fragmentos amplificados del ectodominio del gen de la glucoproteína G de los HRSV subtipo A correspondientes al brote del año 2001.	70
Figura 13 . Distribución de patrones de restricción compuestos durante el período analizado.	71
Figura 14. Árbol filogenético de cepas del HRSV subtipo A (secuencias de 595 nt del gen de la glucoproteína G) construido por inferencia bayesiana.	74
Figura 15. Distribución de genotipos del HRSV subtipo A durante el período 1999-2004, más casos esporádicos de 1997.	75
Figura 16 (páginas siguientes). Análisis de Partición identificando diferentes subpoblaciones de cepas argentinas dentro los genotipos a) GA2 y b) GA5 en el tiempo.	76
Figura 17. Distribución geográfica mundial de las secuencias del HRSV subtipo A. En cada país se indica el o los clados que fueron encontrados entre las secuencias reportadas y el año de aislamiento.....	79
Figura 18. Comparación de perfiles antigénicos del ectodominio de la glucoproteína G completo.....	83
Figura 19 (Página siguiente). Alineamiento de aminoácidos de las cepas del HRSV argentinas subtipo A.	84
Figura 20. Sitios potenciales de O-Glucosilación.	86
Figura 21. Determinación del tamaño de los productos de amplificación del HRSV subtipo B amplificados con los cebadores F164 y OG _{CH496+}	88
Figura 22. Análisis filogenético de secuencias completas del gen de la glucoproteína G del HRSV subtipo B con una duplicación de 60 nt, aisladas en la Argentina en el período 1999-2004. Análisis bayesiano.	91
Figura 23. Árbol filogenético correspondiente al extremo C-terminal del gen de la glucoproteína G del HRSV subtipo B, construido mediante análisis bayesiano.	94

Figura 24. Árbol filogenético construido por inferencia bayesiana correspondiente al extremo C-terminal del gen de la glucoproteína G del HRSV subtipo B a) sin los primeros y b) sin los segundos, 60 nt de la duplicación en las secuencias del genotipo BA.	95
Figura 25. Distribución geográfica de las secuencias BA con la duplicación de 60 nt.....	97
Figura 26. Alineamiento de nt y aa de las secuencias parciales del gen de la glucoproteína G con la duplicación de 60 nt.	99
Figura 27. Variación de las secuencias a lo largo del gen de la glucoproteína G de las muestras con la duplicación de 60 nt. a) Número de cambios nucleotídicos expresados como porcentajes calculados por ventanas de a 60 nt no solapadas en las secuencias completas provenientes de las muestras BA. b) Número de cambios para las secuencias de aminoácidos calculados por ventanas de a 20 aa no solapadas.	100
Figura 28. Tasa de evolución y estimación del año del ancestro común más reciente de las secuencias BA con la duplicación de 60 nt.....	103
Figura 29 (Página siguiente). Alineamiento de aminoácidos obtenido con el programa Clustal X, correspondiente a todos los clones analizados de las muestras clínicas estudiadas.....	109
Figura 30 (Página siguiente). Árbol filogenético construido por inferencia bayesiana relacionando a las cepas argentinas del HRSV correspondientes al subtipo A (circulantes durante el período 1999-2004) y la totalidad de las variantes genéticas (clones) encontradas en las muestras clínicas analizadas en esta sección.	112
Figura 31 (Página anterior). Árbol filogenético construido por inferencia bayesiana relacionando cepas del HRSV subtipo A (circulantes en el mundo durante el período 1999-2004) y la totalidad de las variantes genéticas (clones) encontradas en las muestras clínicas analizadas en esta sección.....	115
Figura 32 (Página siguiente). Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las variantes analizadas para el par de muestras ARG1160/04-ARG2525/04.....	115
Figura 33 (Página siguiente). Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las 22 variantes analizadas para la muestra ARG2525/04.....	118
Figura 34 (Página siguiente). Posiciones filogenéticas cambiantes de las variantes RSVARG1160/04C4 y RSVARG1160/04C7 (marcadas con una flecha) indicativas de probable recombinación intergenotípica (eventos 1 y 2).....	121
Figura 35 (Página anterior). Posición filogenética cambiante de la variante RSVARG2525/04C7 (marcada con una flecha) indicativa de recombinación intergenotípica (evento 3).	124
Figura 36. Valores de soporte estadístico promedio del modelo aplicado a cada punto de corte de recombinación detectado para a) el alineamiento de todas las variantes de las muestras ARG1160/04 y ARG2525/04 y b) el alineamiento de las variantes de la muestra ARG2525/04.	125

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Divergencia entre las secuencias de nt y aa de los genes de las distintas proteínas del HRSV entre cepas prototipo del subtipo A (A2) y subtipo B (CH18537/63) (Sullender, 2000).	41
Tabla II. Etiología viral de las IRAB en niños menores de 5 años.	63
Tabla III. Distribución anual del número de casos y frecuencias de los virus respiratorios analizados encontrados en niños menores de cinco años con IRAB.	63
Tabla IV. Valores de coeficientes de correlación de Spearman relacionando incidencia del HRSV y parámetros meteorológicos.	67
Tabla V. Distribución anual de subtipos de HRSV encontrados durante el período 1999-2004.	69
Tabla VI. Distribución de patrones de restricción compuestos e individuales del ectodominio del gen de la glucoproteína G del HRSV subtipo A, durante el período 1999-2003, más casos esporádicos de 1997.	70
Tabla VII. Sitios con selección positiva y negativa en cepas argentinas del HRSV subtipo A.	82
Tabla VIII. Circulación de cepas del HRSV subtipo B en Buenos Aires durante el período 1999-2004.	89
Tabla IX. Sitios con selección positiva y negativa en cepas BA de HRSV subtipo B.	101
Tabla X. Estimación de las distancias genéticas medias por sitio para el conjunto de clones correspondientes a cada muestra analizada (expresadas como el número medio de sustituciones nucleotídicas por sitio).	107
Tabla XI. Número y características de los sitios polimórficos encontrados en cada grupo de variantes correspondientes a cada muestra analizada.	108
Tabla XII. Estimación de las distancias genéticas medias por sitio para cada conjunto de clones correspondientes a cada muestra analizada (expresadas como el número medio de diferencias en aminoácidos por sitio) y sus desviaciones estándar (DS).	109
Tabla XIII. Análisis de recombinación mediante el programa RDP3.	120
Tabla XIV. Análisis de recombinación mediante el programa RDP3.	121

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades respiratorias agudas bajas producidas por virus en pacientes pediátricos. Epidemiología General en el mundo y en la Argentina

Las enfermedades infecciosas persisten como una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en los países en vías de desarrollo. Entre éstas, las infecciones respiratorias presentan la tasa de mortalidad más alta en niños menores de cinco años de edad, la cual disminuye con el aumento de la edad de los mismos. Aunque nuevos agentes infecciosos han sido identificados, los virus caracterizados durante las pasadas décadas continúan siendo los principales responsables de este problema de la salud pública. Aproximadamente 200 serotipos virales han sido asociados con enfermedades respiratorias humanas, siendo los más frecuentes el virus sincicial respiratorio humano (HRSV), virus de influenza A y B (FluA y FluB, respectivamente), adenovirus humano (HAdV), y virus de parainfluenza tipos 1, 2 y 3 (PIV1, PIV2 y PIV3 respectivamente), hallados principalmente en recién nacidos y niños menores de cinco años de edad (Weissenbacher *et al.*,1990; Lina *et al.*,1996; Arnold *et al.*,2002; Griffin *et al.*,2002; Stralioetto *et al.*,2002). A partir del año 2000, la descripción y/o surgimiento de nuevos virus asociados a procesos respiratorios, entre ellos metaneumovirus (MPV), nuevos coronavirus SARS-CoV, NL63 y HKU1, influenza H5N1 (Flu H5N1), bocavirus (BoV), rinovirus y enterovirus (EV) han presentado un nuevo desafío para los laboratorios de virología. Sin embargo, la real contribución de algunos de estos agentes en los procesos respiratorios observados en los pacientes pediátricos continúa en estudio. Por otro lado, en abril del año 2009 se detectó en Estados Unidos un nuevo virus de influenza A (H1N1) de origen porcino en dos pacientes no relacionados epidemiológicamente. La misma cepa viral fue identificada en pacientes en Méjico, Canadá y posteriormente en el resto del mundo. Como consecuencia, la Organización Mundial de la Salud lanzó un alerta mundial debido a que se estaba en presencia de una nueva pandemia de influenza. Este nuevo virus fue identificado como el causante de un brote de una infección respiratoria que oscilaba entre un cuadro febril leve autolimitado hasta uno severo que llevaba a la muerte. A través del estudio de su genoma, se determinó que había sido generado por reasociación de segmentos de virus de influenza humanos, porcinos y aviares. A este virus se lo denominó inicialmente influenza porcino (del inglés *swine influenza*, *swFlu*), pero actualmente se lo ha nombrado Influenza pandémico H1N1 (del inglés *pandemic influenza*, *pdmFlu*) (Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team *et al.*, 2009). A partir de su aparición, este virus debe

tenerse en cuenta en los diagnósticos de rutina de las infecciones respiratorias de etiología desconocida, a pesar de que aún no está determinada su importancia epidemiológica en sucesivos brotes.

A pesar de que la mayoría de las infecciones respiratorias comprometen el tracto respiratorio alto, las infecciones respiratorias agudas bajas (IRAB) predisponen al desarrollo futuro de enfermedades crónicas y severas, incrementando el riesgo de mortalidad en casi 70 veces en los países en vías de desarrollo como la Argentina (Benguigui *et al.*, 1997). Entre los síndromes clínicos más frecuentemente asociados con IRAB encontramos la bronquiolitis, la neumonía, la neumonitis y el síndrome coqueluchoide (Carballal *et al.*, 2001). Entre éstas la bronquiolitis es la IRAB más frecuentemente causada por virus respiratorios en los lactantes.

En cuanto a la etiología viral de las IRAB en pacientes pediátricos menores de 5 años, se han realizado numerosos estudios y todos coinciden con que el HRSV es el agente más frecuente, siendo el mayor responsable de las hospitalizaciones en el período invernal. Con respecto a las frecuencias y prevalencias de los restantes virus generalmente analizados no hay un patrón consenso, en los últimos años numerosos estudios han informado que el rinovirus es la segunda etiología viral más frecuente seguida por HAdV, FluA y PIV o que PIV predomina por sobre FluA y HAdV (Kim *et al.*, 2000; Carballal *et al.*, 2001; Mahony, 2008). A partir del año 2001 se ha descrito un nuevo agente viral productor de IRAB, llamado MPV, con valores de frecuencias que oscilan entre el 1,5-5% hasta inclusive el 13% de las IRAB, dependiendo de la técnica utilizada para su determinación (van den Hoogen *et al.*, 2001; Arden *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2006; Heikkinen *et al.*, 2008; Kaplan *et al.*, 2008).

Los patrones de incidencia estacionales son una característica distintiva de los virus respiratorios. Históricamente, las bajas temperaturas, han estado ligadas a eventos de la salud, y los aumentos de infecciones respiratorias durante el invierno han demostrado tener incidencia en el aumento de la mortalidad global (Fleming *et al.*, 2005). Las variaciones geográficas relacionadas con la temperatura, estación lluviosa, y humedad relativa han sido identificadas en estudios epidemiológicos realizados en todo el mundo. En países con climas templados, como la Argentina, la prevalencia de infecciones respiratorias aumenta durante los meses más fríos y húmedos. Por ejemplo, los virus sincicial respiratorio e influenza están normalmente limitados al invierno, mientras que la incidencia de rinovirus y adenovirus se mantiene a lo largo de todo el año con incrementos periódicos en su frecuencia (Cooper *et al.*,

2007). Por otro lado en los países tropicales el aumento se relaciona con la estación lluviosa del año (Shek and Lee, 2003).

1.2. IRAB por HRSV: Epidemiología del HRSV en mundo y Argentina

En las últimas décadas, luego de numerosos estudios ha quedado claro que el HRSV además de ser la principal etiología viral de IRAB en lactantes y niños pequeños, es también un importante patógeno en otros grupos etáreos como los ancianos. Por otro lado los recién nacidos muy prematuros, lactantes y niños pequeños con enfermedad pulmonar crónica, cardiopatías, inmunodeficiencias o inmunosupresión son los huéspedes que sufren mayor riesgo de adquirir infecciones graves producidas por este virus y con una alta mortalidad. Por lo tanto, en las poblaciones susceptibles el HRSV es la principal causa de bronquiolitis y una de las principales causas de neumonía durante el primer año de vida, produciendo entre un 23-40% de todas las IRAB.

Es importante mencionar que a pesar de que hay poblaciones de riesgo para adquirir IRAB grave causada por HRSV, aproximadamente tres cuartas partes de las hospitalizaciones ocurren en lactantes y niños previamente sanos. Ésto se vio en un estudio retrospectivo realizado en España sobre pacientes graves con bronquiolitis ingresados a una Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP). En el mismo se encontró en los 12 períodos epidémicos de HRSV estudiados (1994-2006), que el 74% del total de los pacientes ingresados en la UCIP tenía al HRSV como agente etiológico de la enfermedad y que a pesar de que la existencia de determinados factores de riesgo incrementa la probabilidad de una evolución grave de la enfermedad, la mayoría de los pacientes eran lactantes previamente sanos cuyo único factor de riesgo era ser menores de seis meses, no candidatos a las medidas de profilaxis anti-RSV recomendadas (López Guinea *et al.*,2007). La infección y reinfección con HRSV son frecuentes durante el primer año de vida. La bronquiolitis y la neumonía producidas por HRSV se producen más frecuentemente entre las 6 semanas y los 9 meses de vida y el pico de incidencia de la IRAB ocurre entre los 2 y los 7 meses (Gardner, 1973; Holberg *et al.*,1991), correspondiéndose con la disminución del título de anticuerpos maternos. Estudios de relevamiento serológico han demostrado que aproximadamente la mitad de los lactantes que están en riesgo durante una epidemia de HRSV se infectan con el virus. En un estudio prospectivo, el 69% de los niños adquirió la infección durante su primer año de vida, el 83% fue reinfectado durante su segundo año y el 46% se reinfectaron durante su tercer año. A la edad de 24 meses todos los niños tuvieron al menos una infección por

HRSV y la mitad experimentó dos. El riesgo de reinfección disminuyó al 33,3% a la edad de 48 meses (Glezen *et al.*, 1986). En un jardín maternal, el 98% de los lactantes y niños pequeños que nunca habían estado en contacto con el virus se infectaron cuando se expusieron a HRSV durante un brote, y la frecuencia de reinfecciones durante dos brotes anuales sucesivos fue de 74% y 65%, respectivamente (Henderson *et al.*, 1979). La reinfección en los adultos también es común, particularmente bajo condiciones en las cuales la exposición al virus es elevada, y es probable que HRSV contribuya considerablemente a las enfermedades del tracto respiratorio en este grupo etáreo (Murry and Dowell, 1997). La reinfección en todas las edades es normalmente asintomática.

La forma de contagio de HRSV es mediante el contacto con secreciones respiratorias. El principal modo de diseminación es a partir de las grandes gotas de secreciones respiratorias o a través de la contaminación por fomites, más que por el contacto de pequeñas partículas aerosolizadas (Hall *et al.*, 1980; Hall and Douglas, 1981). Se requiere contacto cercano con un individuo infectado o la auto inoculación de las mucosas conjuntival y/o nasal con los dedos contaminados por el contacto con fomites infectados (Bitko *et al.*, 2007). Varios estudios han demostrado que el personal de los hospitales pediátricos tiene una tasa de infección del 25 al 50% durante un brote de HRSV (Graman and Hall, 1989; Murphy *et al.*, 1981). Esta población tendría un rol importante en la propagación de la infección por HRSV en los hospitales (Hall *et al.*, 1975; Bont, 2009), mientras que en las familias el virus se introduce primariamente por los niños pequeños de edad escolar, diseminándose luego con alta frecuencia a los hermanos mayores y adultos. En un estudio prospectivo, aproximadamente el 40% de todos los miembros de una familia mayores de un año se habían infectado luego de la introducción de HRSV (Hall *et al.*, 1976).

No hay datos fidedignos en cuanto a la tasa de mortalidad general por HRSV, pero datos de vigilancia epidemiológica realizada a mediados de los setenta estimó que la tasa de mortalidad estaba entre 0,5-2,5% de los niños hospitalizados con infección por HRSV (Clarke *et al.*, 1978). Con el advenimiento de UCIPs más modernas y efectivas, se ha bajado ese porcentaje a 0,3-1,0% de los niños hospitalizados (Moler *et al.*, 1992; Navas *et al.*, 1992). En nuestro país en el año 2003, el 10% de las muertes en niños menores de cinco años se debieron a afecciones respiratorias (OPS, 2007). De todas maneras en la Argentina no hay datos que permitan desglosar la tasa de mortalidad en estos pacientes debidas a infección por HRSV. La tasa de mortalidad asciende a valores mayores en niños y adultos con inmunodeficiencias o

inmunosupresiones, con valores de aproximadamente del 20-67%. Los pacientes transplantados de médula ósea están entre los inmunocomprometidos más severos y tienen el mayor riesgo de enfermedad fatal (Englund, 1999; Kim *et al.*, 2007; Lindblom *et al.*, 2010).

En la última década se ha incrementado la importancia del HRSV como agente etiológico de IRAB grave en los ancianos. Siendo un patógeno importante asociado a hospitalizaciones principalmente por neumonía que puede llevar a la muerte en personas mayores de 65 años (Falsey, 1998; Falsey and Walsh, 2000; Murata and Falsey, 2007).

El HRSV tiene una distribución mundial y en todos los países en los que ha sido estudiado, se lo ha encontrado como el principal patógeno respiratorio viral en la población pediátrica. Su incidencia tiene una clara estacionalidad tanto en países con climas templados como tropicales (Straliotto *et al.*, 2001; Galiano *et al.*, 2005).

1.3. Aspectos clínicos de la infección por HRSV en pediatría

El período de incubación de la enfermedad producida por HRSV está estimado en 5 días (Kapikian *et al.*, 1961; Lessler *et al.*, 2009). En el infante normal que toma contacto por primera vez con el virus a la edad de 6 semanas a 9 meses, el HRSV normalmente causa síntomas respiratorios altos. En el 25 al 40% de los casos, la infección progresa hacia el tracto respiratorio inferior, donde la bronquiolitis y la neumonía son las manifestaciones primarias. La infección asintomática en este grupo etáreo es probablemente poco común. Se produce otitis media aguda en la tercera parte de los niños con enfermedad por HRSV. En aquellos lactantes en los cuales se producen síntomas respiratorios bajos, hay un período prodrómico con rinorrea a veces acompañada de disminución del apetito. Puede aparecer tos entre el 1^{er} y 3^{er} día. En ese momento, también pueden presentarse estornudos y fiebre. Aparece la tos, el niño comienza a sibilar, si la enfermedad es leve los síntomas no sobrepasaran este estado y en la mayoría de los casos la recuperación se produce entre 7 y 12 días.

Aproximadamente entre el 1 al 2% de todos los lactantes que tienen bronquiolitis requieren hospitalización, y entre éstos el 2 al 5% necesitan ventilación mecánica (Leader and Colase, 2002). En los casos más severos, la tos y las sibilancias progresan y el niño se vuelve disneico. Se observa hiperexpansión del tórax y retracciones intercostales y subcostales. Se produce taquipnea, aun en ausencia de cianosis evidente, se incrementa la hipoxia y se produce falla respiratoria aguda, requiriendo ventilación mecánica. Este tipo de infecciones severas son más comunes en pacientes menores de nueve meses y en los lactantes con

enfermedades de base respiratoria o cardiopatías, en estos últimos la progresión de los síntomas es más rápida (Meert *et al.*, 1989).

Ha sido extensamente propuesta la existencia de una asociación entre la infección severa producida por HRSV en los primeros seis meses de vida y la hiperreactividad bronquial con episodios de sibilancias, la cual se perdería a los 11-13 años (Martínez *et al.*, 1995; Stein *et al.*, 1999). No obstante, la pregunta fundamental entre causa versus asociación continúa sin resolverse (McBride, 1999; Cane, 2001).

1.4. Patogénesis de la bronquiolitis producida por RSV

En el comienzo de la enfermedad el HRSV replica en la nasofaringe, aumentando su título a niveles tan altos como 10^5 TCID₅₀/ml (del inglés *Tissue Culture Infectious Dose₅₀ per ml*) en las secreciones nasales de los lactantes (Hall *et al.*, 1975). El mecanismo de progresión hacia el tracto respiratorio inferior puede involucrar la aspiración de las secreciones respiratorias altas que contienen virus, la dispersión de los mismos entre los pequeños espacios intercelulares a través del fluido extracelular o vía la capa de mucus que hay en la superficie del epitelio respiratorio.

El HRSV tiene un efecto citopático directo sobre las células del epitelio pulmonar, llevando a la pérdida de las funciones de estas células especializadas tales como el movimiento ciliar y a veces la destrucción misma del epitelio (Aherne *et al.*, 1970). Asimismo, se forma un infiltrado peribronquiolar de células mononucleares que se acompaña de edema submucoso y secreción de moco. Esta inflamación lleva a la obstrucción bronquiolar con atelectasia irregular y áreas de enfisema compensatorio (Gardner *et al.*, 1970). No se ha observado formación de sincicios in vivo. En cultivos de células epiteliales polarizadas humanas, el HRSV infecta la superficie apical de las células columnares ciliadas, y es excretado exclusivamente de la superficie apical de las mismas, propagándose a las células vecinas por el movimiento ciliar (Zhang *et al.*, 2002). Es importante aclarar sobre este punto que todas estas descripciones provienen del estudio de una pequeña minoría de los niños, aquellos que desarrollan una infección severa y en los cuales se pudieron realizar estudios histopatológicos. Por lo tanto la patogénesis descrita puede ser diferente en aquellos que no requieren ventilación y sobre todo de los niños no internados que desarrollan síntomas respiratorios leves y que constituyen la mayoría de los infectados por HRSV.

1.5. Inmunidad frente a HRSV

La respuesta inmune celular desarrollada frente al HRSV es esencial para limitar la replicación del virus y, en consecuencia, contribuir a la resolución del proceso infeccioso. De forma paradójica, ciertos elementos de la respuesta inmune parecen estar relacionados con la fisiopatología de las infecciones de las vías inferiores y, además, podrían tener relación con episodios subsecuentes de broncoconstricción en niños que padecen bronquiolitis. Dado que prácticamente todos los lactantes presentan infección por HRSV en los primeros meses de vida, pero no todos desarrollan bronquiolitis y la gravedad de ésta es variable, se ha sugerido que la respuesta inmune del paciente probablemente contribuya a las diversas manifestaciones de las infecciones causadas por este virus (Hoffman *et al.*, 2004). La respuesta inflamatoria a la infección por HRSV se inicia probablemente en las células del epitelio respiratorio (Welliver, 2000). Estas células producen una serie de citoquinas y quimioquinas en respuesta a las infecciones virales. Los pacientes con bronquiolitis por HRSV producen interleuquina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral α (del inglés *tumor necrosis factor*, *TNF- α*), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 8 (IL-8), proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (del inglés *macrophage inflammatory protein*, *MIP-1 α*) y la proteína RANTES (sigla en inglés por *regulated upon activation T cell expressed and secreted*) en las vías aéreas (Openshaw and Tregoning, 2005). En respuesta a las citoquinas, se produce una infiltración de células inflamatorias, predominantemente neutrófilos. Los macrófagos también participan en la respuesta inmune inicial, aunque su cantidad en las secreciones respiratorias suele ser menor que la de neutrófilos. Por otro lado, también se produce atracción de eosinófilos, basófilos y linfocitos B hacia las vías respiratorias. Éstos liberan una serie de mediadores, tales como histamina, leucotrienos e inmunoglobulina E, que se relacionan con el desarrollo de broncoconstricción e hiperreactividad bronquial. Además, se ha sugerido mediante resultados de estudios experimentales que el óxido nítrico puede ser uno de los efectores de algunas respuestas de hiperreactividad observadas en sujetos con infección por HRSV (Stark *et al.*, 2005). Una vez iniciada la respuesta inmune, los linfocitos T cooperadores (del inglés *T helper*, *Th*) son activados generando una respuesta adaptativa de tipo Th1 o Th2. La producción temprana de interferón γ (INF- γ) es la clave para que se presente una respuesta predominante Th1, mientras que una baja producción de INF- γ se asocia con una respuesta Th2 predominante con eosinofilia pulmonar persistente (Openshaw and Tregoning, 2005). Algunos estudios muestran que en pacientes con infección severa por HRSV se produce una activación predominante de linfocitos de tipo Th2 (Roman *et al.*, 1997), aunque otros autores

refieren que el INF- γ pudiera ser la citoquina predominante en pacientes con infecciones graves por HRSV (Welliver, 2000). Legg y colaboradores estudiaron el perfil de activación de citoquinas en pacientes con primoinfección por HRSV y compararon los niveles de las mismas entre sujetos con bronquiolitis y con infección respiratoria alta (IRAA). Estos autores encontraron diferencias significativas entre ambos grupos y señalaron mayor activación de citoquinas de tipo Th2 que de las relacionadas con respuesta Th1 en los pacientes que presentaron bronquiolitis, comparados con aquellos que sólo presentaron IRAA. Estos hallazgos sugieren que las manifestaciones clínicas de la infección por HRSV (bronquiolitis contra afección limitada a las vías aéreas superiores) se relacionan con el balance entre estas citoquinas (Legg *et al.*, 2003). Se desconoce si la tendencia al predominio de una respuesta sobre la otra es inducida por el HRSV, o se debe a una tendencia genéticamente determinada en ciertos sujetos. En relación con este último punto, se ha mostrado que sujetos con algunas variantes del receptor de citoquinas CCR5 podrían tener una mayor susceptibilidad a las infecciones por HRSV (Hull *et al.*, 2003). Otros autores han encontrado que la presencia de ciertos polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) en el *TLR4* se asocia significativamente con un mayor riesgo de desarrollar una infección severa por HRSV (Tal *et al.*, 2004; Awomoyi *et al.*, 2007).

La respuesta inmune humoral juega un papel importante, aunque no definitivo, en la protección contra infecciones por HRSV. Los niveles elevados de anticuerpos maternos contra HRSV transferidos prenatalmente tienen relación con cierta protección contra infecciones causadas por este virus en las primeras 5 a 6 semanas de vida, cuando el título de los mismos es máximo (Glezen *et al.*, 1981). Sin embargo, pasado este período tendrían un efecto negativo, ya que se ha propuesto que interfieren en el desarrollo de una adecuada respuesta de anticuerpos por parte del sistema inmune inmaduro de estos lactantes (Murphy *et al.*, 1986; Murphy *et al.*, 1988).

Numerosos estudios han demostrado que las glucoproteínas de superficie F y G (las cuales serán descritas extensamente en secciones posteriores) son las principales proteínas virales que desencadenan una respuesta de anticuerpos neutralizantes de larga duración anti-RSV, y que estos últimos son principalmente del tipo IgA (Connors *et al.*, 1991). Mas aún, se ha visto que el sistema inmune de los lactantes de 1 a 2 meses de edad reconoce a la glucoproteína G como el antígeno principal y es a ésta a la que está dirigida la respuesta inmune protectora más que a la glucoproteína F en este grupo etáreo (Wright *et al.*, 2000).

La aparición de inmunoglobulina secretoria del tipo IgA anti-RSV en secreciones nasales de lactantes está asociada a la disminución de la propagación del virus, mostrando el rol importante de la respuesta inmune local frente a la infección por HRSV (McIntosh *et al.*, 1978). También la inmunidad sérica contribuye en la protección contra la reinfección ya que se ha visto que los anticuerpos neutralizantes séricos anti-RSV persisten por más tiempo que las inmunoglobulinas secretorias del tipo IgA.

1.6. Diagnóstico de laboratorio de IRAB producida por HRSV

El diagnóstico diferencial de una IRAB causada por HRSV en lactantes y niños pequeños debe tomar en cuenta los virus de mayor impacto en esta población. Como se mencionó anteriormente estos virus son los PIV1-3, particularmente el virus de PIV3, HAdV y Flu A y B.

Las mejores muestras para realizar el diagnóstico directo son las secreciones nasofaríngeas obtenidas por aspiración, o los lavados o hisopados nasales (McCarthy and Hall, 1998). En la actualidad existen una variedad de métodos de laboratorio disponibles para diagnosticar la infección por HRSV en niños y adultos. En general, los niños tienen en sus secreciones títulos de HRSV mayores que los adultos, y en particular mayor que los inmunocomprometidos y los ancianos. Los cuatro métodos principales para el diagnóstico del HRSV son, i) detección de antígenos virales con anticuerpos monoclonales por inmunofluorescencia directa (IFD), indirecta (IFI) o enzimoimmunoensayo (ELISA), ii) cultivo viral en líneas celulares continuas, iii) detección de ARN viral por transcripción reversa seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y iv) serología.

El método más frecuentemente usado para el diagnóstico en lactantes es la IFI, debido a que su facilidad de uso y rapidez permiten dar un diagnóstico de HRSV rápido y consecuentemente esto permite tomar las medidas de aislamiento de los pacientes a tiempo para evitar la transmisión del virus. Aunque este método requiere de personal entrenado para la lectura de los resultados al microscopio de fluorescencia, una vez adquirida la experiencia necesaria constituye una técnica con una alta sensibilidad y especificidad (93-98% y 92-97%, respectivamente) para el caso del HRSV. No obstante la sensibilidad y especificidad varían de acuerdo al anticuerpo, al virus, la cepa a ser detectada, al título viral en el momento de toma de la muestra y a la adecuada obtención de la misma (Henrickson and Hall, 2007). El aislamiento viral en cultivo sigue siendo considerado la “técnica de oro” (del inglés “*Gold*

Standard”) para el diagnóstico, pero es muy laborioso, requiere tiempo y puede ser problemático ya que el virus es muy lábil a los procesos de congelamiento-descongelamiento a los que pueden ser sometidas las muestras clínicas. El efecto citopático característico del HRSV aparece de 3 a 7 días luego de la inoculación en las líneas celulares y a veces más, pero la detección puede acelerarse con el uso de la técnica de cultivo rápido en “*shell-vials*” (Johnston and Siegel, 1990; Waris *et al.*, 1992).

La RT-PCR es muy útil y ha demostrado ser una herramienta diagnóstica muy sensible tanto en los lactantes (Freymuth *et al.*, 1997) como en los adultos (Falsey *et al.*, 2006). Además esta técnica permite la realización de ensayos múltiples utilizando el formato de RT-PCR múltiple (RT-PCR *multiplex*), en el cual se pueden detectar varios virus simultáneamente (Fan *et al.*, 1998). En los últimos años los métodos de detección de este tipo de ensayos moleculares han evolucionado mucho, utilizando tanto la simple observación bajo luz UV de los fragmentos amplificados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, como novedosas formas de detección. Ejemplos de éstas son la hibridización enzimática, la detección en tiempo real utilizando sondas marcadas con distintos fluorocromos o colorantes intercalantes (*real time* RT-PCR), detección en formatos de microarreglos, etc. (Henrickson, 2004 y 2005; Henrickson *et al.*, 2007). A pesar de que estos ensayos son rápidos (3-4 horas) y muy sensibles, requieren costosos equipos que no están disponibles en todos los laboratorios de virología (Henrickson and Hall, 2007).

La serología puede ser útil para estudios retrospectivos de la infección en niños mayores y adultos. Un aumento en el título de anticuerpos en suero o saliva, medidos por neutralización o por ELISA, es un buen indicador de reinfección (Falsey *et al.*, 1990; Falsey *et al.*, 1996; La Montagne, 1997). Es menos útil para la investigación de la infección primaria en lactantes pequeños ya que el 10-30% de los pacientes con infección respiratoria documentada, son serológicamente negativos al momento de presentar los síntomas (Henrickson 2004). La detección de IgM anti HRSV puede ser utilizada para el diagnóstico en adultos (Dosel *et al.*, 1996).

1.7. Tratamiento

El tratamiento de la IRAB producida por HRSV, es principalmente de soporte incluyendo; remoción mecánica de las secreciones respiratorias, administración de oxígeno humidificado, broncodilatadores y en los casos más severos asistencia respiratoria mecánica (Rodríguez,

1999). Los corticoesteroides son comúnmente usados como terapia antiinflamatoria, aunque también es discutida su utilidad.

Actualmente, la única terapia antiviral disponible es la ribavirina (análogo de guanosina sintético). Este agente antiviral de amplio espectro ha sido aprobado para el uso en lactantes hospitalizados, a los que se les administra en forma aerosolizada. Su uso se ha asociado con un mejoramiento en la oxigenación, y una disminución de los niveles de mediadores de inflamación asociados con sibilancias y enfermedad severa (Chen *et al.*, 2008). No obstante el uso de ribavirina ha sido limitado debido a que es muy costoso y su utilidad continúa siendo controvertida (Anderson *et al.*, 1990). Se ha utilizado también en forma terapéutica y profiláctica en infecciones en pacientes inmunocomprometidos, mostrando resultados beneficiosos aunque no significativos estadísticamente, por lo que numerosos ensayos clínicos prospectivos continúan siendo evaluados (Torres *et al.*, 2007).

1.8. Profilaxis

1.8.1. Vacunas

Las diferentes estrategias empleadas en el diseño de vacunas han sido objeto de intensa investigación con respecto al HRSV. Éstas incluyen vacunas vivas recombinantes, atenuadas, de subunidades y de ADN (Teng and Collins, 1999; Teng *et al.*, 2000; Schimdt *et al.*, 2002). A excepción de la proteína L (polimerasa), todas las proteínas del HRSV fueron probadas para inmunogenicidad y protección (Connors *et al.*, 1991; Cherrie *et al.*, 1992; Brandenburg *et al.*, 2001). El primer intento de una vacuna consistió de un virus inactivado tratado con formalina, mezclado con hidróxido de aluminio y administrado vía intramuscular. Desafortunadamente, el uso de esta vacuna en los años '60 se asoció con una enfermedad más severa en niños infectados con la cepa circulante. Varios mecanismos se han propuesto como responsables de este fenómeno, entre ellos, inmunopotenciación de la infección y un desequilibrio de la relación Th1/Th2 con un sesgo hacia el perfil Th2 (Openshaw *et al.*, 2001; Plotnicky *et al.*, 2003; Haynes *et al.*, 2003; Kalina *et al.*, 2004, Delgado *et al.*, 2009). Por esa razón, la estrategia de diseñar vacunas inactivas se ha abandonado, y en la actualidad se prefiere experimentar con vacunas construidas a partir de virus vivos atenuados. Varias cepas atenuadas obtenidas a través de virus replicados a bajas temperaturas se han evaluado, algunas se encuentran en estudios clínicos de fase I con diferentes resultados (Karron *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 2000).

La estrategia llamada genética reversa, que consiste en hacer las mutaciones directamente sobre la secuencia del ARN genómico, ha ayudado en la búsqueda de una vacuna efectiva y segura. Así, se han construido cepas mutantes con proteínas delecionadas a partir de las cepas atenuadas sensibles a la temperatura (Δ SH, Δ NS1 y Δ NS2) (Karron *et al.*, 2005). Se espera que estas nuevas cepas entren rápidamente en ensayos clínicos.

También se han desarrollado vacunas basadas en subunidades. Varios estudios en fase I y II mostraron que la vacuna BBG2Na basada en la glucoproteína G resultó ser prometedora en cuanto a seguridad e inmunogenicidad, actualmente se encuentra en fase III (de Waal *et al.*, 2004).

1.8.2. Inmunoprofilaxis pasiva

La administración profiláctica de gammaglobulina hiperinmune anti-RSV (Respigam, MedImmune) o de una versión humanizada de un anticuerpo monoclonal contra la proteína F del HRSV (Palivizumab, MedImmune) protege individuos en alto riesgo de desarrollar infección contra el HRSV (Kimpen, 2002; Magno and Barik, 2004; Schimdt *et al.*, 2004). Desafortunadamente, la utilización del palivizumab es costosa y existe preocupación sobre la aparición de nuevas cepas virales resistentes debido a la naturaleza cuasiespecie de los virus con ARN como es el HRSV. Esta inquietud se hizo evidente cuando fueron generados tanto *in vitro* como *in vivo* virus resistentes al palivizumab que posteriormente mostraron resistencia a la profilaxis por esta formulación en un modelo animal (Zhao *et al.*, 2004; Zhao and Sullender, 2005). Afortunadamente, se han diseñado mediante mutagénesis iterativa nuevas variantes de Fab y de anticuerpos IgG, los cuales muestran una mejoría en cuanto a su capacidad de neutralizar el HRSV en un orden que va desde 44 hasta 1.500 veces sobre el Palivizumab (Wu *et al.*, 2005). Ésto parece resolver el problema sobre el desarrollo de resistencia mediante estrategias que involucren usar cada variante de anticuerpo de manera independiente o en combinación.

1.9. Aspectos específicos del RSV

1.9.1. El virus

1.9.1.1. Historia

EL RSV fue aislado por primera vez en 1955 a partir de las secreciones respiratorias de chimpancés que presentaban un cuadro respiratorio con estornudos, tos y alta producción de

moco. Los investigadores cultivaron esas secreciones nasales y recuperaron un virus que hasta ese momento nunca había sido identificado, lo llamaron agente de la coriza del Chimpancé (ACC), y lo relacionaron con la infección del tracto respiratorio alto que presentaban esos simios. Posteriormente lograron reproducir la enfermedad en otros chimpancés jóvenes, y aparentemente un investigador que trabajaba con los chimpancés enfermos se infectó con este agente. Cuando se realizaron ensayos al azar de vigilancia serológica en la población por fijación de complemento y neutralización, se encontró que algunos humanos habían estado en contacto en el pasado con el ACC (Morris *et al.*, 1956). Poco tiempo después en 1956, Chanock y sus colaboradores aislaron un virus semejante al ACC a partir de un lactante con bronconeumonía al cual llamaron “agente Long” y otro de un lactante con bronquiolitis al cual llamaron “Snyder”. Cuando se los caracterizó serológicamente y fenotípicamente ambos virus parecían ser el mismo ACC, particularmente en su capacidad de formar sincicios y células gigantes multinucleadas en líneas celulares epiteliales. Debido a esto se lo renombró como Virus Sincicial Respiratorio. A partir de ese momento se realizaron estudios de vigilancia serológica en niños y se encontró que para la edad de 3 a 4 años, casi el 80% de los niños poseía anticuerpos neutralizantes contra HRSV (Chanock *et al.*, 1957; Chanock and Finberg, 1957).

1.9.1.2. Clasificación y estructura

El HRSV pertenece al género *Pneumovirus*, subfamilia *Pneumovirinae*, familia *Paramyxoviridae*, orden *Mononegavirales* (genoma ARN no segmentado, cadena simple de polaridad negativa). Dentro de su género también se encuentran el RSV de bovinos (BRSV), de caprinos (CRSV), de ovinos (ORSV) y el virus de la neumonía murina (PVM), todos ellos muy relacionados con HRSV, los cuales son extensamente estudiados como posibles modelos animales de la infección.

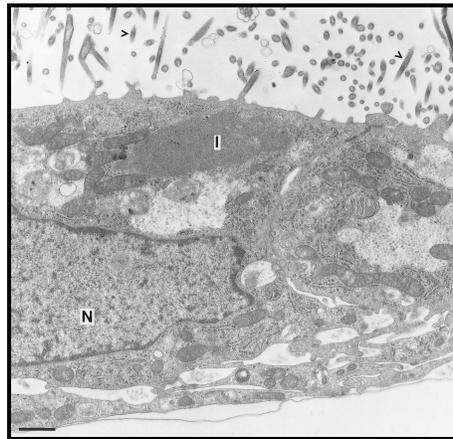
La subfamilia *Pneumovirinae* también incluye al género *Metapneumovirus*, el cual difiere de los *pneumovirus* con respecto al orden de los genes y a la ausencia de genes que se encargan de codificar las proteínas no estructurales. El género *Metapneumovirus* incluye a las especies recientemente descubiertas del metapneumovirus humano y del *pneumovirus* de las aves (van den Hoogen *et al.*, 2001).

El virión de RSV consiste en una nucleocápside recubierta de una membrana bilipídica. Al microscopio electrónico los viriones se ven esféricos irregulares, con un rango de diámetro entre 150-300 nm, también se observan formas filamentosas (Figura 1). Su genoma está

constituido por una copia simple de ARN, éste es lineal, no segmentado y de polaridad negativa.

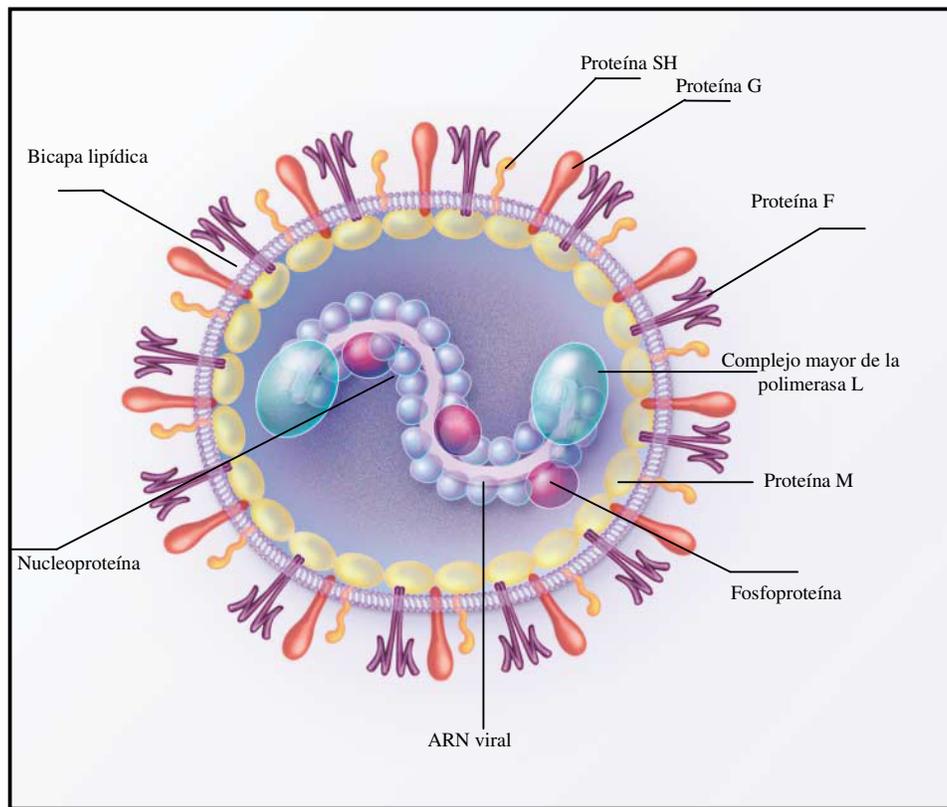
Figura 1. Microscopía electrónica de la liberación del RSV de la superficie apical de células polarizadas Vero C1008 (15750X).

Se observan viriones con formas esféricas y filamentosas brotando de la superficie celular (marcadas con >). N: núcleo, I: cuerpos de inclusión (Roberts *et al.*, 1995).



La cubierta consiste en una membrana bilipídica. Ésta contiene en su superficie tres glucoproteínas de transmembrana codificadas por el virus, la proteína de unión al receptor G, la proteína de fusión F y la pequeña proteína hidrófoba SH. Éstas están organizadas en espículas. Hay otra proteína que está asociada a la cara interna de la cubierta lipídica que es la M. Envuelta por la membrana se encuentra la nucleocápside, una hélice simétrica cuyo diámetro es de 15 nm. El RSV tiene cuatro proteínas empaquetadas en el virión formando parte de la nucleocápside; la nucleoproteína N, la fosfoproteína P, el factor de antiterminación M2-1 y el complejo mayor de la polimerasa L (Figura 2).

Figura 2. Estructura esquemática del virión del RSV (Hall, 2001).

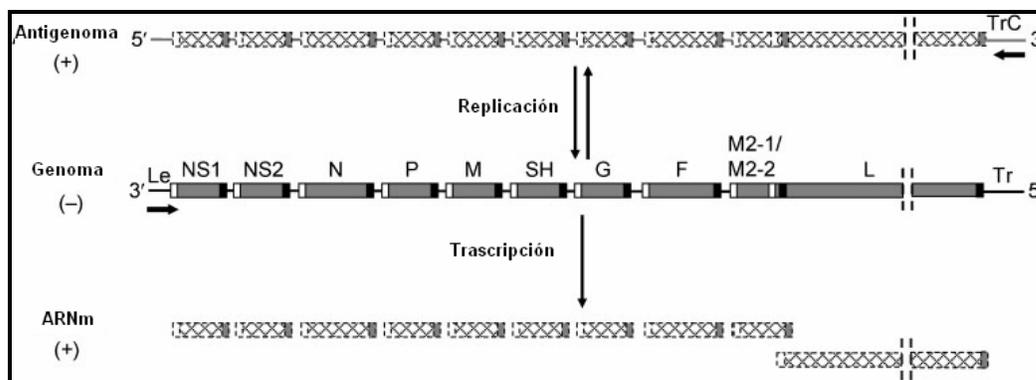


1.9.2. Genoma del RSV, ARNm y elementos actuantes en cis

Como se mencionó en la descripción general del virus, el genoma está compuesto por una única cadena de ARN no segmentado, de polaridad negativa de aproximadamente 15.200 nt de longitud (Collins *et al.*, 1995). Tanto el ARN genómico (polaridad negativa) como el antigenómico (polaridad positiva) están constantemente y fuertemente asociados a la proteína N para formar nucleocápsides que serán el sustrato para la polimerasa viral. Esta asociación le brinda beneficios al virus, ya que evita la formación de estructuras secundarias en el ARN, obviando la necesidad de tener una actividad helicasa necesaria para su transcripción y replicación. Además lo protege del ataque de nucleasas (ARNasas) y de la formación de ARN doble cadena, el cual provocaría una respuesta antiviral principalmente del tipo Th1 mediada por IFN (Le Mercier *et al.*, 2002). Los mismos no están poliadenilados ni tienen caperuza (cap). En el extremo 3' y 5' del ARN genómico se encuentran regiones extragénicas: una secuencia líder (Le) de 44 nt de longitud y una secuencia tráiler (Tr) de 155 nt, respectivamente (Figura 3) (Collins *et al.*, 1991; Mink *et al.*, 1991). Hay un sólo promotor de la transcripción que se encuentra en el extremo 3' del genoma e incluye secuencias del Le

(Dickens *et al.*, 1984; Collins *et al.*, 1991). El orden de los genes en sentido 3'→5' en el genoma es -NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2, L- (Figura 3).

Figura 3. Representación esquemática del genoma, antigenoma y ARNm de RSV (Cowton *et al.*, 2006).



El 90% de los ARNs constituyen marcos abiertos de lectura que codifican para las 11 proteínas virales y menos del 3% constituyen señales que actúan en *cis*. El genoma de RSV codifica para diez ARNms subgenómicos, cada uno contiene un sólo marco abierto de lectura excepto el ARNm del gen M2 que contiene dos, M2-1 y M2-2. Estos ARNms tienen una caperuza (cap) en el extremo 5' de 7-metilguanósina y están poliadenilados en el extremo 3', ambas modificaciones son mediadas por la polimerasa viral (Barik, 1993). Cada gen comienza con una señal de iniciación (GS) de diez nucleótidos. La síntesis de cada ARNm se inicia en el primer nucleótido de la señal. Cada gen termina con una señal de terminación (GE) que dirige la poliadenilación y la liberación del ARNm completo (Kuo *et al.*, 1996; Kuo *et al.*, 1997). Tanto la señal de iniciación como la de terminación son independientes de la naturaleza de la secuencia adyacente (Burkereyev *et al.*, 1996). Los primeros nueve genes de RSV están separados por regiones intergénicas que comprenden entre 1 y 56 nucleótidos de longitud. Los últimos dos genes M2 y L se superponen en 68 nucleótidos. De esta forma la señal de iniciación de L se ubica dentro del gen M2.

1.9.3. Proteínas

1.9.3.1. Proteínas no estructurales

Proteínas NS1 y NS2

Estas proteínas se encuentran codificadas por los dos primeros genes (Figura 3). Son consideradas no estructurales ya que se las encuentra sólo en trazas en preparaciones de

viriones purificados, no obstante ambos genes están expresados en células infectadas. La estructura primaria de ambas proteínas posee 139 y 124 aminoácidos, respectivamente. A pesar de que tienen una longitud similar en aminoácidos, no existe una homología importante entre las mismas (Johnson and Collins, 1989). Su ausencia en el virión infectivo sugiere que no serían esenciales para la transcripción viral primaria. Estas proteínas subvierten la respuesta celular de IFN, reduciendo la expresión de los genes del mismo. El mecanismo por el cual se produce este efecto sería mediante la acción cooperativa de ambas para suprimir la activación y la traslocación nuclear del factor de regulación del IFN, IRF-3 (Spann *et al.*, 2005). Los últimos estudios sugieren que inhiben la cascada de señalización del IFN tipo 1 vía la degradación dependiente del proteasoma del factor de transducción de señales y activador de la transcripción 2 (Stat2) (Lo *et al.*, 2005; Ramaswamy *et al.*, 2006). Recientemente se demostró que la expresión temprana de estas proteínas aumentaría la replicación viral, mediante el retraso de la muerte celular programada (apoptosis) (Monick *et al.*, 2005; Bitko *et al.*, 2007).

1.9.3.2. Proteínas de la nucleocápside

Proteínas N, P y L

Son las proteínas necesarias y suficientes para la replicación del ARN, guían la transcripción, aunque se requiere la proteína M2-1 para garantizar la procesividad total.

Proteína N

Esta proteína consta de 391 aminoácidos. Se asocia al ARN genómico y antigenómico para formar una nucleocápside resistente a las ARNasas y así servir de molde para la síntesis del ARN viral. La proteína N sola soluble (sin la asociación con la proteína P) se agrega y no puede encapsidar ARN. La coexpresión intracelular de N y P resulta en la formación del complejo N-P. Esta interacción promueve el plegamiento correcto de la proteína N y la encapsidación específica del genoma (García-Barreno *et al.*, 1996).

También, se cree que la disponibilidad de la proteína N soluble regularía la replicación del ARN viral (Fearnly *et al.*, 1997).

Proteína P

Esta proteína consta de 241 aminoácidos. En los viriones se encuentra principalmente en su forma fosforilada, forma en la que es funcional (Dupuy *et al.*, 1999). Los últimos seis aminoácidos del extremo C-terminal han sido identificados como el principal dominio de unión a la proteína N (Slack and Easton, 1998). No obstante, hay evidencia de que otras regiones de la proteína P estarían también involucradas en la formación del complejo N-P.

Como se mencionó anteriormente, la interacción N-P promueve el correcto plegamiento de N y la encapsidación del ARN por parte de esta última. Por analogía con la proteína P de otros paramyxovirus, probablemente actuaría como un cofactor que sirve tanto para estabilizar la polimerasa L, como para localizar el complejo de la polimerasa en el molde N: ARN, para su posterior replicación (Horikami *et al.*, 1992).

Proteína M2

El ARN mensajero de M2 tiene dos marcos de lectura abiertos (Collins *et al.*, 1990):

- M2-1: marco 5' proximal (nt 10-594). Posee 194 aminoácidos.
- M2-2: marco río abajo del de M2-1 (nt 563-835), el cual se solapa con los primeros nucleótidos de M2-1. Posee 90 aminoácidos.

M2-1

Tiene la función de factor antiterminación de la transcripción que es esencial para la viabilidad viral, garantizando la procesividad de la transcripción. Se une a la proteína N y se la encuentra intracelularmente en cuerpos de inclusión colocalizándose con las proteínas N y P. Asimismo, incrementa la frecuencia de la lectura a través de las señales de terminación de la transcripción en los extremos de los diferentes genes (Fearn and Collins, 1999; Hardy *et al.*, 1999).

M2-2

El marco de lectura de M2-2 es expresado por un mecanismo inusual de traducción secuencial de terminación-reiniciación. Los ribosomas que traducen el primer marco de lectura abierto de M2-1 se mueven una pequeña distancia río arriba del codón de terminación y reinician la traducción del segundo marco de lectura superpuesto de M2-1 (Ahmadian *et al.*, 2000). La concentración de M2-2 en células infectadas es baja pero se va incrementando en el tiempo en el transcurso de la infección.

Esta proteína es un factor regulatorio de la síntesis de ARN, disminuyendo la transcripción y favoreciendo la replicación (Bermingham and Collins, 1999). Posiblemente la inhibición de la transcripción sea mediante la depleción de ARNs nacientes en el genoma en preparación para el empaquetamiento viral. No obstante se demostró que la sobreexpresión de esta proteína inhibía la replicación viral (Cheng *et al.*, 2005).

Proteína L

Subunidad mayor del complejo de la polimerasa. Está formada por 2.165 aminoácidos y su secuencia contiene seis segmentos discretos que tienen residuos altamente conservados y presumiblemente representan motivos de actividad ARN polimerasa ARN dependiente (Stec *et al.*, 1991).

La proteína L, junto con las proteínas N, P y M2-1 unidas al ARN viral, forman el complejo de la ribonucleoproteína, el cual es capaz de iniciar y sintetizar tanto ARN genómico de polaridad positiva y negativa (actividad replicasa), como también ARNs subgenómicos (actividad transcriptasa).

1.9.3.3. Proteína de matriz

Proteína M:

Es una proteína interna del virión no glucosilada, posee 256 aminoácidos y es básica. Es la proteína más abundante en el virión. Tiene un dominio hidrofóbico en la mitad C-terminal de la molécula que podría mediar la interacción con la membrana lipídica, con la que está asociada periféricamente (no es una proteína intrínseca). Se considera la organizadora central de la morfogénesis viral, interactuando con las colas citoplasmáticas de las proteínas de la membrana lipídica G y F y las nucleocápsides (Teng and Collins, 1998; Henderson *et al.*, 2002; Ghildyal *et al.*, 2005). Además actúa como factor de inhibición de la transcripción viral previo a la encapsidación (Ghildyal *et al.*, 2002).

1.9.3.4. Proteínas de superficie

Proteína pequeña hidrofóbica, SH:

Es una glucoproteína integral de membrana tipo II. Posee 64-65 aminoácidos. Se expresa en la membrana plasmática de las células infectadas y en los viriones. Está anclada a la

membrana mediante una secuencia hidrofóbica (aminoácidos 14-41) con el C-terminal orientado extracelularmente (Collins and Mottet, 1993).

No se conoce exactamente la función de esta proteína, pero algunos estudios proponen que podría participar en la fusión viral (Techarpornkul *et al.*, 2001), o en el cambio de la permeabilidad de la membrana (como la proteína M2 de influenza A) (Perez *et al.*, 1997). No obstante, los virus que carecen de la proteína SH (RSV- Δ SH) son viables en cultivo y forman sincicios, indicando que esta proteína no es imprescindible ni para la entrada del virus a la célula huésped ni para la formación de sincicios (Techarpornkul *et al.*, 2001). Por otro lado, estos virus (RSV- Δ SH) son atenuados en animales, demostrando que esta proteína jugaría un rol importante en la patogénesis viral. Los últimos estudios han informado que actuaría en el bloqueo de la apoptosis de las células infectadas, aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual se produciría este efecto (Fuentes *et al.*, 2007).

Proteína de fusión F:

Es una glucoproteína integral de membrana de tipo I, que consta de 574 aminoácidos. La proteína F se sintetiza como un precursor inactivo F₀, un polipéptido simple N-glucosilado cotraduccionalmente en el retículo endoplásmico. Luego, en un proceso postraduccional, durante su transporte a la superficie celular, es cortado por proteasas celulares del tipo furinas en dos sitios multibásicos, generando dos polipéptidos unidos por puentes disulfuro, uno es F2 proveniente del extremo N-terminal y el otro F1 correspondiente al extremo C-terminal (Collins and Mottet, 1991). Hay tres secuencias hidrofóbicas en el polipéptido F. La primera secuencia corresponde al péptido señal para la traslocación al retículo endoplásmico, ubicada en el extremo N-terminal de la cadena F2. La segunda región es el dominio transmembrana, localizado cerca del extremo C-terminal de F1. Y la tercera ubicada en el extremo N-terminal de la cadena F1 se denomina péptido de fusión, debido a que por analogía con péptidos de fusión de otros virus, se supone que se inserta en la membrana de la célula blanco durante el proceso de fusión. La proteína F madura es un homotrímero en el cual repeticiones de a siete, HRA y HRB (del inglés *heptad repeats*, HRA y HRB), se encuentran adyacentes al péptido de fusión y a la región transmembrana de cada monómero, respectivamente.

La proteína F puede mediar la entrada y la formación de sincicios independientemente de las otras proteínas de membrana de RSV (G y SH), ya que su sola expresión en virus SV40 recombinante lo indujo a formar sincicios y le dio la habilidad de penetrar en las células por

fusión con la superficie de las mismas (Kahn *et al.*, 1999). Aunque se demostró que G y SH incrementan la eficiencia de este proceso (Hemminway *et al.*, 1994).

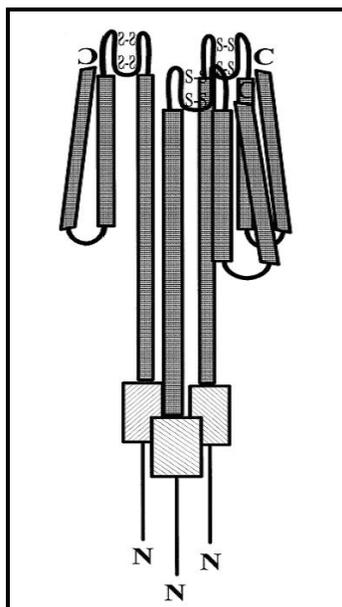
La proteína F sería la responsable de la especificidad celular del HRSV, en lugar de la G, como fue demostrado en un estudio en el que se determinó más precisamente que la subunidad F2 es la implicada en la especificidad (Schendler *et al.*, 2003).

La proteína F junto con la proteína G, descrita a continuación, constituyen los principales antígenos que inducen anticuerpos neutralizantes, debido a que anticuerpos dirigidos contra estas proteínas neutralizan la infectividad viral (Olmsted *et al.*, 1986). No obstante, los escasos estudios que se han realizado sobre la variabilidad genética de la misma, han demostrado que es altamente conservada, siendo la subunidad F2 la más divergente entre los distintos grupos antigénicos (Johnson and Collins, 1988; Kim *et al.*, 2007). Esta observación podría deberse a severas restricciones sobre su relación estructura-función. Asimismo, la antigenicidad e inmunogenicidad de esta proteína son altamente dependientes de su estructura plegada, como se demostró en ensayos con virus mutantes de escape inducidos con anticuerpos monoclonales en el curso de los estudios de la estructura antigénica (López *et al.*, 1998).

Proteína de unión G:

La proteína G es la principal proteína de unión al receptor del RSV (Levine *et al.*, 1987). Es una glucoproteína integral de membrana tipo II, con un único dominio hidrofóbico cerca del extremo N-terminal, que sirve tanto de péptido señal como de anclaje a la membrana (TM). El gen posee 923 nucleótidos que codifican para 289-299 aminoácidos (dependiendo del grupo antigénico). Este tamaño es la mitad del de las proteínas HN y H de otros paramyxovirus (572-617 aa), careciendo de similitud tanto de secuencia y estructura (no globular, debido al alto porcentaje de residuos de prolina), como de función (ausencia de actividad hemaglutinina y neuraminidasa). En la Figura 4 se muestra un esquema propuesto de la estructura tridimensional de esta proteína.

Figura 4. Representación esquemática del modelo de estructura tridimensional de la glucoproteína G (Melero, 1997).



La proteína G es sintetizada en una forma secretoria (Gs) que surge de la iniciación de la traducción en el segundo codón AUG del marco de lectura (aminoácido 48, localizado en la mitad del dominio hidrofóbico), seguido de la separación proteolítica del dominio de anclaje/señal (Roberts *et al.*, 1994). La función de esta forma secretoria podría ser la de señuelo para los anticuerpos neutralizantes específicos y así constituir un mecanismo de evasión de la respuesta inmune humoral anti-RSV.

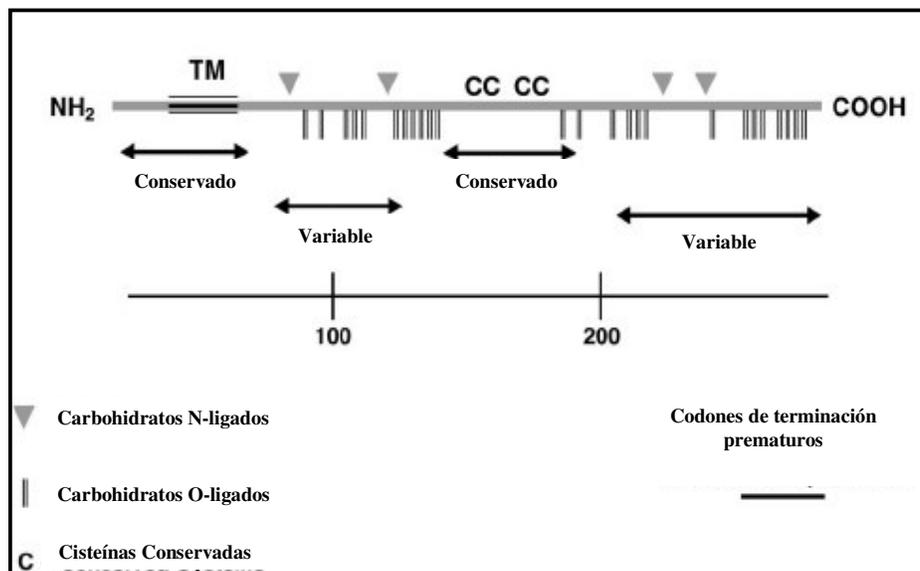
El peso molecular de la proteína G sin procesar es de 32,587 kDa, mientras que luego del procesamiento post-traducciona l pasa a tener un peso molecular de 90 kDa. Este gran cambio es producto de la modificación con hidratos de carbono, una de sus características distintivas (Wertz *et al.*, 1989). La mayoría de los residuos glucídicos en la proteína G son azúcares O-ligados; hay más de 70 aminoácidos serinas y treoninas en su secuencia como potenciales aceptores de los mismos. Estudios con proteínas quiméricas F-G mostraron que hay 23-25 cadenas laterales de monosacáridos *N*-acetilgalactosamina o disacáridos galactosa-b-1-3-*N*-acetilgalactosamina (Wathen *et al.*, 1991). La Figura 5 muestra un diagrama de la estructura primaria de la proteína G en la que se marca la posición de los residuos de treonina y serina que son posibles aceptores de azúcares O-ligados. El número de sitios potenciales aceptores de azúcares N-ligados puede diferir entre diferentes aislamientos de HRSV, desde cuatro en la

cepa patrón A2 a ocho en la cepa patrón Long/56. Estos sitios de glucosilación N- y O-ligados se encuentran agrupados en dos regiones de la proteína G (ver Figura 5). En conjunto, la composición de aminoácidos en serina y prolina y el alto contenido de azúcares O-ligados, son características que la hacen semejante a las mucinas. Éstas son glucoproteínas del huésped que forman una barrera protectora en los tractos respiratorio, gastrointestinal y reproductivo.

Los dominios “similares a mucinas” constituyen la mayor parte del ectodominio de la proteína G y son altamente divergentes en su secuencia de aminoácidos entre los grupos antigénicos y los aislamientos individuales. Esta especie de cobertura heterogénea de azúcares sobre la proteína G, actuaría como protección para el reconocimiento del sistema inmune. Por otro lado, hay una región que abarca 13 aminoácidos, entre las posiciones 164-176, que se encuentra exactamente conservada entre todos los RSV humanos, y que se extiende desde los aminoácidos 163 al 189 cuando se consideran sólo los HRSV subtipo A. La misma está localizada hacia la mitad del ectodominio (Figura 5). Esta región es relativamente carente de sitios aceptores de azúcares y contiene 4 residuos de cisteína (Cys) (posiciones 173, 176, 182 y 186) que forman dos puentes disulfuro Cys 173-Cys186 y Cys176-Cys182, formando un lazo de cistinas (Gorman *et al.*, 1997; Langedijk *et al.*, 1998) (Figura 4). Esta región altamente conservada se ha postulado como posible sitio de unión al receptor celular, aunque aún no se ha descrito un receptor específico que reconozca a la proteína G. Sin embargo, se ha demostrado que el segmento que va desde los aminoácidos 184 al 198, que se superpone con la región rica en Cys, es un dominio de unión a heparina (HBD). *In vivo*, la heparina está primariamente localizada en los gránulos de los mastocitos y basófilos. No obstante, los glucosaminoglicanos celulares similares a heparina altamente sulfatados (GAGs), sus homólogos celulares asociados a la membrana, se encuentran en la superficie de la mayoría los tipos celulares de los mamíferos y también en la matriz extracelular. Éstos consisten en una población heterogénea de moléculas que difieren en longitud de la cadena, composición de ácido hexurónico, y grado de sulfatación (Gallagher *et al.*, 1986). El RSV utilizaría estos compuestos para mediar la unión y la infección a la célula huésped (tropismo). Dada la heterogeneidad de los GAGs y su variada expresión en diferentes tipos celulares, es posible que su interacción con los HBDs de la proteína G de RSV pueda influenciar el tropismo y la virulencia del virus. Por lo tanto, aun cuando la proteína G no es necesaria para la infectividad, le podría conferir al RSV una ventaja selectiva, permitiéndole diseminarse y fácilmente unirse a las células vecinas (Feldman *et al.*, 1999).

Figura 5. Representación de la estructura primaria de la glucoproteína G.

Se indican las regiones variables y conservadas. Los sitios potenciales de O- y N-glucosilación se indican en forma esquemática. También se marcan las posiciones de las cuatro Cys conservadas y regiones en las que se ha informado la existencia de codones de terminación prematuros. TM: región transmembrana (Wertz and Moudy, 2004).



Extraordinariamente, parece que la proteína G no es esencial para el ensamblado del virus, ni para el crecimiento en cultivos celulares ni animales, pero como fue mencionado anteriormente, le confiere una ventaja. Se han obtenido espontáneamente virus que poseían una delección de las proteínas SH y G y aún se replicaban en células VERO (Karron *et al.*, 1997). Ésto sugiere que el RSV tiene un mecanismo alternativo de unión a las células, independiente de la proteína G, probablemente mediada por la proteína F (ver en descripción de proteína F) (Burkeryev *et al.*, 2002; Teng and Collins, 2002).

Entre las proteínas de HRSV, la G sobresale por tener un alto grado de diversidad antigénica y de secuencia entre las distintas cepas. La diversidad reside principalmente en el ectodominio, el cual tiene sólo el 44% de identidad de aminoácidos entre los dos subtipos de HRSV A y B, contra el 83% para el dominio transmembrana y citoplasmático. La gran diversidad en la secuencia de aminoácidos mencionada se encuentra en dos regiones variables (RV) localizadas a ambos lados del dominio central rico en Cys (Figura 5). La posición en la secuencia de los aminoácidos aceptores de azúcares O- y N-ligados también es poco conservada, aunque la ubicación de los azúcares O-ligados es similar entre cepas. La localización de las prolínas está moderadamente conservada, y el patrón general de hidrofobicidad está muy bien conservado, sugiriendo un mantenimiento general de la

organización de la proteína entre aislamientos (Johnson *et al.*, 1987). El mapa antigénico de la proteína G fue determinado por análisis de secuencia de mutantes de escape resistentes a anticuerpos monoclonales murinos o por reactividad con péptidos sintéticos contra anticuerpos monoclonales (Martínez *et al.*, 1997). A partir de este análisis se han descrito cuatro tipos de mutaciones en HRSV: mutaciones puntuales (específicas de grupo y cepa), codones de finalización prematuros a partir de la posición 257 de la secuencia de aminoácidos (específicos de cepa), hipermutaciones (múltiples transiciones A→G), y cambios en el marco de lectura (se seleccionaron mutantes con cambios en el marco de lectura en epitopes conservados y también cepa específicos). Recientemente se describieron en nuestro país tres aislamientos de HRSV subtipo B con una duplicación de 60 nucleótidos en la 2° región variable (Trento *et al.*, 2003). Un evento genético de esta magnitud nunca antes había sido descrito para el HRSV, de todos modos su real contribución a la epidemiología de este virus aún no ha sido determinada.

Los cambios descritos en su secuencia muestran que sobre la glucoproteína G operaría cierta presión de selección, observada a través de cambios antigénicos que llevan a generar nuevas variantes virales (Cane and Pringle, 1995). Estas últimas jugarían un rol importante en la habilidad del HRSV de causar reinfecciones a lo largo de la vida. De esta manera, la alta variabilidad de G, generada como consecuencia de la presión de selección que actuaría sobre la misma, la hace la proteína de elección a estudiar cuando se desean realizar análisis sobre epidemiología molecular y evolución del HRSV y a la hora de pensar en el desarrollo de una vacuna eficaz contra este virus.

1.9.4. Ciclo replicativo

1.9.4.1. Fijación y entrada

El ciclo comienza con la fijación del virus a la célula. La proteína G se une a GAGs de la superficie celular que contienen el disacárido heparan-sulfato y condroitin sulfato B. No está claro aún si la interacción entre la proteína G y los GAGs celulares es el paso de fijación o contacto inicial y luego es seguido por un segundo paso de unión involucrando una o más de las tres proteínas superficiales de RSV, pues como fue mencionado anteriormente, los virus RSV-ΔG pueden completar el ciclo replicativo. En estos virus, la proteína F podría mediar la fijación o un paso alternativo o posterior a la misma. De todas maneras, a pesar de que la

glucoproteína G es prescindible *in vitro*, es claramente importante para una infección eficiente *in vivo*.

Luego de la fijación, el RSV entra a la célula por fusión de la membrana plasmática con la cubierta viral mediada por la proteína F (Srinivasakumar *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 2000). A pesar de que en cultivo celular la iniciación de la fusión es un paso lento, una vez que comienza se convierte en un proceso rápido (Bachi, 1998). De esta manera, se libera la nucleocápside al citoplasma celular. Posteriormente, todos los eventos del ciclo replicativo de RSV ocurren en el citoplasma, sin intervención del núcleo.

1.9.4.2. Síntesis de ARN y regulación

Una vez en el citoplasma, comienza la transcripción del genoma por medio de la ARN polimerasa viral ARN dependiente que forma parte de la nucleocápside. Durante este proceso, la polimerasa inicia la síntesis de ARN en el promotor que se encuentra en el extremo 3' del genoma y luego continúa a lo largo de la cadena. Cuando alcanza una señal de terminación GE, la polimerasa poliadenila al ARNm naciente y lo libera. Luego reinicia la síntesis de ARN en la próxima señal de iniciación GS, donde encapucha (cap) y metila el extremo 5' del próximo ARNm. Respondiendo, de esta manera, a las señales de terminación e iniciación la polimerasa es capaz de generar los ARNms subgenómicos. La ARN polimerasa tiene tendencia a disociarse del ARN molde en las regiones intergénicas, y debido a que ésta sólo puede iniciar la transcripción en el extremo 3' del genoma, se produce un gradiente de expresión de los genes, con una mayor frecuencia de transcripción de los genes ubicados en el extremo 3' del genoma con respecto a los del extremo 5' (Collins and Wertz, 1983; Kuo *et al.*, 1996; Hardy and Wertz, 1998; Krempf *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2005). De acuerdo con esta estrategia de expresión de genes, el genoma viral ha evolucionado de manera tal que las proteínas que son requeridas en altas cantidades, tales como aquellas que debilitan mecanismos de la respuesta inmune innata (NS1 y NS2), están ubicadas en el extremo 3' del genoma, mientras que las proteínas que son necesarias en pequeñas cantidades, como la polimerasa L, son expresadas a partir de extremo 5'. Éste es el principal mecanismo de control de expresión de genes en RSV (Cowton *et al.*, 2006). Además, la proteína M2-1 puede reducir el gradiente de transcripción en una forma dependiente de su concentración, incrementando la eficiencia de la expresión de los genes más cercanos al extremo 5'. Ésto podría deberse a su rol en la promoción de la procesividad de la transcripción, así como al incremento de la transcripción a través de las uniones entre los genes (Hardy and Wertz, 1998;

Fearn and Collins, 1999; Hardy *et al.*, 1999). No obstante, no está claro si esta posible regulación ocurre durante la infección del virus.

La síntesis de ARN genómico y antígenómico es dependiente de la síntesis de proteínas que ocurre simultáneamente, probablemente reflejando la necesidad de la encapsidación cosintética. Para los *paramyxovirus* y los *rabdovirus*, se piensa que la encapsidación que se produce al mismo tiempo que se está sintetizando el genoma, media el cambio entre transcripción y replicación del ARN. Por lo tanto, se supone que la concentración de M2-2 intracelular media el cambio entre la transcripción y la replicación del ARN. Cuando la concentración de M2-2 es baja, en el comienzo de la infección, la transcripción ocurre a una alta tasa. A medida que el nivel de M2-2 aumenta, la transcripción es inhibida y la replicación es favorecida. Ésto sería consistente con los requerimientos para la formación de viriones: en el período temprano de la infección la transcripción provee altos niveles de ARNs virales que son estables y son traducidos a proteínas, luego el cambio a la replicación provee de una progenie de genomas que serán empaquetados por las proteínas para formar los viriones maduros.

Para replicar el genoma, la polimerasa se une al promotor en la región líder (Le, ver Figura 3) e inicia la síntesis del ARN en el extremo 3'. En este caso la polimerasa se mueve a lo largo del templado pero no responde a las señales actuantes en cis, GS y GE y así genera el antígenoma, una cadena completa de ARN complementario de polaridad positiva. En el extremo 3' del antígenoma se encuentra la secuencia complementaria al tráiler (TrC, ver Figura 3), la cual contiene un promotor. La polimerasa utiliza este promotor para generar ARN genómico a partir del molde de polaridad positiva. A diferencia del ARNm, el cual es liberado desnudo de la polimerasa, tanto el ARN genómico como el antígenómico son encapsidados por la nucleoproteína viral N al mismo tiempo en el que están siendo sintetizados y esta encapsidación simultánea probablemente sea la causa por la que la polimerasa eluda a las señales de terminación GE durante el proceso de replicación (Cowton *et al.*, 2006).

Los ARNs y las proteínas de RSV pueden ser detectados por primera vez intracelularmente dentro de las 4 a 6 h de comenzada la infección, la síntesis de ARNs alcanza un pico aproximadamente a las 12 a 16 h post infección y luego los niveles caen, mientras que la síntesis de proteínas alcanza un pico a las 18 a 20 h. La progenie viral puede ser detectada a las 8 a 10 h y alcanzar un pico a las 24 h post infección. El RSV tiene poco efecto sobre la

síntesis de macromoléculas de la célula infectada: la síntesis de ADN y ARN celular disminuye luego de 11 h de la infección y es reducida a la mitad luego de 18 h post infección, mientras que la síntesis de proteínas no está afectada (Levine *et al.*, 1977).

1.9.4.3. Morfogénesis viral

Se cree que la maduración de los viriones de RSV ocurre dentro de regiones circunscriptas sobre la superficie de las células infectadas, microdominios lipídicos conocidos como “balsas lipídicas” (en inglés *lipids rafts*) (ricos en colesterol, esfingolípidos y proteínas aciladas), en los cuales se asocian las glucoproteínas de transmembrana conformacionalmente maduras G, F y SH (Brown *et al.*, 2002; McCurdy and Graham, 2003). Se supone que esta asociación está facilitada por la interacción entre los dominios citoplasmáticos de las glucoproteínas y la proteína M. Ésto está respaldado por la observación de que la proteína M se asocia sola con membranas celulares y que esa asociación se ve modificada en presencia de F (Henderson *et al.*, 2002). Por otro lado, la interacción entre M y G involucra los seis primeros aminoácidos del dominio citoplasmático de G. Es posible que M interactúe en forma independiente con G y F, y aunque la interacción con una glucoproteína es esencial para el ensamble viral, cualquiera de las dos por sí solas serían suficientes (Ghildyal *et al.*, 2005).

Los viriones nacientes pueden también ser observados en ocasiones fusionándose con la membrana de la célula huésped nuevamente. También se ha informado la brotación de viriones a través de vesículas intracelulares (Arslanagic *et al.*, 1996).

Como se mencionó en cada una de las descripciones de las glucoproteínas, los estudios con virus Δ SH y Δ G, indicaron que F es la única proteína de cubierta viral requerida para la formación eficiente de viriones (Burke *et al.*, 1998).

Ciertos trabajos han demostrado que la dirección selectiva de la proteína F y otras proteínas de RSV a los microdominios de la membrana celular puede desencadenar eventos que lleven a la formación de proyecciones microvellosas y la subsecuente liberación a partir de estos microdominios de viriones filamentosos (Brown *et al.*, 2002). A su vez se ha demostrado que la proteína celular RhoA, una GTPasa pequeña que influencia la formación de filamentos de actina y de proyecciones microvellosas en la célula, interactúa con la proteína F de RSV y ambas se cositúan en estos microdominios lipídicos. Es posible que esta interacción participe en el proceso de brotado de RSV a partir de la membrana celular (McCurdy and Graham, 2003).

La alteración de los filamentos celulares de actina reduce drásticamente la producción de virus infecciosos, implicando un rol importante del citoesqueleto en el ensamblado de los viriones (Burke *et al.*, 1998). Por otro lado se demostró que el brotado de los virus en forma dirigida por la superficie apical de células polarizadas requiere que el RSV use una vía de tráfico celular de proteínas eficiente como la vía de reciclado endosomal apical de proteínas (Brock *et al.*, 2003). No existe discriminación en el empaquetamiento en relación a encapsidar ARN antigénico o genómico, ya que el primero es 10 a 20 veces menos abundante intracelularmente que el ARN genómico y los dos están presentes en esa misma proporción.

De esta manera se produce la progenie viral que se liberará de la superficie apical de las células del epitelio respiratorio, y se diseminará a las células vecinas para continuar con la infección.

1.10. Grupos antigénicos, diversidad y evolución del HRSV

El HRSV existe como un solo serotipo pero tiene dos subtipos antigénicos A y B. Este dimorfismo antigénico entre cepas fue descubierto inicialmente por una diferencia de tres o cuatro veces en el título neutralizante entre las cepas A2 y CH18537/63, las cuales ahora representan a los dos grupos antigénicos A y B, respectivamente (Coates *et al.*, 1966). Por otro lado, por estudios de respuesta policlonal postinfección utilizando ELISAs con glucoproteínas F y G purificadas, se demostró, que los dos subtipos están relacionados antigénicamente en su totalidad en un 25% considerando ambas proteínas; en un 50% si se considera sólo la F y entre el 1-7% si se considera sólo la G (Johnson *et al.*, 1987). Posteriormente se utilizaron diferentes paneles de anticuerpos monoclonales (AcMos) dirigidos contra las proteínas P, F y G, para clasificar a los aislamientos de HRSV en los dos subtipos (Anderson *et al.*, 1985; Mufson *et al.*, 1985), los cuales correlacionaron con dos grupos genéticamente distintos (Cristina *et al.*, 1990). La identidad en nucleótidos del genoma completo entre las cepas A y B es del 81% (Johnson *et al.*, 1987). Para el caso de las diferentes proteínas por separado, existen variaciones considerables en el grado de divergencia de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas. La mayor diferencia se encuentra en los ectodominios de las glucoproteínas G y SH, las cuales tienen sólo un 44 y un 50% de identidad de secuencia entre los dos subtipos, respectivamente. Los porcentajes de divergencia en nucleótidos (nt) y aminoácidos (aa) para cada proteína se muestran en la Tabla I. La naturaleza global de las diferencias de secuencia indica que los dos subtipos representan

dos líneas de evolución divergentes, más que variantes que difieren sólo en unos pocos sitios antigénicos principales.

Tabla I. Divergencia entre las secuencias de nt y aa de los genes de las distintas proteínas del HRSV entre cepas prototipo del subtipo A (A2) y subtipo B (CH18537/63) (Sullender, 2000).

Proteína	Divergencia nt (%)	Divergencia aa (%)
G	33	47
SH	28	24
NS1	22	13
F	21	11
M2	22	8
NS2	22	8
N	14	4

Dentro de los dos subtipos, el porcentaje de identidad de nucleótidos y aminoácidos entre los diferentes virus es más alto que entre subtipos, pero sigue el mismo patrón con respecto a las regiones de mayor o menor divergencia (Sullender, 2000).

Como se mencionó previamente la relación entre subtipos en regiones antigénicas protectoras para la proteína F no es de gran alcance en comparación con la proteína G. Es probable que este menor grado de variabilidad tenga que ver con la función de F (permitir la fusión de membranas) y que su plegamiento y procesamiento sean más sensibles a las sustituciones de aminoácidos, mientras que la proteína G las toleraría mejor en su estructura (Anderson *et al.*, 1992). No obstante, un grupo de Corea realizó un trabajo en el que analizó la variabilidad nucleotídica y aminoacídica de la proteína F de aislamientos de HRSV durante nueve períodos epidémicos y lo relacionó con la variabilidad de la proteína G. Encontraron que a pesar de que el gen de la proteína F es más conservado que el de la G (96-99,9% de identidad entre todos genes de la F en los aislamientos de HRSV analizados), geográficamente y temporalmente existe evidencia de que este gen está evolucionando continuamente bajo presión selectiva. Adicionalmente, describieron dos regiones variables en la proteína F que utilizaron para reconstruir árboles filogenéticos y definir genotipos y observaron que la variabilidad genética de esta proteína estaba asociada con la de la proteína G (Kim *et al.*, 2007).

En contraste, la proteína G ha sido exhaustivamente estudiada, principalmente porque esta proteína es el producto del gen con mayor variabilidad genética y antigénica entre aislamientos. Se han realizado numerosos estudios sobre la misma: ensayos de reactividad de AcMos; análisis de mutantes de escape frente a AcMos; ensayos de digestión con RNasa A de heterohíbridos ARN:ARN (Cristina *et al.*, 1990); análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Coggins *et al.*, 1998; Choi and Lee, 2000); análisis de movilidad de heterodúplex (Kuroiwa *et al.*, 2004) y determinación de secuencia nucleotídica para la elaboración de árboles filogenéticos (Cane, 2001). Todos han demostrado que la proteína G posee un ectodominio inusual debido a que un alto porcentaje de diferencias (51-58%) en nt en su región codificante dentro o entre los dos subtipos resulta en cambios aminoacídicos (sustituciones no sinónimas). Estos cambios se agrupan principalmente en las regiones variables (RV) del ectodominio (ver Figura 5), mientras que las mutaciones silentes (sustituciones sinónimas) están uniformemente distribuidas (Melero *et al.*, 1997). Las epidemias son comúnmente producidas por los dos subtipos antigénicos, clasificados en más de un genotipo. Aunque a nivel local, los genotipos predominantes de una epidemia son frecuentemente reemplazados por otros genotipos en años consecutivos (Cane *et al.*, 1994), la mayoría de los genotipos están distribuidos mundialmente. Además, virus aislados en lugares distantes y en diferentes años pueden estar genéticamente más relacionados que virus aislados en el mismo lugar durante el mismo brote epidémico (García *et al.*, 1994). Estos estudios han llevado a tener suficientes datos acumulados que han proporcionado información acerca del patrón de evolución de HRSV, el cual es similar al de los virus de influenza B (Yamashita *et al.*, 1988; Rota *et al.*, 1992; McCullers *et al.*, 2004). Tomando en consideración estas singularidades moleculares y que la proteína G es uno de los blancos de la respuesta inmune neutralizante y protectora se ha sugerido que la presión de selección inmune operaría sobre este virus (Melero *et al.*, 1997).

No obstante, todavía existen numerosos puntos sobre el modelo evolutivo y el ciclo biológico de HRSV que no han sido completamente explicados, ni explorados. Entre éstos el mecanismo de evolución molecular durante el curso de una infección natural en pacientes inmunocompetentes o en inmunodeprimidos con infección prolongada, el modelo de transmisión y generación de variabilidad estacional, dónde queda alojado el virus entre brotes, por qué se producen reinfecciones a lo largo de la vida y por último a pesar de que existe un trabajo que describe la naturaleza de cuasiespecies para el BRSV (Deplanche *et al.*, 2007), ésta todavía no ha sido descrita para el HRSV. Se sabe que los virus con ARN pequeños, como el

HRSV, existen en la naturaleza como distribuciones dinámicas de variantes genéticas muy cercanamente relacionadas denominadas cuasiespecies. Éstas son sometidas a un continuo proceso de variación genética, competición y selección (Eigen and Biebricher; 1988; Domingo *et al.*, 2006). Este mecanismo es principalmente debido a que el virus utiliza una ARN polimerasa ARN-dependiente para replicar y transcribir su genoma que carece de capacidad correctora. La tasa de error para la misma ha sido estimada en 10^{-4} a 10^{-5} sustituciones por ronda de copiado (Drake and Holland, 1999). La plasticidad evolutiva de tales variantes genéticas (cuasiespecies) podrían explicar la notoria habilidad de los virus con ARN de evadir la respuesta inmune del huésped y de evolucionar generando por ejemplo variantes de escape a los antivirales (Domingo *et al.*, 2006). Estos efectos han sido extensamente demostrados para ciertos virus humanos con genoma ARN que producen infecciones crónicas, como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Nowak *et al.*, 2002) y el virus de hepatitis C (HCV) (Farci *et al.*, 2002). La puesta en evidencia de la naturaleza de cuasiespecies para un determinado virus revela la existencia de subpoblaciones o variantes virales dentro del “espacio de secuencias” que podría codificar para diferentes características fenotípicas, como por ejemplo desarrollar diferentes comportamientos biológicos, disparar una respuesta inmune de un tipo o de otro, adaptarse al ambiente cambiante de una infección, etc. (Vignuzzi *et al.*, 2006).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Uno de los objetivos de la epidemiología y la evolución molecular aplicada a los virus es poder trazar un mapa global de su circulación y así comprender las cadenas de transmisión de los mismos. Sobre todo en virus como el HRSV que produce brotes anuales muy marcados en invierno y luego en primavera-verano desaparece de la circulación general dejándole el paso a otros agentes como rinovirus, HAdV o PIV que circulan durante otros meses del año además de los del invierno. Es notorio como HRSV lo hace a excepción de las regiones tropicales en donde circula en la etapa lluviosa. Por otro lado el único reservorio de HRSV es el humano, no hay otro organismo que permita alojar al virus en los momentos en los que no circula entre la población humana.

Como consecuencia, tomando en cuenta este patrón de circulación anual, basado probablemente en la relación entre parámetros meteorológicos y estabilidad viral, transmisibilidad y hacinamiento de los individuos susceptibles en épocas invernales y lluviosas, se plantean dos posibles hipótesis de cómo sería la circulación de este virus a nivel local y global:

1. El HRSV se mantiene presente en la población mundial siguiendo los patrones de estacionalidad propios de las distintas regiones del planeta, favorecido por las comunicaciones y la circulación humana. De este modo pasa por los distintos brotes invernales (o estación lluviosa en países tropicales) y de esta manera no corta su cadena de transmisión.
2. El HRSV queda alojado en la misma población en donde se originó, aprovechando determinados huéspedes susceptibles (como inmunodeprimidos que no lo pueden eliminar totalmente del organismo) y así se mantiene a una baja tasa de replicación hasta el próximo brote invernal en donde aparecen nuevos huéspedes susceptibles (niños menores de 12 meses), que todavía no se enfrentaron nunca al virus y así comienza nuevamente el brote anual en el siguiente invierno.

2.2. Objetivos generales

- Ampliar el conocimiento sobre la epidemiología general y molecular del HRSV en la Argentina.

- Profundizar los conocimientos sobre la evolución molecular del HRSV subtipos A y B y su relación con la circulación local y global (Filogeografía).
- Describir la naturaleza de cuasiespecies para el HRSV, sus implicancias en la evolución del HRSV en relación a la persistencia en diferentes huéspedes y la generación de variabilidad viral.

2.3. Objetivos particulares

- Describir la incidencia de los Virus Respiratorios comunes como productores de IRAB en pacientes pediátricos en la Argentina durante el período de seis años comprendidos entre 1999 y 2004.
- Correlacionar factores meteorológicos con la incidencia del HRSV durante los distintos meses del año durante el período en estudio.
- Analizar la incidencia de los subtipos de HRSV durante el período analizado.
- Analizar a nivel de secuencia nucleotídica el gen de la glucoproteína G del HRSV subtipos A y B.
- Definir filogenéticamente genotipos a partir de la aplicación de modelos evolutivos y compararlos con los que circulan en el resto del mundo.
- Describir filodinámicamente la circulación de los genotipos a nivel local y global.
- Analizar la presencia de cuasiespecies en infecciones por HRSV.
- Describir la composición de las cuasiespecies si es que éstas son encontradas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención y procesamiento de muestras

3.1.1. Muestras clínicas

Las muestras clínicas utilizadas para realizar todos los análisis en este trabajo de Tesis Doctoral corresponden a aspirados nasofaríngeos (ANF) tomados a niños menores de cinco años de edad que fueron internados con IRAB en el Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez y en salas de neonatología y pediátricas de Hospitales Públicos de la ciudad de Buenos Aires y el gran Buenos Aires. El período analizado comprende seis años consecutivos (1999-2004) y algunas muestras provenientes del año 1997. Las muestras de ANF fueron obtenidas mediante la aspiración de secreciones respiratorias con sonda nasogástrica tipo K30 dentro de los primeros días de comenzados los síntomas respiratorios. Todas las muestras fueron remitidas en el día al Laboratorio de Virología del Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez de la ciudad de Buenos Aires junto con una historia clínica en la que se describía la edad, sexo, diagnóstico clínico, grado de la dificultad respiratoria y fecha de toma de muestra. Inmediatamente luego de que las muestras fueron recibidas, se les realizó una detección rápida de virus respiratorios mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el HRSV, FluA, FluB, HAdV y PIV 1, 2 y 3, (Light Diagnostics, Chemicon Int.Inc. USA). La técnica se desarrolló como fue descrito previamente y según instrucciones del fabricante (Gardner and McQuilin, 1968).

Las muestras que resultaron positivas por la técnica de IFI para HRSV fueron conservadas en freezer a -80 °C hasta la realización del estudio molecular.

Se tomó la siguiente convención para nombrar los virus. En el caso del análisis de los HRSV subtipo A: la sigla RSV (del inglés *respiratory syncytial virus*), el país de aislamiento (Argentina, ARG), el número de aislamiento (número interno del laboratorio) y el año de aislamiento (dos últimos dígitos en la nomenclatura). En el caso de HRSV subtipo B: la sigla RSV, la ciudad de aislamiento (Buenos Aires, BA), el número de aislamiento (número interno del laboratorio) y el año de aislamiento. En este último caso se utilizó una nomenclatura diferente que para el subtipo A debido a que ya habían sido publicadas secuencias con similares características y de esta manera se facilitaba el análisis comparativo. En el caso del análisis de variantes virales encontradas intrapaciente la nomenclatura de los clones indica: la

sigla RSV, el país de aislamiento (Argentina, ARG), el número de aislamiento (número interno del laboratorio), el año de aislamiento y el número de clon correspondiente (CN°).

3.1.2. Cepas patrones utilizadas

La cepa de HRSV Long/56 (número de acceso a *GenBank* M17212) fue utilizada como referencia de HRSV subtipo A y la cepa CH18537/63 para el subtipo B (número de acceso a *GenBank* M17213). Para el caso del estudio de las cepas del subtipo B con inserción, se utilizó además la cepa RSVBA3833/99. Estas tres cepas virales fueron cedidas gentilmente por las Dras. Alfonsina Trento, Mónica Galiano y Cristina Videla del Laboratorio de Virología Clínica, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC) “Norberto Quirno”, Hospital Universitario.

3.2. Aislamiento por plaqueo de las cepas patrones Long/56 y CH18537/63 y determinación del título de las mimas.

3.2.1. Cultivo de los virus en línea celular

Se utilizó la línea celular continua Hep-2 derivada de carcinoma epidermoide de nasofaringe humana (Moore *et al.*, 1952).

Los cultivos celulares se realizaron en botellas de 25 cm² utilizando medio mínimo esencial (MEM) con sales de Hanks, adicionado con suero fetal bovino (SFB) al 5%, solución antimicoplasma (tilosina) al 1%, glutamina al 1% y aminoácidos no esenciales 1% (Gibco, Invitrogen). Luego de obtener una monocapa con una confluencia del 70%, las células Hep-2 se inocularon con 200 µl de las muestras con los virus a cultivar a una alta multiplicidad de infección (previamente clarificadas y descontaminadas por centrifugación o filtración), más el agregado de 1 ml de medio de cultivo MEM Hanks al 2% en SFB (medio de mantenimiento). Se dejó adsorber el virus durante una hora a 37 °C y se completó el volumen de 10 ml con medio de mantenimiento. Posteriormente se incubó en estufa gaseada al 5% en CO₂ a 37 °C hasta observación de efecto citopático (ECP). Una vez obtenidos los característicos sincicios producidos por HRSV (como ECP) se levantaron las células infectadas con una espátula, se dividió el volumen total en sendos criotubos y se conservaron en N₂ líquido hasta su posterior utilización.

3.2.2. Purificación de virus por plaqueo

Se inocularon por duplicado, diluciones seriadas en base diez de la muestra viral a ser titulada en medio de cultivo al 2% (10^{-1} hasta 10^{-7}). Se utilizaron placas de cultivo celular de seis pocillos (preparadas 24 h antes con células Hep-2). Una vez adsorbidos los virus en las células se cubrieron los pocillos con medio de mantenimiento adicionado con agarosa al 0,8% en agua, de manera de inmovilizar las posiciones en las cuales cada célula había sido infectada. Se incubaron tres días a 37 °C en estufa gaseada con CO₂ al 5% y se le agregó una capa nueva de agarosa al 0,8% más el agregado del colorante vital rojo neutro preparado en agua estéril (0,01 µg/ml). Se incubaron nuevamente en estufa hasta la observación de placas de lisis celular producto de la infección viral inmovilizada. Con un capilar estéril se aislaron individualmente cada una de las placas de lisis y se reinocularon en nuevas botellas de células Hep-2 (cada una en forma individual). Una vez ampliados estos virus se procedió a repurificarlos en una segunda ronda de plaqueo. Luego de su amplificación fueron guardados en varias alícuotas en N₂ líquido hasta su titulación y posterior utilización en los experimentos de clonado (Martínez *et al.*, 1997).

3.2.3. Titulación del HRSV por el método de dilución límite (determinando unidades formadoras de placa (UFP))

Para conocer exactamente qué título viral poseía cada stock de virus patrón se utilizó la técnica de titulación por UFP. Para ello se realizaron diluciones sucesivas desde 10^{-1} hasta 10^{-7} de los virus que habían sido previamente purificados por plaqueo y preservados en criotubos. Se inocularon 125 µl de cada dilución por triplicado en placas de cultivo de 24 pocillos preparadas con células Hep-2 en medio MEM Hanks de mantenimiento y se incubaron siete días a 37 °C en estufa gaseada con CO₂ al 5%. Luego de ese período de incubación se eliminó el medio viejo y se fijaron las placas con formol al 20% en agua durante 4 horas. Se tiñeron con cristal violeta al 0,1% en 2% de etanol en agua durante un minuto, se lavaron y secaron (Martínez *et al.*, 1997). Para realizar el cálculo se contaron las UFP para cada dilución por triplicado con lupa, se calcularon los promedios y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{UFP/ml} = (\text{N}^\circ \text{ de UFP totales promedio} \times 1000 \mu\text{l}) \times \text{F} / 125 \mu\text{l}$$

Siendo **F**: factor de dilución correspondiente al pocillo utilizado para el cálculo.

3.3. Análisis molecular

3.3.1. Extracción de ARN total

El ARN total fue extraído directamente del ANF en el caso de las muestras clínicas y del stock guardado en N₂ líquido para las cepas de referencia, utilizando la técnica de Chomczynski y Sacchi modificada (Chomczynski and Sacchi, 1987 and 2006). A 300 µl de muestra se le agregaron 600 µl de una solución desnaturalizante que contenía isotiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 50 mM, β-mercaptoetanol 100 mM y Sarkosyl al 1 %. Luego de agitar con vórtex se dejó incubar 5 minutos para favorecer la desnaturalización completa del material. Posteriormente se agregaron 60 µl de acetato de sodio 7,5 M y 900 µl de la fase orgánica de una solución compuesta por fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en la relación 25:24:1, respectivamente (equilibrado a pH 5,5). La mezcla se incubó a 4 °C durante 15 minutos y se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 minutos en forma refrigerada a 4° C para separar las fases. Se tomó la fase acuosa superior y se trasvasó a un tubo que contenía 600 µl de alcohol isopropílico y 2 µg de glicógeno (Sigma). Se dejó precipitar durante 30 minutos a -20 °C y se centrifugó en las condiciones mencionadas anteriormente durante 30 minutos. Se descartó la fase acuosa y se lavó con 300 µl de etanol al 70 % en agua libre de nucleasas en frío. Se volvió a centrifugar 15 minutos, se secó el ARN precipitado y se resuspendió en 90 µl de agua estéril, tratada previamente con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0,1% para evitar la acción posterior de nucleasas. El ARN así extraído fue conservado a -20 °C si iba a ser usado en un período corto de tiempo o a -80 °C para conservarlo períodos más largos.

3.3.2. Clasificación del HRSV en subtipos A y B a partir de los ANF.

Se procedió a poner a punto una técnica de *multiplex* RT-PCR anidada para clasificar a los virus como subtipos A y B directamente de los ARN extraídos de los ANF. Los pares de cebadores específicos para los genes de las proteínas N y P utilizados para tal fin fueron tomados de un trabajo previo publicado por Stockton y col en 1998 (por cebadores ver apéndice 1). La clasificación consistió en una transcripción reversa seguida de dos rondas de PCR. La puesta a punto se realizó probando distintas concentraciones de MgCl₂ (desde 1,5 mM hasta 4 mM) y diferentes temperaturas de hibridación de los cebadores en ambas rondas de PCR (ver apéndice 1). Los productos de amplificación obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2 % en solución amortiguadora TAE (Tris-Acetato-EDTA) con 1 µg/ml de bromuro de etidio (BrEt) y posterior visualización bajo luz ultravioleta (UV).

Para poder determinar el tamaño de los productos de amplificación se utilizó un marcador de tamaño molecular (100 *bp* ADN Ladder, Promega). De acuerdo al tamaño de los productos de amplificación obtenidos se pudieron clasificar a los virus como subtipo A si los mismos eran de 380 pb y como subtipo B si eran de 180 pb.

Una vez encontradas las condiciones ideales para esta técnica se determinó la sensibilidad de la misma utilizando las cepas patrones previamente tituladas.

3.3.3. Análisis de genotipos del HRSV mediante el estudio de la glucoproteína G.

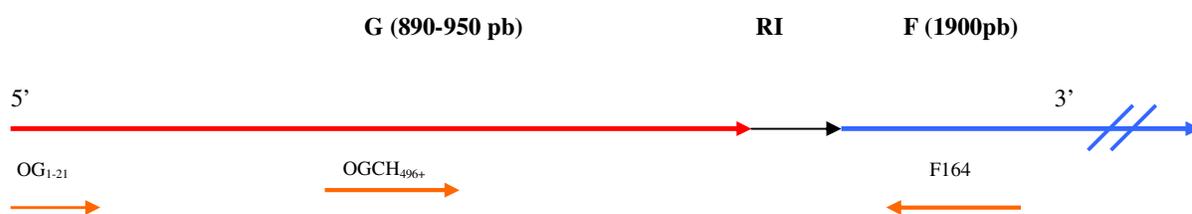
3.3.3.1. Amplificación de la glucoproteína G:

Se utilizó el siguiente esquema de cebadores:

HRSV Subtipo A



HRSV Subtipo B



Siendo: **G**: glucoproteína G; **RI**: región intergénica; **F**: glucoproteína F. El número corresponde a la posición en pb en el gen.

Algunos de los cebadores utilizados fueron previamente publicados (Sullender *et al.*, 1993; Peret *et al.*, 1998; Melero *et al.*, 1997). Los cebadores OG₁₋₂₁ y OG_{CH496+} fueron gentilmente cedidos por la Dra. Mónica Galiano y la Dra. Alfonsina Trento (CEMIC).

Se utilizaron siete µl de ARN total como molde para la primera ronda de RT-PCR en un volumen final de 25 µl. Para tal fin se utilizó un kit comercial en un paso para el cual se siguieron los protocolos según recomendación del fabricante (*one-step* RT-PCR *kit*

(QIAGEN)). Los oligonucleótidos F1 para el subtipo A y F164 para el B fueron utilizados como cebadores para la reacción de retrotranscripción que fue llevada a cabo a 50 °C por 30 min, seguida de 15 min a 95 °C para inactivar la retrotranscriptasa y activar la *HotStart Taq* ADN polimerasa. Los oligonucleótidos F1 y G10 para el caso de subtipo A y F164 y OG₁₋₂₁ para el subtipo B (ver esquema previo), fueron empleados como cebadores para amplificar la glucoproteína G en su totalidad. El protocolo de ciclado fue el siguiente: 35 ciclos de 94 °C por 15 s, 60 °C (subtipo A) y 53 °C (subtipo B) por 30 s y 72 °C por 1 min más un paso de extensión final a 72 °C por 10 min. Alternativamente para algunas muestras de subtipo B, se utilizaron los oligonucleótidos F164 y OG_{CH496+} para amplificar el tercio C-terminal de la glucoproteína G. Para el caso del subtipo A, se realizó un segundo paso de PCR semi-anidada con los cebadores G267 y F1. Para la misma, por cada 25 µl finales, una alícuota de 2 µl del ADN amplificado en la primera ronda fue usada como molde para una reacción que contenía 2 µM de cada cebador, 0,3 µM de dNTP, 2,5 mM SO₄Mg, 1X de *PCR-buffer ProofStart-ADN* polimerasa y 0,4 U de *ProofStart-ADN* polimerasa (QIAGEN). La reacción fue llevada a cabo con el siguiente programa de ciclado: 95 °C por 5 min, 34 ciclos de 94 °C por 30 s; 65 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, más una extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos amplificados de 1162 pb ó 471 pb (subtipo B) y 751 pb (subtipo A) fueron analizados en un gel de agarosa al 2 % en solución amortiguadora TAE con 1 µg/ml de BrEt y posterior visualización bajo luz UV.

3.3.3.2. Purificación de los productos de amplificación

Los productos de amplificación obtenidos en el ítem anterior fueron purificados a partir de un gel de agarosa al 2% en TAE con el kit comercial *Wizard® PCR preps DNA purification System* (Promega), según indicaciones del fabricante. EL ADN purificado se eluyó en 50 µl de H₂O libre de nucleasas, y se conservó a -20 °C. Para determinar la concentración de estas muestras se realizó una densitometría comparativa: 5 µl de cada una fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 2% en TAE, junto con un patrón de tamaño molecular y masa molecular (*MassRuler™ DNA Ladder, Low Range* (80-1031 pb), Fermentas).

3.3.3.3. Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para el subtipo A.

Para el caso del subtipo A se realizó un tamizaje previo de las muestras por RT-PCR-RFLP como parte del estudio de genotipos circulantes. Para ello se seleccionaron al azar muestras que habían sido caracterizadas como pertenecientes a ese subtipo y 5 µl del producto

amplificado fueron sometidos a digestión con las enzimas de restricción *RsaI*, *PstI* y *HincII* (Sullender *et al.*, 1993). Los patrones de restricción fueron analizados en un gel de agarosa al 3% teñido con BrEt y visualizados bajo luz UV. A cada patrón de RFLP individual se le asignaron letras para facilitar la comparación entre las muestras estudiadas. Se tomó la siguiente convención: la primera letra de la designación representa la enzima de restricción, la segunda letra representa el subtipo de HRSV, y los números representan cada patrón individual. Para los patrones de RFLP compuestos (correspondientes a las tres enzimas de restricción juntas), se les asignó la letra P para referir al análisis, la segunda letra representa el subgrupo de HRSV y el número representa cada patrón compuesto.

3.3.3.4. Secuenciación directa de los productos de amplificación

Los productos de amplificación purificados fueron secuenciados por el método de Sanger en ambas direcciones. Para el caso del subtipo A, las reacciones de secuenciación se realizaron en nuestro laboratorio con un kit comercial DyET Terminator (Amersham BioSciences). Para ello se utilizaron 100 ng de cada producto de amplificación más 10 picomoles de cada uno los cebadores F1 y G267 por separado, y se sometieron a una electroforesis capilar en un secuenciador automático MegaBACE 1000, Amersham BioSciences. La secuenciación del subtipo B fue parte de un trabajo en colaboración con el Dr. José Antonio Melero y la Dra. Alfonsina Trento de la Unidad de Biología Viral, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid, España). Allí se utilizaron los cebadores F164, OG₁₋₂₁, y un cebador adicional CH253 (ver apéndice 1) para completar la secuencia del gen de la glucoproteína G, usando el kit comercial "*Big dye terminator sequencing kit*" (Applied Biosystem) y un secuenciador automático ABI3100, AppliedBiosystem.

3.3.4. Análisis de la variabilidad intramuestra del HRSV.

3.3.4.1. Amplificación de muestras para análisis de cuasiespecies

Ocho muestras correspondientes al subtipo A que habían sido secuenciadas en forma directa fueron seleccionadas para analizar la presencia de cuasiespecies. Para ello se amplificó nuevamente el ectodominio de la glucoproteína G con los cebadores G267 y F1 utilizados previamente, pero en un solo paso de RT-PCR utilizando una mezcla de la transcriptasa reversa *Omniscript* (QIAGEN) y la enzima con alta fidelidad de copiado *ProofStart-ADN* polimerasa (QIAGEN), la cual posee actividad exonucleasa 3'→5'. Para la reacción, por cada 25 µl finales, una alícuota de 14 µl del ARN fue usada como molde para una reacción que contenía 1 µM de cada cebador, 0,3 µM de dNTP, 1X de *PCR-buffer ProofStart-ADN*

polimerasa, 4 U de transcriptasa reversa *Omniscript*, y 2,5 U de *ProofStart*-ADN polimerasa. La reacción fue llevada a cabo con el siguiente programa de ciclado: 42 °C por 60 min, 95 °C por 5 min, 34 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, más una extensión final a 72 °C por 7 min.

3.3.4.2. Ligación de los productos de amplificación.

Los productos amplificados, purificados en gel de agarosa, fueron clonados con el sistema comercial pGEM-T Easy Vector (Promega) según indicaciones del fabricante. Debido a que los productos de amplificación habían sido obtenidos con la enzima con actividad correctora *ProofStart*-ADN polimerasa, poseían extremos romos y como el vector pGEM-T requiere fragmentos con desoxiadenosinas (As) terminales protruyentes (producto de la adición de la *Taq* ADN polimerasa), se procedió a realizar la adición de la As 3'-terminales a los fragmentos de PCR seleccionados (*A-tailing*). El protocolo utilizado en 10 µl de volumen de reacción fue: 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dATP, 5 U *Taq* ADN polimerasa, y 5 µl del producto de amplificación. Luego se incubaron a 72 °C por 25 min.

Para determinar la cantidad (masa en ng) de producto de amplificación a clonar se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{ng a clonar} = \frac{\text{masa de vector} \times \text{tamaño de prod. amplificación}}{\text{tamaño de vector}} \times R$$

Siendo: R: relación inserto/vector.

Para este caso en particular:

$$\text{ng a clonar} = \frac{50 \text{ ng de vector} \times 0,751 \text{ Kb del inserto}}{3,0 \text{ Kb vector}} \times 3 = 37,55 \text{ ng}$$

En función de la concentración de cada producto de amplificación determinada previamente y de la cantidad necesaria para lograr una relación óptima de inserto/vector, se realizaron las reacciones de ligación correspondientes. Para ello se utilizó el protocolo sugerido por el fabricante en un volumen final de 10 µl, adicionando 50 ng de vector pGEM-T easy, buffer de ligación 1X, 3 U de ADN Ligasa T4, X µl de producto de amplificación (38 ng totales) más H₂O estéril hasta completar volumen final. Las mezclas de ligación fueron incubadas a 4 °C durante toda la noche.

3.3.4.3. Preparación de bacterias competentes

Para poder transformar los productos de ligación descritos en el inciso anterior se prepararon bacterias competentes (*Escherichia coli* JM109) por un método químico (Sambrook and Russell, 2001).

A partir de una colonia obtenida en medio sólido LB-agar (1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,5% NaCl, pH 7,0, 1,5% agar) se realizó un cultivo de 3 ml de medio líquido LB (1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,5% NaCl, pH 7,0), incubando a 37 °C durante 2 h con fuerte agitación. Este cultivo se utilizó como inóculo para uno de mayor volumen de LB (120 ml), que se incubó a 37 °C con fuerte agitación hasta obtener una densidad óptica de aproximadamente 0,350 DO. Ésta se determinó por comparación con los tubos 2 y 3 de la escala de Mc Farland. El cultivo se enfrió durante 10 min sobre hielo y se centrifugó 15 min a 4° C a 4.100 rpm en centrífuga Sorvall Rotor GSA. Se descartó el sobrenadante y los tubos se mantuvieron invertidos durante 1 min para eliminar los restos de medio de cultivo. Las bacterias se resuspendieron en 36 ml de buffer TFB1 frío (0,01 M RbCl, 45 mM MnCl₂·4H₂O, 35 mM KAc, 0,01M CaCl₂·2H₂O, 15 % glicerol, pH 5,8) y se incubaron 90 min en hielo. Luego se repitieron los pasos de centrifugación y eliminación del sobrenadante, y el sedimento bacteriano se resuspendió cuidadosamente en 4,8 ml de buffer TBF2 frío (0,01M MOPS, 1 mM RbCl, 0,075 M CaCl₂·2H₂O, 15 % glicerol, pH 6,8). Posteriormente se procedió a preparar alícuotas de 400 µl de la suspensión bacteriana para su posterior congelamiento a -80 °C.

3.3.4.4. Transformación de bacterias competentes

Para cada reacción de transformación se agregaron 2 µl de plásmido recombinante a 50 µl de una suspensión de *Escherichia coli* JM109 competentes, y se mantuvo sobre hielo durante 20 min. Posteriormente, los tubos se incubaron durante 45-50 s a exactamente 42 °C en baño de agua sin agitación y se transfirieron nuevamente a baño de hielo por 2 min. Se agregaron 950 µl de medio líquido SOC (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa) a cada tubo y la suspensión se incubó durante 1,5 h a 37 °C. Las bacterias se centrifugaron durante 10 min a 8.000 rpm, se descartó el exceso de sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 100 µl del medio de cultivo remanente. La suspensión bacteriana se sembró con espátula de Drigalski estéril sobre medio sólido LB, con ampicilina (100 µg/ml), IPTG (0,5 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido/placa de LB sólido) y X-Gal (80 µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-

D-galactopiranosido disueltos en dimetilformamida /placa de medio sólido). Las placas se incubaron a TA hasta la absorción total del líquido, y posteriormente a 37 °C durante toda la noche.

3.3.4.5. Selección y análisis de clones recombinantes

De cada placa de bacterias transformadas se seleccionaron al menos 20 colonias de color azul, las cuales corresponden a colonias recombinantes. Dichas colonias se repicaron en forma de estría en medio LB sólido con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C para su posterior procesamiento.

Se buscó que al menos ocho clones de los 20 seleccionados fueran positivos para la presencia del inserto clonado en el vector. La misma se determinó por la técnica de PCR a partir de las colonias bacterianas. Una porción de colonia se suspendió en 50 µl de agua estéril y se calentó a 95 °C durante 5 min para la lisis de las células bacterianas. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 min y 2 µl del sobrenadante se utilizaron para la reacción de PCR, que se realizó en un volumen final de 10 µl (1X buffer *Taq* ADN polimera, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada uno de los dNTPs, 10 pmoles de cada cebador (G267 y F1) y 0,25 U de *Taq* ADN polimerasa (Promega)). La reacción de amplificación se realizó en termociclador con los siguientes parámetros de reacción: 5 min a 95 °C, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C, 30 s a 72 °C, y una extensión final de 5 min a 72 °C. El producto de amplificación de 751 pb se visualizó bajo luz UV luego de electroforesis en gel de agarosa al 2% con 1 µg/ml de BrEt. Los clones que resultaron positivos por esta técnica fueron repicados en medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) e incubados durante toda la noche a 37° C con agitación (150 rpm). Todos los cultivos bacterianos obtenidos de esta manera se conservaron a -80 °C en glicerol al 15%.

3.3.4.6. Extracción de ADN plasmídico y digestión enzimática del mismo para su cuantificación.

Se inocularon 3 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) con una porción de colonia recombinante y se incubaron durante toda la noche a 37 °C con agitación (150 rpm). El cultivo se centrifugó a 8.000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se extrajo el ADN plasmídico con el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), según indicaciones del fabricante. EL ADN purificado se eluyó en 50 µl de H₂O libre de nucleasas, y se conservó a -20 °C.

Para determinar la concentración de estas muestras, se procedió a digerir el ADN plasmídico obtenido con la enzima de restricción *EcoRI*. Esta enzima permite extraer al inserto de interés del vector en forma completa, debido a que sus sitios de corte se encuentran flanqueando el sitio múltiple de inserción.

Dos microlitros del ADN plasmídico purificado fueron sometidos a digestión enzimática con 2 U de la enzima *EcoRI* (Invitrogen). La digestión se realizó durante 60 min a 37 °C. El producto de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE, teñido con BrEt y las bandas correspondientes al vector linealizado y al inserto se observaron bajo luz UV, junto con dos patrones de tamaño molecular y masa molecular (*MassRuler™ DNA Ladder, Low* (80-1.031 pb) and *High Range* (1.500-10.000 pb), Fermentas).

3.3.4.7. Secuenciación de los clones

Los clones recombinantes positivos cuantificados fueron secuenciados por el método de Sanger en ambas direcciones. Las reacciones de secuenciación se realizaron con un kit comercial DyET Terminator (Amersham BioSciences). Para ello se utilizaron 500 ng de ADN más 10 picomoles de cada uno los cebadores F1 y G267 para algunos clones y para otros M13*Forward* y M13*Reverse* (ver apéndice 1), y se sometieron a una electroforesis capilar en un secuenciador automático MegaBACE 1000, Amersham BioSciences.

3.4. Análisis Bioinformático

3.4.1. Análisis y alineamiento de las secuencias obtenidas

Los electroferogramas obtenidos para cada una de las reacciones de secuencia realizadas se visualizaron utilizando el programa Chromas v2.2 (Technelysium, Helensvale, Australia) y se editaron manualmente con el programa BioEdit v7.0.9.0 (Hall, 1999). De esta manera se obtuvieron secuencias consenso a partir de las secuencias obtenidas con ambos cebadores (*forward* y *reverse*) para cada una de las muestras, llegando a una redundancia de dos.

Las secuencias de aminoácidos fueron inferidas utilizando el código genético universal con el programa DNASP v4.50.3 (Rozas *et al.*, 2003) a partir del marco abierto de lectura correspondiente.

Las secuencias directas y las de los clones obtenidas del gen de la glucoproteína G del HRSV fueron alineadas con el programa ClustalX v2.0.5 (Higgins, 2007),

Para el análisis de los polimorfismos (expresados como diversidad nucleotídica y aminoacídica media por sitio por ciento) y divergencias (expresadas como número de sustituciones sinónimas (*S*) y no sinónimas (*N*)) de las secuencias se utilizó el programa DNASP v4.50.3 (Rozas *et al.*, 2003).

Para el cálculo de las distancias genéticas en nucleótidos y aminoácidos se utilizó el programa DNASP v4.50.3 (Rozas *et al.*, 2003) y MEGA v4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

Para el cálculo global de la relación ω (expresada como el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (*dS*) vs el número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo (*dN*), *dN/dS*) como así también para determinar las presiones de selección sitio por sitio, se utilizaron tres métodos, que se basan en máxima verosimilitud, disponibles en el paquete del programa HyPhy y realizados a través de su servidor *on line* Datamonkeyweb (<http://www.datamonkey.org/>) (Kosakovsky Pond and Frost, 2005a). Estos métodos son SLAC (*single-likelihood ancestor counting*), FEL (*Fixed effects likelihood*) y REL (*Random effects likelihood*) (Kosakovsky Pond and Frost, 2005b).

3.4.2. Reconstrucción de árboles filogenéticos

Para las construcción de árboles filogenéticos se utilizaron en todos los casos el programa MrBayes v3.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) y el paquete PAUP* v4.0b10 para Windows (Swofford, 2003).

MrBayes es un programa de inferencia bayesiana de filogenia. La inferencia bayesiana de filogenia está basada en una cantidad llamada probabilidad posterior de árboles de distribución, que es la probabilidad de un árbol condicionado por las observaciones. El condicionamiento se logra a través del teorema de Bayes. No es posible calcular analíticamente la probabilidad posterior de árboles de distribución. En cambio, MrBayes utiliza una técnica de simulación llamada *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) para aproximar esta probabilidad. Por lo tanto, el soporte de las ramas está dado por la probabilidad posterior. En todos los casos sólo son mostradas las probabilidades posteriores mayores a 0,6 y los parámetros de la simulación de MCMC utilizados fueron 600.000 *ngen*, 1.000 *samplefreq*, 4 *nchains*, 1.000 *burnin*.

Para el caso del paquete PAUP*, el criterio de reconstrucción aplicado fue el de Máxima Verosimilitud (MV), éste hace uso de un modelo de sustitución nucleotídico explícito para inferir las relaciones entre los datos observados y selecciona el árbol filogenético más

probable para ese conjunto de datos y bajo dicho modelo de sustitución nucleotídico. Para determinar qué modelo se ajustaba correctamente a cada uno de los alineamientos de nucleótidos analizados se utilizaron los programas PAUP* v4.0b10 y las herramientas *on line* del ModelTest (Posada and Crandall, 1998; Posada, 2006). El modelo de sustitución que mejor se ajustó a los datos observados (con un nivel de significación $\alpha=0,05$) se obtuvo de entre 56 modelos probables.

En todos los casos que se detallan en la sección resultados también se aplicaron los criterios de distancia y parsimonia para determinar las relaciones filogenéticas de las secuencias del HRSV subtipo A como del subtipo B, y para ello se utilizó el programa MEGA v4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

Para otorgar soporte estadístico a cada una de las topologías de los árboles obtenidos por los criterios de MV, Distancia y Parsimonia, se utilizó la técnica de remuestreo *bootstrap* (100-1.000 pseudoréplicas, dependiendo del criterio de inferencia utilizado). En todos los casos sólo los valores superiores a 55-60% son mostrados en los árboles.

Para la visualización, edición y exportación de los árboles filogenéticos se utilizó el programa *Tree Figure Drawing Tool v1.2.1* 2006-2009 (FigTree v1.2.1) (Andrew Rambaut Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh).

3.4.3. Análisis de asociación y movimiento de variantes virales dentro de los genotipos a través del tiempo

Este análisis se realizó mediante uso del programa PAQ (del inglés *Partition analysis of quasispecies*) (Baccam *et al.*, 2001). Éste se basa en un método no heurístico desarrollado para estudiar componentes muy cercanamente relacionados del espectro de mutantes de las cuasiespecies virales. El programa usa la distancia de Hamming (número de diferencias en nt entre pares de secuencias) para medir las distancias entre las secuencias en estudio, y un método de asociación no heurístico para identificar clados o particiones cohesivas y discretas de secuencias cercanamente relacionadas. El resultado óptimo es aquel que maximiza el número de variantes o secuencias dentro de una partición, mientras que minimiza el radio de la misma y la superposición de variantes entre las particiones. No obstante, el programa no selecciona un número predeterminado de particiones y permite la superposición de variantes. La premisa básica del programa es que las secuencias separadas por las menores distancias genéticas son más similares y, por lo tanto deben estar agrupadas entre sí.

Para la representación de los resultados obtenidos con este programa se diseñó un diagrama de círculos, en el cual cada conjunto de círculos de un mismo color representa particiones o grupos definidos por el programa (clados en un análisis filogenético). El diámetro relativo de cada círculo es proporcional al número de secuencias contenidas dentro de cada clado en un momento determinado de tiempo (año).

3.4.4. Cálculo de la tasa de evolución y determinación del ancestro común más reciente (MRCA).

La tasa de evolución y fecha del MRCA se estimaron mediante un método bayesiano, a través del paquete de programas BEAST v1.4.8 (Drummond and Rambaut, 2007).

Adicionalmente, para el caso del subtipo B, estos parámetros fueron estimados por el método de Máxima Verosimilitud usando el programa TipDate v1.2 (Rambaut, 2000) (este programa se utilizó *on line* con las herramientas bioinformáticas disponibles en el portal del Instituto Pasteur de Francia: <http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py>). Asimismo, se realizó un cálculo manual, graficando la fecha de aislamiento de cada muestra versus la distancia genética correspondiente a la misma, obtenida como el número de sustituciones nucleotídicas con respecto a una secuencia nodo de divergencia putativa (raíz). Por regresión lineal los datos se ajustaron a una recta y la secuencia raíz fue elegida para maximizar el valor de r^2 . La pendiente de la regresión lineal fue usada para calcular la tasa de evolución de las secuencias analizadas y el punto que cruzaba a las abscisas fue tomado como la fecha del MRCA para ese grupo de secuencias estudiadas.

3.4.5. Predicción de los perfiles de antigenicidad

A partir de las secuencias de aminoácidos correspondiente al ectodominio de la glucoproteína G, se calculó el índice antigénico de James-Wolf, que predice los determinantes antigénicos combinando los métodos existentes de predicción de estructura de proteínas (Jameson and Wolf, 1988) y las regiones hidrofílicas de Hopp-Woods. Ambos cálculos se realizaron y graficaron con el programa Protean incluido en el paquete Lasergene (DNASTAR, Madison, Wis., USA).

3.4.6. Predicción de los sitios potenciales de N-glucosilación y O-glucosilación

Para tal propósito se utilizaron los programas N-GlycoSite (Zhang *et al.*, 2004) (este programa se utilizó *on line* con las herramientas bioinformáticas disponibles en el portal

<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/HIVTools.html>) y NetOglyc (Julenius *et al.*, 2005) (este programa se utilizó *on line* con las herramientas bioinformáticas disponibles en el portal <http://www.cbs.dtu.dk/services/>).

3.4.7. Análisis de recombinación

Este cotejo se realizó para el caso de las secuencias de los clones correspondientes a las muestras ARG1160/04 y ARG2525/04.

Se utilizaron dos métodos independientes para evaluar recombinación: RDP3 (Martin *et al.*, 2005) y GARD (Kosakovsky Pond *et al.*, 2006).

El paquete RDP3 (del inglés *Recombination Detection Program version 3*) combina seis diferentes programas previamente desarrollados individualmente que se basan en distintos algoritmos de análisis para detectar y analizar señales de recombinación en una serie de secuencias de ADN alineadas. Los diferentes programas son RDP (Martin *et al.*, 2005), SiScan (Gibbs *et al.*, 2000), Bootscan (Salminen *et al.*, 1995), Chimeric, MaxChi (Maynard Smith, 1992; Posada and Crandall; 2001), Geneconv (Padidam *et al.*, 1999) y LARD (Holmes *et al.*, 1999). Se utilizaron los parámetros básicos para cada programa.

El método GARD (del inglés *Genetic Algorithm Recombination Detection*) se utilizó a través de su servidor *on line* Datamonkeyweb (<http://www.datamonkey.org/>). El programa utiliza el criterio de búsqueda de Máxima Verosimilitud AIC (*Akaike information criterion*) para buscar un alineamiento múltiple de secuencias con puntos de corte de recombinación posibles, cuantifica el grado de soporte para sus posiciones e identifica clados o secuencias involucradas en esos potenciales eventos de recombinación.

3.5. Análisis Estadístico

Para la comparación de frecuencias (variables cualitativas) se utilizó la prueba de chi cuadrado (χ^2) con corrección de Yates cuando fue necesario.

Para la comparación de los valores de distancias genéticas medias por sitio y diversidades medias por sitio (variables cuantitativas sin distribución normal) se aplicó el test de Mann-Whitney (*Mann-Whitney Rank Sum Test*).

Para analizar la correlación entre los parámetros meteorológicos y las frecuencias de los virus, se realizó una comparación bivariada por el test estadístico de correlación de Spearman para variables que no siguen una distribución normal.

Para todos los análisis estadísticos detallados se utilizó el programa Analyse-it[®] Statistics integrado al programa Microsoft Excell (MS[©]).

Todos los test estadísticos fueron de dos colas y la significancia estadística se consideró para $p < 0,05$.

3.6. Números de acceso a *GeneBank*.

HRSV subtipo A (Accession numbers AY910769 a AY910823).

HRSV subtipo B (Accession numbers DQ227363 a DQ227408).

Ver apéndice 3 en donde se listan las secuencias que fueron obtenidas de la base de datos *GeneBank* para realizar los distintos análisis filogenéticos.

4. RESULTADOS

4.1. Marco Epidemiológico De Las IRAB En Pacientes Pediátricos En La Ciudad De Buenos Aires.

El presente trabajo de tesis corresponde a los años comprendidos entre 1999 y 2004 y algunos casos esporádicos de 1997. Los tres primeros años y 1997 se analizaron retrospectivamente, el resto de los años se fue realizando durante el transcurso de los mismos.

Durante los seis períodos epidémicos consecutivos estudiados fueron remitidas al Laboratorio de Virología del HNRG, un total de 22.416 muestras de ANF provenientes de niños con diagnóstico clínico de IRAB. En la Tabla II se presenta el número de muestras de ANF analizadas por año, y dentro de éstas el número de casos con etiología viral positiva detectados por IFI. Como se puede observar el número de muestras anuales totales recibidas en el laboratorio fue elevado, alcanzando un máximo de 4.008 ANF en el año 1999. Con respecto a los casos con etiología viral, los porcentajes variaron año a año con un pico máximo en el año 2003 de 48,2%, y un mínimo en el primer año de análisis de 1.050 casos (26,2%). La media total de casos positivos fue de 39,45%, (Intervalo de Confianza del 95% (IC 95%) = 31,13-48,17).

De los casos con etiología viral positiva el HRSV fue el virus más frecuentemente encontrado en todos los períodos estudiados, con una media de 80,2% (IC 95%= 74,95-85,08). Con respecto al resto de los virus analizados, sus frecuencias y predominios variaron año a año, aunque respondieron a un patrón general. En la Tabla III se puede observar que en total en el período analizado, el FluA fue el segundo virus respiratorio más frecuente con un valor del 8,2% (IC 95%=2,27-14,13). Luego lo siguieron, HAdV (6,72 %, IC95%=3,70-9,85); PIV 1, 2 y 3 (4,74%, IC95%=1,49-7,87) y FluB (0,3%, IC95%=0,03-0,53). La contribución de los virus respiratorios analizados al total de las IRAB en el período analizado fue del 31,64% para el HRSV, del 3,17% para FluA, del 2,65% para HAdV, del 1,87% para PIV 1, 2 y 3 y del 0,12% para FluB (diferencias estadísticamente significativas con respecto a HRSV; $p < 0,0001$).

En relación al número de casos correspondientes a los distintos virus analizados cada año, si bien el HRSV fue siempre el virus predominante, el número de muestras positivas para el mismo durante el año 1999 fue significativamente menor que los años restantes (N=802,

$p < 0,0001$, ver Tabla III). Incluso como fue mencionado previamente el número total de IRAB con etiología viral positiva para los virus analizados fue significativamente menor ese año (26,2%, $p < 0,0001$).

Tabla II. Etiología viral de las IRAB en niños menores de 5 años.

AÑO	Número de muestras analizadas	Número de casos con etiología viral (%)
1999	4.008	1.050 (26,2)
2000	3.788	1.542 (40,7)
2001	3.458	1.326 (38,3)
2002	3.849	1.416 (36,8)
2003	3.783	1.825 (48,2)
2004	3.530	1.683 (47,7)
TOTAL	22.416	8.842 (39,45)

Tabla III. Distribución anual del número de casos y frecuencias de los virus respiratorios analizados encontrados en niños menores de cinco años con IRAB.

Los números y porcentajes correspondientes al HRSV están remarcados en negrita. Las frecuencias están calculadas en relación al número total de casos positivos.

AÑO	HRSV (%)	HAAdV (%)	PIV 1, 2 y 3 (%)	FluA (%)	FluB (%)	Total
1999	802 (76,4)	97 (9,2)	38 (3,6)	112 (10,7)	1 (0,09)	1.050
2000	1.317 (85,4)	74 (4,8)	71 (4,6)	76 (4,9)	4 (0,3)	1.542
2001	1.030 (77,7)	54 (4,1)	21 (1,6)	219 (16,5)	2 (0,1)	1.326
2002	1.129 (79,7)	137 (9,7)	144 (10,2)	0 (0)	6 (0,4)	1.416
2003	1.361 (74,6)	173 (9,4)	101 (5,5)	188 (10,3)	2 (0,1)	1.825
2004	1.453 (86,3)	59 (3,5)	44 (2,6)	115 (6,8)	12 (0,7)	1.683
TOTAL (%)	7.092 (80,2)	594 (6,72)	419 (4,74)	710 (8,2)	27 (0,3)	8.842 (100)

Cada ANF recibido en el laboratorio estaba acompañado de una ficha clínica en la que se detallaba: el sexo del paciente, la edad, el diagnóstico clínico y días de internación entre otros datos. En la Figura 6, se detallan en sendos diagramas el diagnóstico clínico diferencial de las IRAB y las edades de los pacientes con diagnóstico positivo para HRSV en el período en

estudio. La bronquiolitis (BQL), seguida de la neumonía focal (NUF) fueron las presentaciones clínicas más frecuentemente producidas por este virus (BQL: 64%, NUF: 31%; $p=0,00648$), como así también que los niños menores de 12 meses fueron los más susceptibles a sufrir IRAB producida por este virus (<11 meses: 76%; $p=0,0001$). De manera interesante, se encontró una correlación negativa entre la edad en meses de los pacientes y el número de éstos previamente sanos, la cual estaba soportada por el 80% de los casos analizados ($r^2=0,8$) (Figura 7). También se encontró una correlación negativa entre la edad y el número de casos de bronquiolitis y neumonía (NM), (BQL, $r^2=0,9832$ y NM, $r^2=0,9447$) (Figura 8). Mostrando que a medida que nos posicionamos en menores edades, la incidencia de HRSV como productor de bronquiolitis y neumonía fue mayor.

Figura 6. a) Diagnóstico clínico diferencial de las IRAB producidas por HRSV, BQL: bronquiolitis, NUF: neumonía focal; NMF: neumonía multifocal y Nderr: neumonía con derrame; b) Distribución de edades de los pacientes con diagnóstico del HRSV positivo.

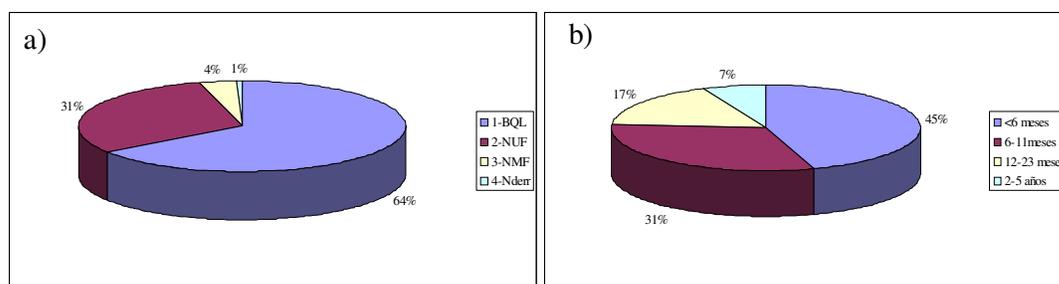


Figura 7. Correlación negativa entre la edad en meses y el número de pacientes previamente sanos con diagnóstico del HRSV positivo.

En el eje Y se representa el número de pacientes con HRSV como agente etiológico de la IRAB, mientras que en el eje X la edad en meses.

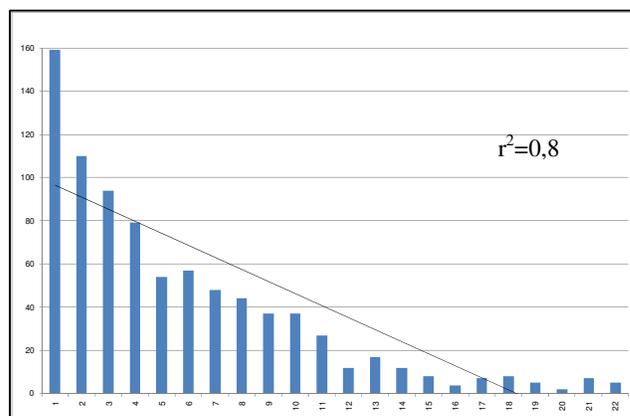
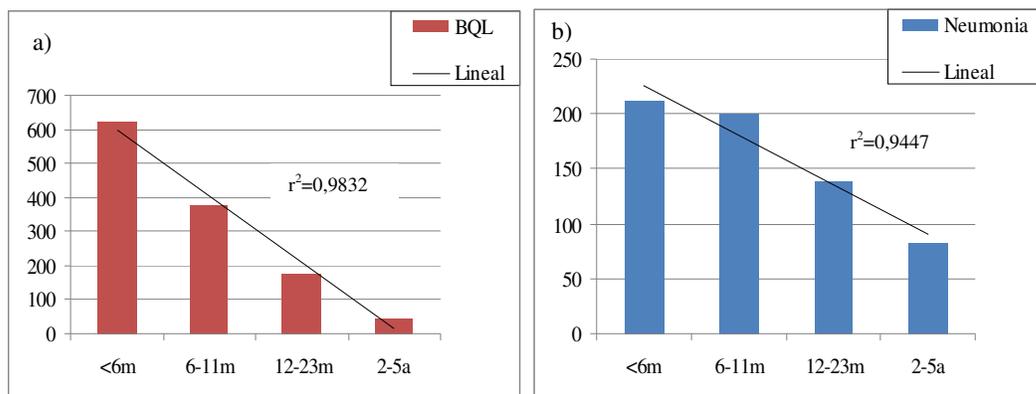


Figura 8. Correlación negativa entre la edad en meses y el número de casos con: a) bronquiolitis (BQL) y b) neumonía (NM).

En el eje Y se representa el número de pacientes, mientras que en el eje X la edad en meses (m) y en años (a).



La distribución mensual de la incidencia de los virus respiratorios analizados durante el período en estudio se grafica en la Figura 9. En la misma se observa que la mayor incidencia del HRSV y FluA fue durante el período invernal, mientras que los restantes PIV y HAdV presentaron un patrón de circulación endémico.

Al observar la elevada incidencia del HRSV en los meses de otoño e invierno, se decidió analizar si había correlación entre la incidencia del virus y ciertos factores meteorológicos como la temperatura media mensual, la humedad relativa media mensual y el índice de UV medio mensual. Se realizó una comparación bivariada por el test estadístico de correlación de Spearman (Tabla IV). El mismo permitió determinar que existe una correlación negativa estadísticamente significativa entre la temperatura media y la incidencia de HRSV ($-0,9$, $p < 0,0001$). También se obtuvo un coeficiente negativo cuando se la correlacionó con el índice UV ($-0,92$, $p < 0,0001$). Estos resultados mostraron que cuando la temperatura y el índice UV disminuyeron, coincidente con lo que sucede en los meses de otoño e invierno, la incidencia de HRSV se incrementó significativamente (Figura 10). El análisis que correlacionó al HRSV con la humedad relativa promedio arrojó un valor positivo estadísticamente significativo ($0,6$, $p < 0,0001$).

Figura 9 (Página siguiente). Distribución mensual de los virus respiratorios analizados en el período 1999-2004.

En el eje Y se representa el número de casos con la etiología viral correspondiente encontrada, mientras que en el eje X los meses-años del período en estudio.

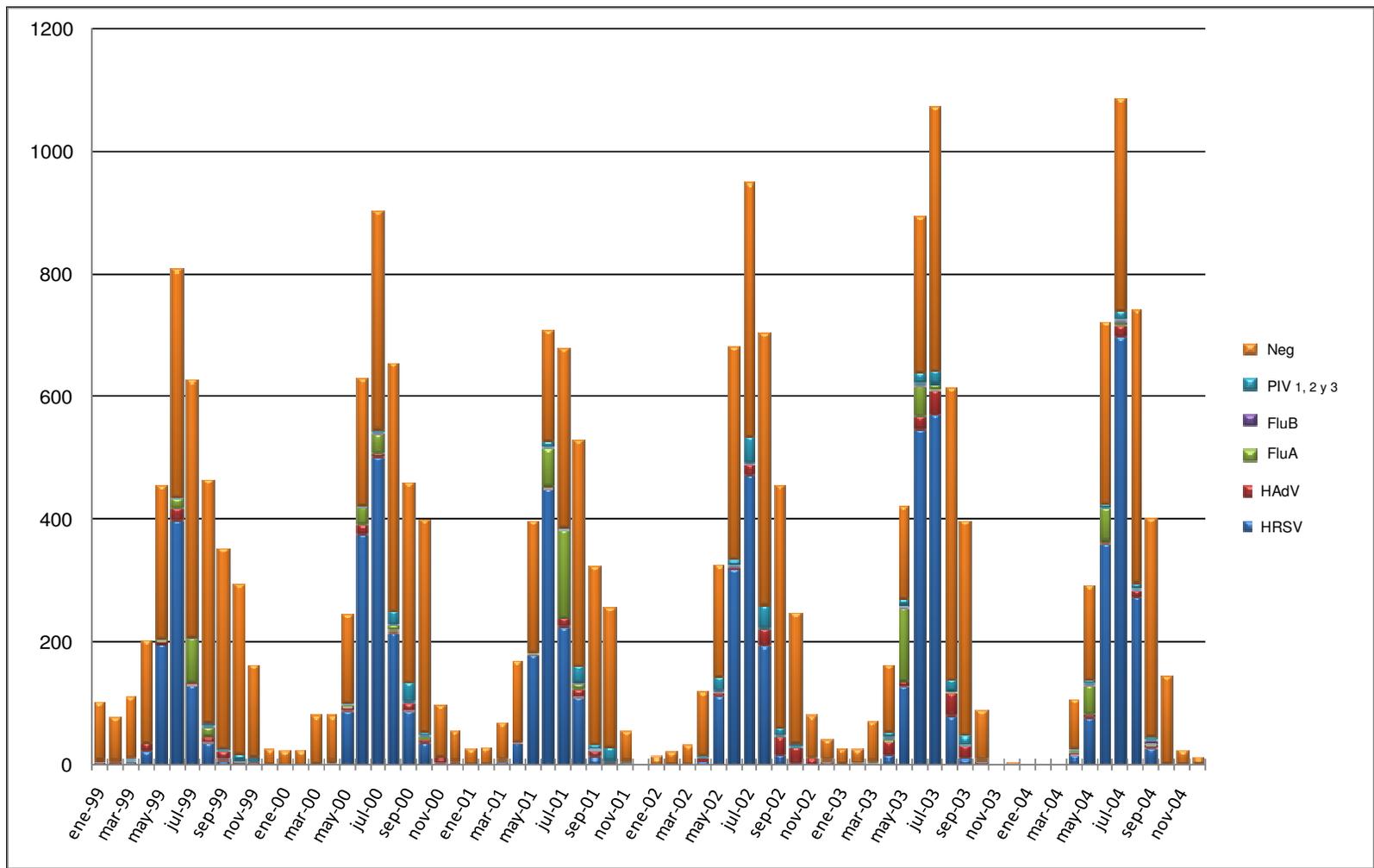


Figura 10. Distribución estacional de la incidencia del HRSV asociado a la temperatura media mensual, humedad relativa media mensual, radiación UVB media mensual (período 1999-2004).

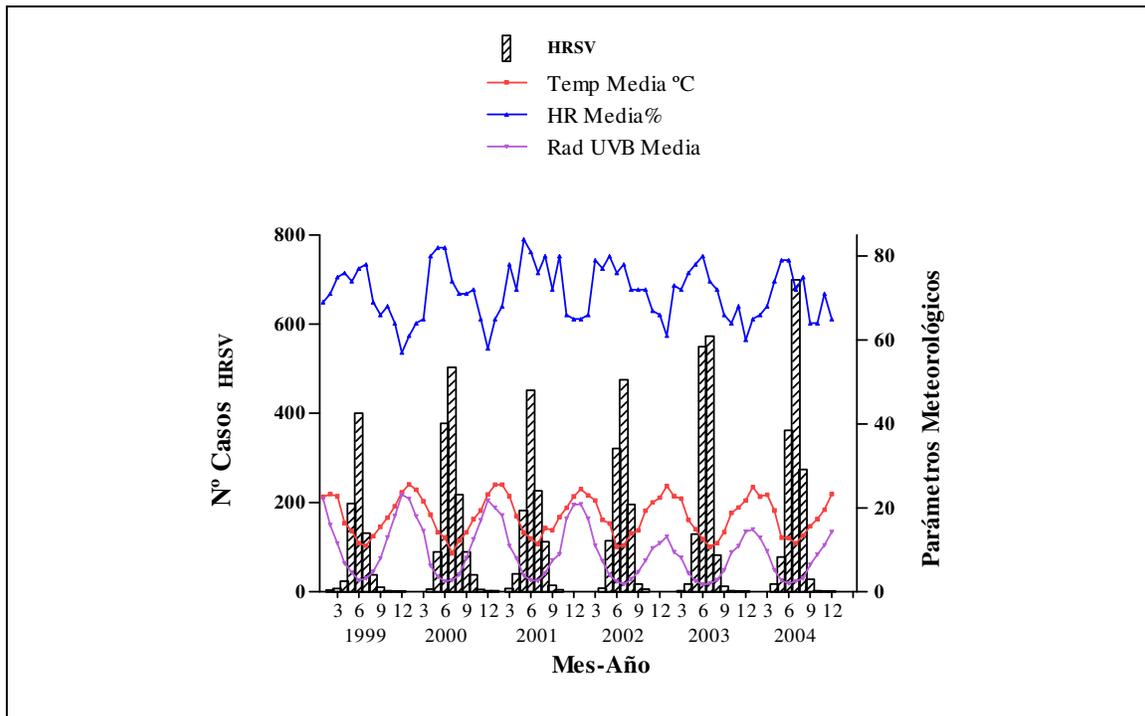


Tabla IV. Valores de coeficientes de correlación de Spearman relacionando incidencia del HRSV y parámetros meteorológicos.

	Coefficiente de Correlación Spearman
Temp. Media	-0,9 (p<0,0001)
Hum. Rel. Prom.	0,6 (p<0,0001)
UVB	-0,92 (p<0,0001)

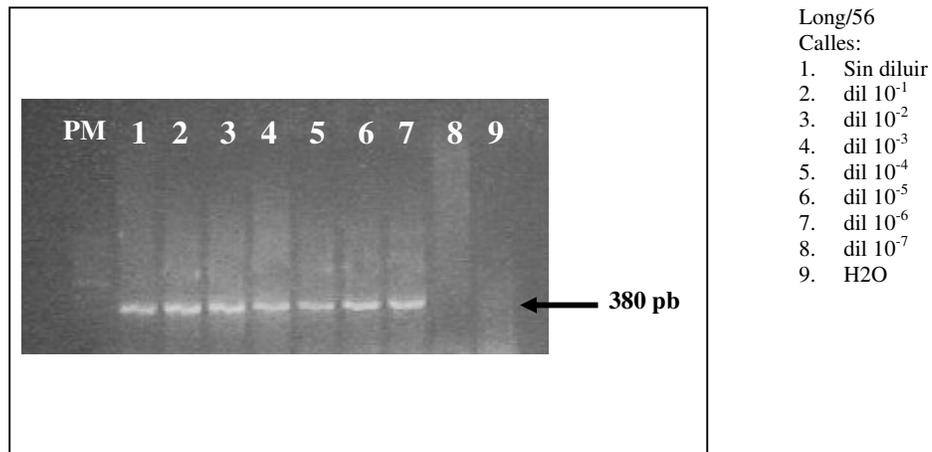
4.2. Análisis Molecular Intermuestras

4.2.1. Distribución de subtipos del HRSV

Para analizar los subtipos de HRSV que circularon durante el período analizado, fue seleccionada una técnica de *multiplex* RT-PCR anidada. Como primer punto de análisis se determinó la sensibilidad de la misma. Para ello se utilizó una muestra de un cultivo de la cepa patrón del subtipo A (Long/56) que había sido titulada por el método de dilución límite (determinando unidades formadoras de placas por mililitro, UFP/ml), encontrándose un título de 4×10^6 UFP/ml. Se realizaron extracciones de ARN de diluciones seriadas en buffer TAE desde 10^{-1} a 10^{-7} de ese cultivo. Luego se amplificaron estos extractos provenientes de las diluciones con la técnica mencionada y los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se determinó que la *multiplex* RT-PCR anidada seleccionada para el análisis detectaba aproximadamente hasta 4 UFP/ml de ANF (detectando hasta la dilución 10^{-6} de la cepa patrón de título 4×10^6 UFP/ml, Figura 11).

Figura 11. Determinación de la sensibilidad de la *multiplex* RT-PCR anidada.

Productos de amplificación sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2%. La flecha indica la posición de la banda de 380 pares de bases esperada para la cepa Long/56, prototipo del subtipo A. PM: patrón de peso molecular, (100-1.000 pb.).



Una vez determinada la sensibilidad de la *multiplex* RT-PCR se procedió a subtipificar los virus de las muestras clínicas. Para hacer este estudio se seleccionaron muestras al azar que representaron toda la duración del brote de cada año, durante los seis años analizados. Se

seleccionaron en total 353 muestras, a las que se les extrajo ARN total el cual se sometió a la técnica descrita. Como resultado de este análisis 232 muestras correspondieron al subtipo A y 121 al subtipo B (65,7% HRSV A y 34,3% HRSV B) (Tabla V).

Tabla V. Distribución anual de subtipos de HRSV encontrados durante el período 1999-2004.

Subtipo de HRSV	N° de muestras analizadas por año						Total (%)
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	
A	21	44	34	18	68	47	232 (65,7)
B	35	0	7	45	24	10	121 (34,3)
Total	56	44	41	63	92	57	353 (100)

Durante el período analizado el subtipo A prevaleció durante tres períodos epidémicos (2001, 2003 y 2004), mientras que el subtipo B predominó durante dos (1999 y 2002). En el año 2000 sólo el subtipo A fue encontrado. En el año 1997 se encontraron dentro de las siete muestras analizadas, cuatro pertenecientes al subtipo A y tres al B.

4.2.2. Análisis molecular del HRSV subtipo A

4.2.2.1. Distribución de patrones de restricción

Con el objetivo de realizar un tamizaje previo de la variabilidad genética del HRSV subtipo A, se decidió analizar por RFLP un grupo de 78 muestras elegidas al azar de las 232 de HRSV previamente subtipificadas. Se realizó con el subtipo A a modo de prueba para determinar si era útil este tipo de análisis para establecer variabilidad *a priori*. Se utilizaron las enzimas de restricción *RsaI*, *PstI* y *HincII* debido a que existían trabajos previos en los que habían sido utilizadas para hacer este análisis. Algunos ejemplos de los patrones de restricción obtenidos de las muestras analizadas correspondientes al año 2001 se muestran en la Figura 12.

Los resultados de la totalidad de las muestras sometidas al análisis de RFLP se presentan en la Tabla VI.

Se encontraron cinco patrones de restricción individuales luego de la digestión con la enzima *RsaI*, dos con la *PstI*, y tres con la *HincII*. En total, el análisis de fragmentos de restricción mostró nueve patrones compuestos distintos (Tabla VI). Entre ellos, dos fueron los más frecuentes durante el período analizado debido a que dieron cuenta del 80% de todas las muestras analizadas. El patrón de restricción compuesto PA1 (ra1pa1ha1) fue encontrado en

el 44,9% de las muestras y el PA2 (ra2pa1ha2) en el 35,9% (p=0,0001), mientras que los patrones compuestos restantes fueron identificados como máximo en el 7,7% de las muestras. Cuando se analizó la distribución anual de los patrones compuestos, no se encontró una evidente distribución alternante entre los mismos durante períodos epidémicos consecutivos, excepto en el período 2001-2003 en el cual en 2001 predominó el patrón PA1, luego en 2002 el PA2, para luego volver a predominar el PA1 en 2003 (Figura 13). Cabe destacar que durante el año 1999 se encontraron seis patrones de restricción compuestos diferentes entre las 12 muestras analizadas, mientras que los otros años como máximo se encontraron cuatro patrones diferentes. Asimismo, los dos últimos años sólo se encontraron los dos patrones principales PA1 y PA2 (Tabla VI y Figura 13).

Figura 12. Análisis de RFLP. Patrones de restricción individuales de los fragmentos amplificados del ectodominio del gen de la glucoproteína G de los HRSV subtipo A correspondientes al brote del año 2001. Los productos de RT-PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *RsaI*, *PstI* y *HincII* y fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 3%. La calle MW (*molecular weight*) corresponde al patrón de peso molecular de 100 pb. (*) La primera letra de la designación representa la enzima de restricción, la segunda letra representa el subtipo de HRSV y el número representa el patrón encontrado.

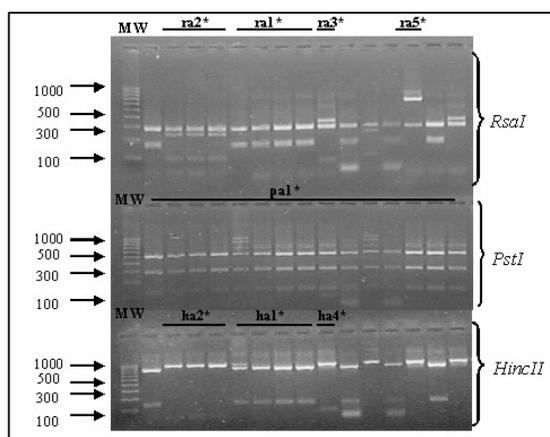
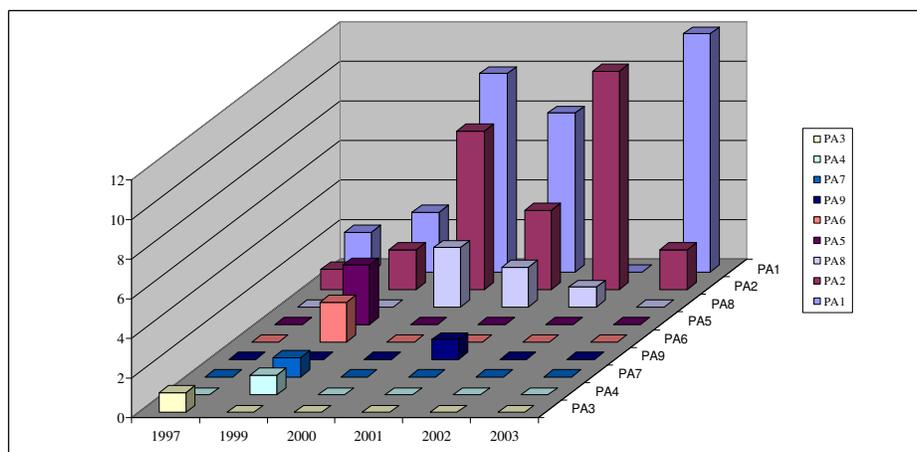


Tabla VI . Distribución de patrones de restricción compuestos e individuales del ectodominio del gen de la glucoproteína G del HRSV subtipo A, durante el período 1999-2003, más casos esporádicos de 1997.

Patrones de restricción compuestos (patrones de restricción individuales)	Nº de cepas analizadas en los siguientes años epidémicos						Total (%)
	1997	1999	2000	2001	2002	2003	
PA1 (ra1pa1ha1)	2	3	10	8		12	35 (44,9)
PA2 (ra2pa1ha2)	1	2	8	4	11	2	28 (35,9)
PA3 (ra1pa2ha1)	1						1 (1,3)
PA4 (ra1pa1ha3)		1					1 (1,3)
PA5 (ra1pa1ha2)		3					3 (3,8)
PA6 (ra4pa1ha1)		2					2 (2,6)
PA7 (ra3pa1ha1)		1					1 (1,3)
PA8 (ra3pa1ha2)			3	2	1		6 (7,7)
PA9 (ra5pa1ha2)				1			1 (1,3)
Total	4	12	21	15	12	14	78 (100)

Figura 13 . Distribución de patrones de restricción compuestos durante el período analizado.

En el eje X se grafican los años, en el eje Y el número de muestras correspondientes a cada patrón y en el eje Z se indica cada patrón compuesto.



4.2.2.2. Análisis filogenético y patrones de distribución de genotipos

Luego de realizar el análisis por RFLP de las cepas de HRSV subtipo A, se procedió a determinar sus genotipos, como así también analizar su evolución y circulación en nuestro país y su relación a las cepas circulantes en el resto del mundo. Para ello se determinó la secuencia nucleotídica en forma directa del ectodominio del gen de la glucoproteína G, empleando como cebadores los oligonucleótidos utilizados previamente para amplificar esa región. El fragmento secuenciado de 751 pares de bases, incluyó las dos regiones variables (RV), la región intergénica entre el gen de G y la proteína F más una porción inicial del gen de esta última (ver organización genómica y del gen de la glucoproteína G en Introducción, puntos 1.9.2 y 1.9.3.4, respectivamente). Luego de eliminar las secuencias no correspondientes a la región de interés, resultó un fragmento de 605 nt de longitud (posiciones 307 a 912 en el gen de la glucoproteína G de la cepa de referencia Long/56 subtipo A (aa 99 a 298)).

Se analizaron un total de 62 secuencias de 605 nt (las mismas en formato fasta se listan en el apéndice 2). Entre éstas, se encontraron cinco grupos con idénticas secuencias nucleotídicas, uno de los ellos comprendió cinco secuencias provenientes del año 2002 (RSVARG180/02, RSVARG958/02, RSVARG1628/02, y RSVARG1711/02), y una de 1999 (RSVARG1432/99), mientras que los grupos restantes estaban compuestos por pares de secuencias correspondientes al mismo año, quedando un total de 53 secuencias únicas.

En primera instancia se procedió a la asignación de genotipos a los virus secuenciados. La misma fue realizada por comparación con cepas previamente genotipificadas correspondientes a distintos brotes anuales provenientes de distintos lugares del mundo. Se realizó un análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas utilizando los distintos criterios de inferencia filogenética detallados en Materiales y Métodos (análisis bayesiano, MV, parsimonia y distancia), para los cuales se obtuvieron de la base de datos de *GenBank* 105 secuencias de la glucoproteína G. Estas secuencias se utilizaron como representativas de los distintos genotipos de HRSV subtipo A (Apéndice 3).

Para aplicar tanto el método de análisis bayesiano como el de MV, se debió determinar el modelo de sustitución nucleotídico que mejor se ajustaba a los datos, utilizando el programa PAUP y el servicio *on line* del Modeltest. El modelo obtenido fue el GTR+I+G (*General time reversible + I +G*) o Modelo General de Tiempo Reversible en el cual la frecuencia de las distintas bases es variable, y la matriz de sustitución es simétrica, más dos parámetros que describen la tasa de variación entre sitios en la secuencia: distribución Gamma (G), y proporción de sitios invariables (I) (Tavaré, 1986) (los parámetros del modelo de sustitución se detallan en apéndice 4). Para los árboles se fijó como secuencia de grupo externo (del inglés *outgroup*) a la cepa patrón Long/56 (cepa más antigua disponible en *GenBank*). En la Figura 14 se muestra el árbol obtenido mediante inferencia bayesiana. En el apéndice 5 (Figuras 1-3 del apéndice) se presenta el resto de los análisis filogenéticos obtenidos por los restantes criterios de inferencia filogenética mencionados. Los mismos fueron realizados con el objetivo de confirmar la topología obtenida por el método mostrado en esta sección, además de comparar su robustez para asignar genotipos.

Se observó que la topología de todos los árboles fue similar desde el punto de vista de agrupamiento de cepas, mostrando dos ramas principales muy bien soportadas por una probabilidad posterior de 1 en el análisis bayesiano de la Figura 14 (ver los soportes de los distintos criterios en apéndice 5). Una de las ramas correspondió al genotipo 1 (GA1), y la otra comprendió al resto de los genotipos descriptos: GA2-GA5, GA7 y BE/A1 (el GA6 no está representado por no haber disponibles en *GenBank* secuencias de la longitud en nt requerida). Como puede observarse las cepas argentinas se agruparon sólo en dos genotipos previamente definidos, GA2 y GA5, no encontrándose ninguna asociada a otro genotipo representado. De las 62 secuencias argentinas, 28 se asociaron con el genotipo GA2 y 34 con el GA5. En la Figura 15, se muestra la distribución de ambos genotipos entre las mismas a lo

largo de cada período epidémico analizado. Los dos genotipos cocircularon durante todo el período, excepto durante el año 2002 en el que sólo el GA5 fue encontrado. Debido a que ambos genotipos cocircularon casi todo el período en estudio, se analizó en función del dato de los meses de aislamiento de cada cepa en cada brote, si hubo alternancia de ambos genotipos durante los distintos meses de un mismo año, encontrándose que también cocircularon durante todos los meses del año.

Analizando la topología de los árboles obtenidos y considerando la distribución de las cepas argentinas en cada genotipo, se observó que las cepas pertenecientes al genotipo GA2, se encontraron distribuidas en todo el clado correspondiente a este genotipo y asociadas con cepas de otras partes del mundo, a diferencia de las del genotipo GA5 (ver más adelante). Además se observó que cepas del mismo año dentro de un determinado genotipo estaban distribuidas en todos los clados del mismo, inclusive asociadas con cepas de otras partes del mundo y de otros años. Por ejemplo, dentro del GA2, la cepa argentina correspondiente al año 1999, RSVARG1493/99, se encontró en un clado asociada a cepas de otras partes del mundo aisladas en diferentes años RSVISTA9/06 (Turquía/06); RSVITRMa/2000/01 (Italia/00/01); RSVQAT19/00 (Qatar/00), RSVKen69/02 (Kenia/02); y a cepas de nuestro país de otros años RSVARG3845/03; RSVARG104/04; RSVARG6885/03, etc. El soporte estadístico para ese clado fue alto, presentando una probabilidad posterior de 1 en el análisis bayesiano. Otra observación interesante en este genotipo es que existió un clado muy bien soportado estadísticamente, formado por cinco cepas correspondientes al año 2003 y una cepa correspondiente al año 2004 (RSVARG1160/04), cepa que no se asoció a ninguna otra de ese mismo año. En cambio, en el caso del genotipo GA5, las cepas argentinas se encontraron asociadas entre sí e inclusive las cepas del mismo año se asociaron unas con otras, excepto en el caso de la cepa RSVARG753/02 que se encontró relacionada a cepas del año 2004. Analizando la distribución de los diferentes genotipos en muestras provenientes de distintos países se observó, como en Argentina, que durante el período de análisis de este trabajo (1999-2004), los genotipos que circularon con mayor frecuencia fueron los encontrados entre las cepas de nuestro país, GA2 y GA5, correspondiendo los genotipos restantes a cepas que circularon en años anteriores en los distintos países. Se excluye de esta observación al genotipo GA7, para el cual se reportaron cepas en Bélgica en los años correspondientes a este estudio (1999, 2000, 2003 y 2005).

Figura 14. Árbol filogenético de cepas del HRSV subtipo A (secuencias de 595 nt del gen de la glucoproteína G) construido por inferencia bayesiana.
 Las cepas argentinas están resaltadas en color rojo. Sólo los valores de probabilidad posterior mayores a 0,6 son mostrados.

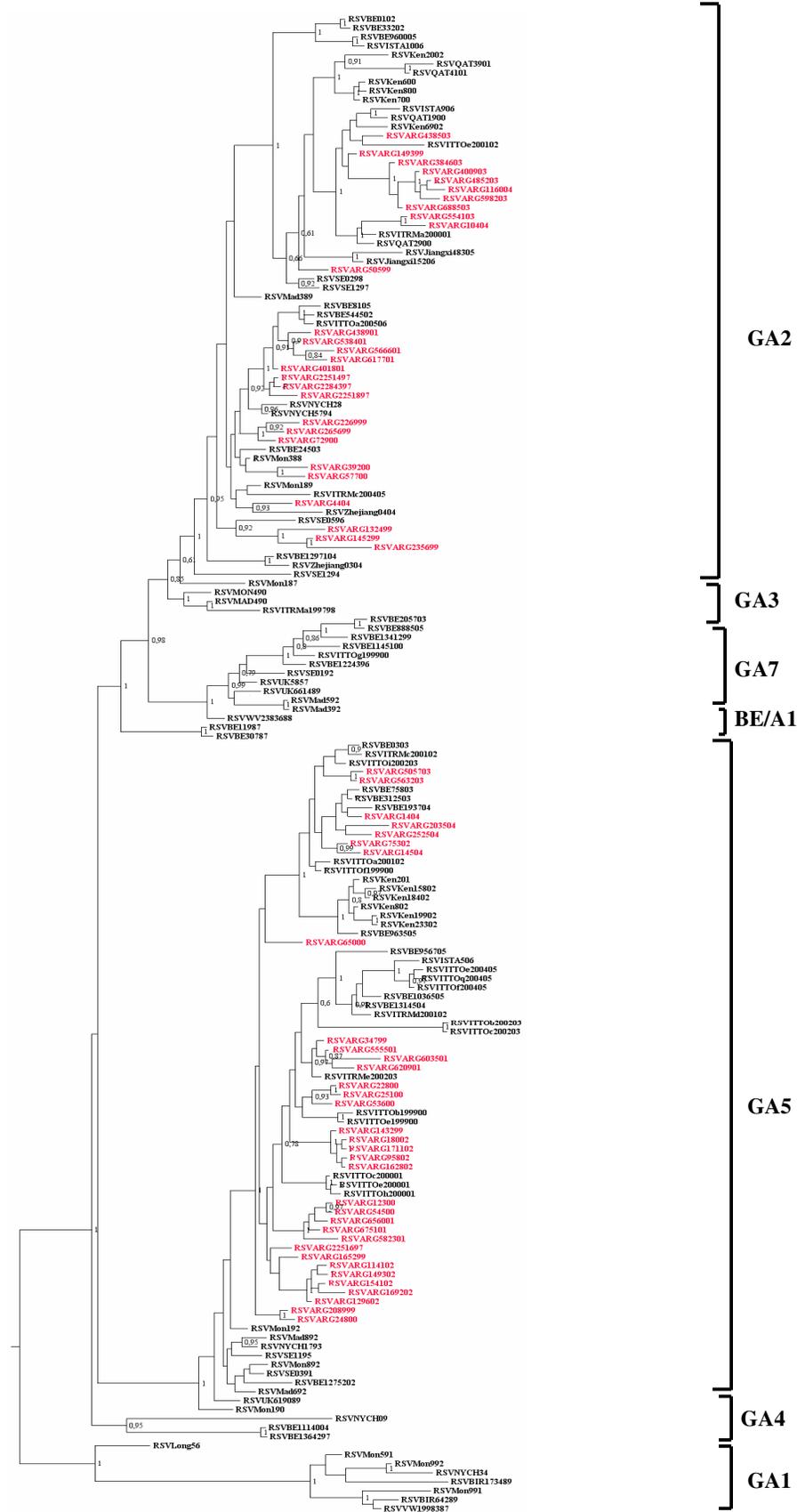
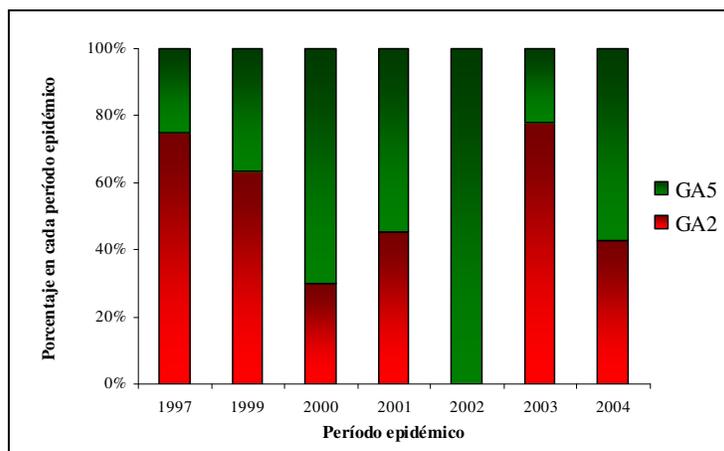


Figura 15. Distribución de genotipos del HRSV subtipo A durante el período 1999-2004, más casos esporádicos de 1997.



Continuando con el estudio de las cepas argentinas del subtipo A y con el objetivo de profundizar aún en su distribución y circulación pero en Argentina exclusivamente, se realizó un análisis de asociación y movimiento de variantes virales dentro de los genotipos a través del período 1997-2004 (excluido 1998). El mismo se realizó utilizando dos métodos adicionales, uno basado en distancias filogenéticas *Neighbour-Joining* y el otro en el análisis de partición y estudio de componentes muy cercanamente relacionadas, a través del cálculo de las distancias de Hamming con el programa PAQ. Inicialmente todas las secuencias argentinas del subtipo A fueron ingresadas al programa y se determinó que un radio de 36 clasificaba a las cepas en los dos genotipos descritos GA2 y GA5. Luego se continuó el análisis con los genotipos por separado debido a que para definir las particiones o clados dentro de los mismos, los valores de radio necesarios para obtener el mejor resultado de agrupamiento eran muy diferentes. Esta diferencia ya había sido observada en el análisis filogenético previo en el cual se advirtió una mayor divergencia para el GA2 (ver más adelante el análisis de variabilidad nt y aa). En las Figura 16 a) y b) se muestran los resultados del análisis por los dos métodos aplicados para cada genotipo.

Para el caso del GA2, a partir de un radio de 13 se generaron cuatro subpoblaciones, particiones o clados distintos no superpuestos (clados 1-4). Entre éstos, el clado 1 (rojo) fue el más numeroso con 13 cepas en total, seguido por el clado 2 (azul) con nueve cepas, luego los clados 4 (verde) con tres cepas y el 3 (celeste) con dos cepas. El gráfico de círculos muestra en el caso del clado 1 que cepas agrupadas dentro del mismo, se presentaron en forma continua durante los años 1997, 1999-2001, luego dejaron de detectarse durante el período

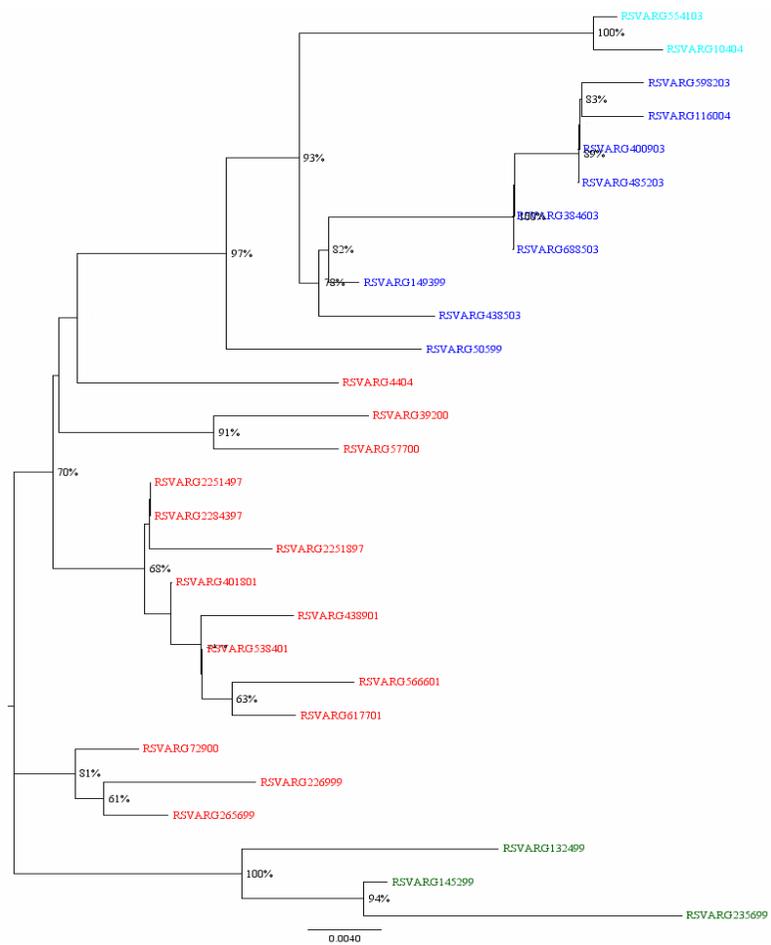
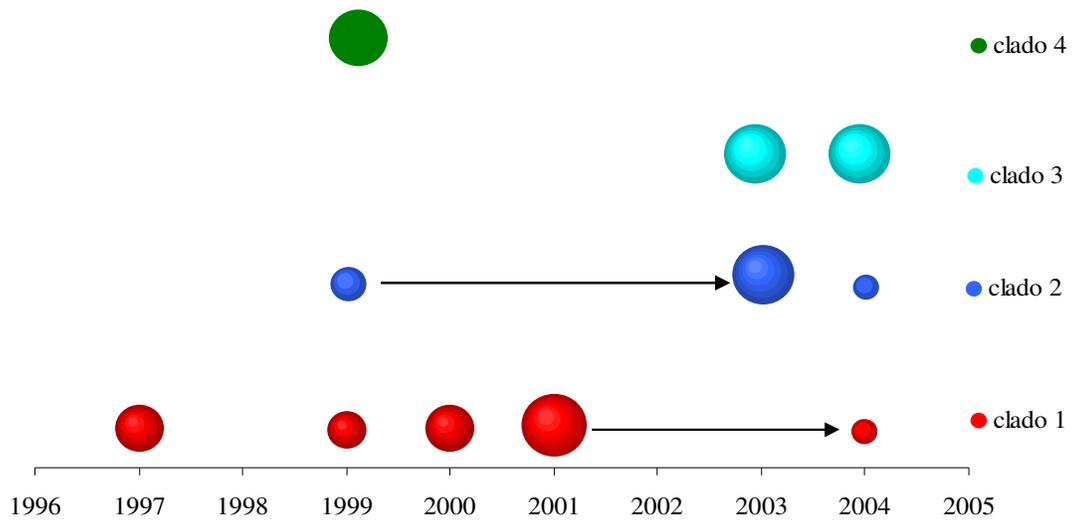
2002-2003 y reemrgeron en el año 2004. Un resultado similar se encontró con las cepas agrupadas dentro del clado 2, dos de las cuales se presentaron en el año 1999, dejaron de circular durante un período de tres años (2000-2002) para reemerger con un número notable de cepas en los años 2003 y 2004. En cambio, para el caso del clado 4 se encontraron cepas que sólo circularon durante el año 1999 y posteriormente desaparecieron. En el análisis por *Neighbour-Joining* mostrado en la parte inferior de la Figura 16 a) puede observarse como las cepas se asociaron en clados filogenéticos acordes con los resultados del análisis de partición.

Para el GA5 un radio de ocho generó cuatro subpoblaciones, particiones o clados (clados 1-4), los cuales pudieron asociar a las cepas en grupos no superpuestos excepto para tres de las 34 cepas correspondientes a este genotipo que quedaron excluidas. Éstas fueron RSVARG650/00, RSVARG6035/01 y RSVARG2035/04. Para establecer a qué clado obtenido del análisis de partición se asociarían definitivamente cada una de las tres cepas, se determinó cuál era la distancia genética o radio mínimo de la cepa a la secuencia centro de cada clado. Así las cepas RSVARG650/00 y RSVARG6035/01 se asociaron al clado 2 dentro del GA5, debido a que era frente al que presentaban el menor radio (radios: 9 y 10, respectivamente), y la cepa RSVARG2035/04 se asoció al clado 1 (radio: 12). De esta manera, el clado 1 (azul) quedó con siete cepas asociadas, el clado 2 (rosa) con 17 cepas, los clados 3 (rojo) y 4 (verde) con cinco cepas cada una. En el gráfico de círculos presentado en la Figura 16 b) pude observarse, como cepas pertenecientes a un clado como el 3, circularon en 1999, no se detectaron durante los años 2000 y 2001, reaparecieron en el 2002 y nuevamente dejaron de circular en 2003 y 2004. En cambio las cepas asociadas en el clado 2 permanecieron circulando en la población durante el período 1997-2002 (excluido 1998) y dejaron de detectarse durante los años 2003 y 2004. Luego los clados 1 y 4 tuvieron sus apariciones durante años sucesivos, el clado 1 en los años 2002-2004, siendo las cepas pertenecientes al mismo las únicas encontradas en los años 2003 y 2004 dentro del GA5, mientras que el clado 4 sólo se presentó durante los años 2000 y 2001 (Figura 16 b)).

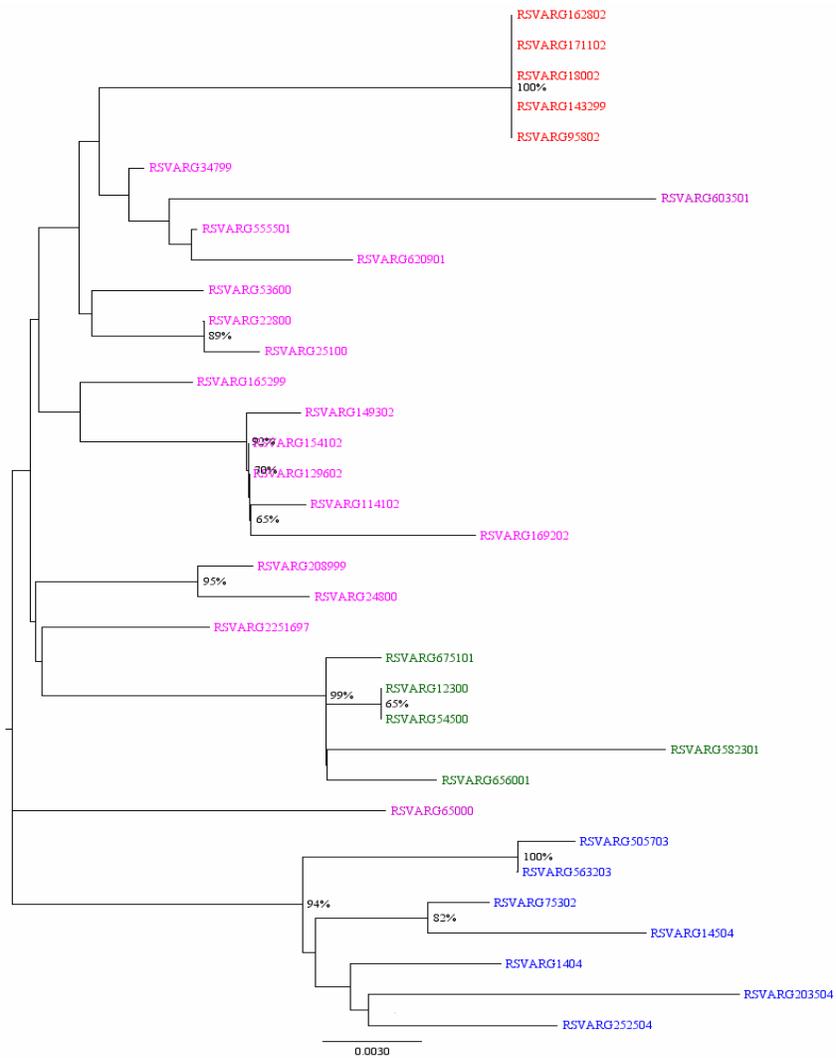
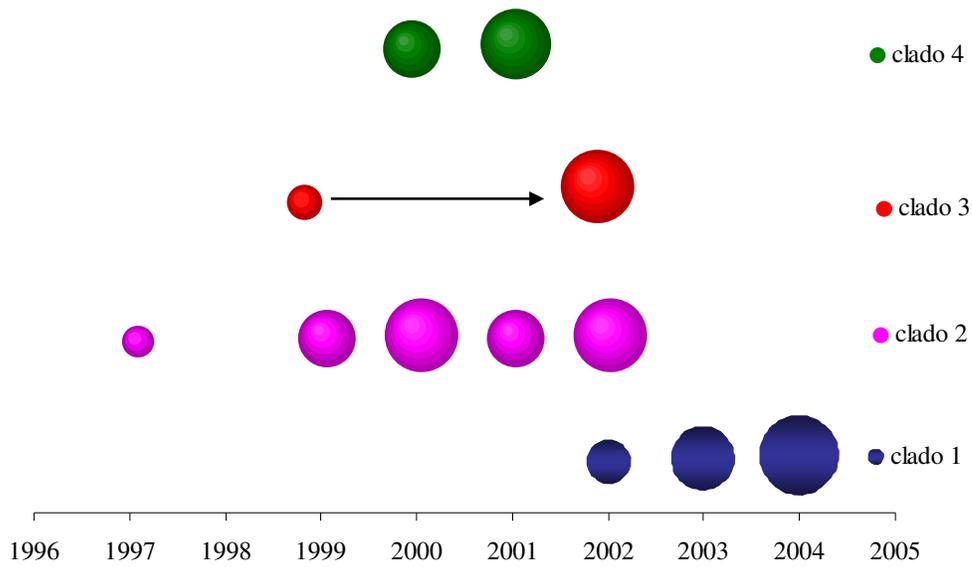
Figura 16 (páginas siguientes). Análisis de Partición identificando diferentes subpoblaciones de cepas argentinas dentro los genotipos a) GA2 y b) GA5 en el tiempo.

Cada conjunto de círculos de un mismo color representa particiones o grupos definidos por el programa PAQ. El diámetro relativo de cada círculo es proporcional al número de secuencias contenidas dentro de cada clado en un momento determinado de tiempo (año). Las flechas indican períodos de tiempo con ausencia de cepas. Para ambos genotipos también se muestran los árboles filogenéticos obtenidos por el método de distancias *Neighbour-joining* usando el modelo de sustitución de Kimura 2-Parámetros. Los valores en los nodos indican los porcentajes de bootstrap sobre 1.000 replicados. La barra al pie indica el número de sustituciones por sitio. A cada cepa se le asignó un color que se corresponde a cada clado obtenido por el programa PAQ.

a) GA2



b) **GA5**

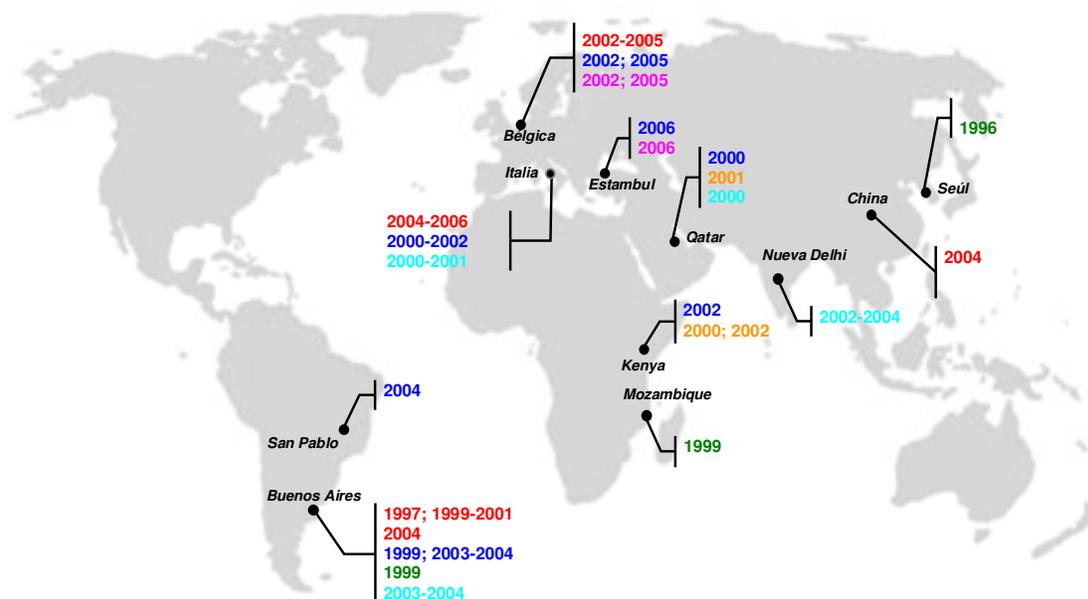


Analizando en forma global la relación entre las cepas argentinas y el total de las cepas incluidas en los análisis filogenéticos realizados, poniendo énfasis en los años de aislamiento y localización geográfica de las distintas cepas, se buscó un patrón que describa las características filodinámicas del HRSV subtipo A. Para ello se analizaron nuevamente ambos genotipos por separado. De los árboles filogenéticos obtenidos previamente más el agregado de nuevas secuencias obtenidas de *GenBank*, algunas disponibles con menores longitudes (que abarcaban la 2° RV de G), se determinaron subgrupos o clados dentro de cada genotipo, los cuales asociaron o no a cepas argentinas con las reportadas en el resto del mundo. Esos subgrupos se ubicaron geográficamente en un mapa planisferio, relacionados con los años de aislamiento. En las Figura 17a) y b) se muestra la georeferenciación para ambos genotipos, como así su relación a los clados o linajes que habían sido obtenidos para las cepas argentinas en el análisis por partición previo.

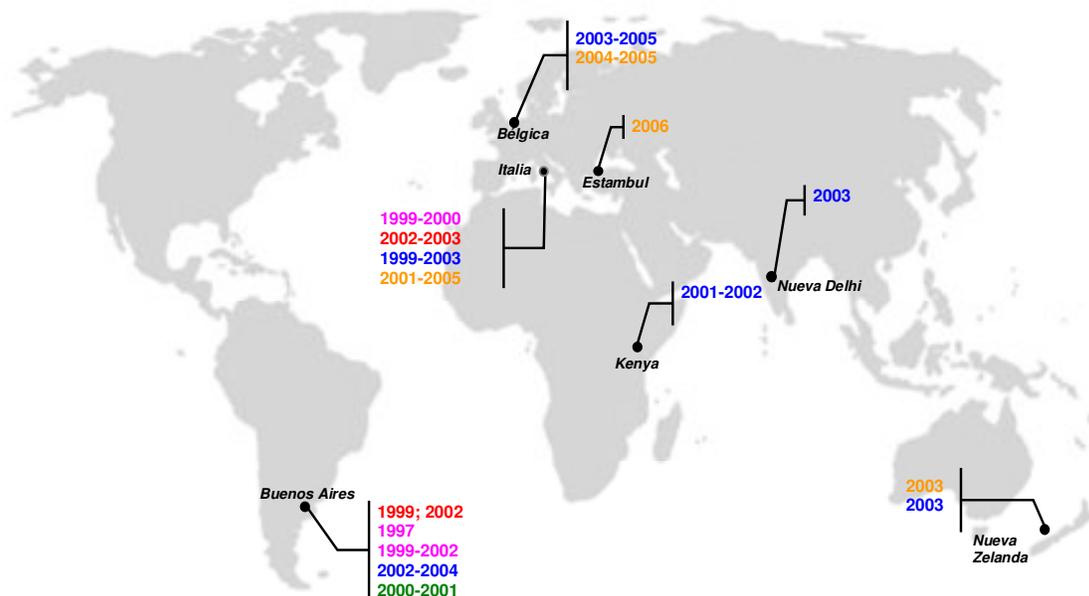
Figura 17. Distribución geográfica mundial de las secuencias del HRSV subtipo A. En cada país se indica el o los clados que fueron encontrados entre las secuencias reportadas y el año de aislamiento.

a) Dentro del genotipo GA2 se indican el clado 1 (rojo); clado 2 (azul); clado 3 (celeste); clado 4 (verde); clado 5 (rosa) y clado 6 (naranja). Los clados desde el 1 al 4 y sus colores se corresponden con los definidos en la Figura 16-a) del análisis de partición. b) Dentro del genotipo GA5 se indican el clado 1 (azul); clado 2 (rosa); clado 3 (rojo); clado 4 (verde) y clado 5 (naranja). Los clados desde el 1 al 4 y sus colores se corresponden con los de los definidos de la Figura 16-b) del análisis de partición.

a)



b)



4.2.2.3. Análisis de la variabilidad de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas

Del análisis molecular de las secuencias argentinas correspondientes a ambos genotipos y a partir de sus alineamientos de nucleótidos, se obtuvieron valores de diversidad nucleotídica media por sitio por ciento de 3,21% (desviación estándar, DS 0,25%) para el genotipo GA2, con un número total de 105 sitios polimórficos, mientras que para el GA5 el valor fue de 2,07% (DS 0,13%), con un total de 85 sitios polimórficos. Las diferencias halladas en los valores de diversidad para los dos genotipos mostraron ser estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) como venía observándose desde el punto de vista filogenético en los análisis previos. La diversidad total para las cepas argentinas representada como el número medio de diferencias en nucleótidos por sitio por ciento fue de 5,41% (DS 0,19%), con 179 sitios polimórficos totales encontrados entre las 62 secuencias argentinas estudiadas en conjunto. Las comparaciones de los alineamientos de secuencias nucleotídicas mostraron que todos los cambios genéticos observados entre las secuencias argentinas fueron sustituciones de nucleótidos, no habiéndose encontrado deleciones, inserciones ni cambios en el marco de lectura. Del mismo modo se observó que las transiciones (Ti) fueron más frecuentes que las transversiones (Tv) para ambos genotipos, con un valor global de la tasa de Ti/Tv (κ) de 4,6.

Con el objetivo de cuantificar el cambio evolutivo para HRSV subtipo A durante el período de estudio, se calculó la tasa de sustitución nucleotídica utilizando un método bayesiano a

través del programa Beast, que resultó en un valor medio de $1,419 \times 10^{-3}$ sustituciones nt/sitio/año (IC 95%=1,169-1,677 $\times 10^{-3}$). Para comprobar si la mayor diversidad se asociaba con mayor tasa de sustitución por sitio por año, se calcularon las tasas de manera individual para GA2 y GA5, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre ambos valores ($3,0617 \times 10^{-3}$ sustituciones nt/sitio/año vs $2,8801 \times 10^{-3}$ sustituciones nt/sitio/año, respectivamente).

En relación al análisis a nivel aminoacídico de HRSV subtipo A se obtuvo el alineamiento de las secuencias de aminoácidos inferidas utilizando el código genético universal, las mismas presentaron una longitud de 297 ó 298 aminoácidos como ha sido observado para la glucoproteína G de este subtipo. El cálculo de diversidad aminoacídica media por sitio por ciento resultó en un valor de 10,4% (DS 1,2%), mientras que cuando se realizó el mismo análisis pero para ambos genotipos por separado, se obtuvo un valor de 5,3% (DS 0,8%) para el GA2, y de 3,1% (DS 0,6%) para el GA5, diferencias estadísticamente significativas para ambos genotipos ($p < 0,0001$). Las longitudes de la proteína para ambos genotipos fueron diferentes, para el caso de GA2, algunas cepas presentaron una longitud de 297 aa y otras 298 aa, mientras que las cepas del GA5 presentaron una longitud uniforme de 298 aa.

Analizando las características de las mutaciones encontradas en los alineamientos, en forma general, 57 sustituciones correspondieron a cambios sinónimos (*S*), mientras que un total de 93 llevaron a cambios de reemplazo aminoacídico o no sinónimos (*N*). Cuando se analizó la distribución de los cambios *N* para ambos genotipos por separado (debido a las diferencias encontradas previamente en los valores de diversidades tanto nucleotídicas como aminoacídicas), se observó que ambos genotipos presentaron el mismo número de cambios *N* en su segunda región variable ($N=32$), mientras que en la primera región variable se observó para el GA2 un mayor número de cambios que los encontrados para el GA5 ($N=20$ vs 13, respectivamente).

Como consecuencia de la observación de que para HRSV la mayoría de las sustituciones nucleotídicas llevan a cambios aminoacídicos, se calculó el valor global promedio de dN/dS (ω) que fue de 0,655 ($p < 0,05$) sugiriendo que las sustituciones no sinónimas tienen 65,5% más chances de fijarse en la población que las sinónimas, aunque en promedio la proteína G se encontraría bajo una fuerte selección purificadora ($\omega < 1$). Cuando se hizo el cálculo detallado de dN/dS por sitio se encontró que un total de 16 codones no fueron neutrales, de los cuales tres presentaron evidencias de selección positiva, mientras que los 13 restantes

selección negativa, calculado por al menos uno de los tres métodos disponibles en el paquete del programa HyPhy y realizados a través de su servidor *on line* Datamonkeyweb (Tabla VII).

Tabla VII. Sitios con selección positiva y negativa en cepas argentinas del HRSV subtipo A.

Se determinaron los valores de dN/dS sitio por sitio mediante los métodos SLAC, FEL y REL. Los residuos aa correspondientes y el tipo de selección para cada codón están indicados. Para los métodos SLAC y FEL se utilizó un nivel de significancia de 0,05, y un factor de Bayes de 50 para REL.

Codón	SLAC $dN-dS$	SLAC p	FEL $dN-dS$	FEL p	REL $dN-dS$	REL Factor Bayes	aminoácido	Tipo de Selección
105	-8,289	0,045	-2,650	0,049	-1,990	9,148	Ser (Thr)	Negativa
135	-5,876	0,072	-3,277	0,049	-1,727	7,078	Asn	Negativa
139	-4,737	0,111	-5,808	0,013	-1,994	10,818	Thr	Negativa
143	-7,105	0,037	-2,440	0,020	-2,003	13,189	Pro	Negativa
153	-5,876	0,072	-3,277	0,049	-1,727	7,078	Asn	Negativa
166	-8,954	0,032	-13,024	0,001	-2,263	18,123	Glu	Negativa
184	-7,105	0,037	-2,539	0,015	-2,025	14,989	Ala	Negativa
195	-4,737	0,115	-4,847	0,010	-2,010	13,332	Gly	Negativa
208	-4,887	0,104	-3,379	0,010	-1,932	18,476	Ile	Negativa
236	-4,744	0,111	-2,707	0,013	-1,829	16,735	Ile	Negativa
256	8,9	0,023	3,185	0,056	0,461	14,308	Leu-Pro-Ser	Positiva
257	-4,654	0,173	-7,151	0,026	-1,514	7,769	Glu	Negativa
267	-2,368	0,356	-2,729	0,048	-1,401	9,334	Ser	Negativa
280	-18,988	0,003	-3,877	0,042	-2,191	205,910	Tyr (His)	Negativa
286	7,520	0,031	1,660	0,097	0,551	24,111	Leu-Ile-Pro	Positiva
289	2,368	0,444	0,966	0,097	0,748	61,416	Pro-Ser-Thr	Positiva

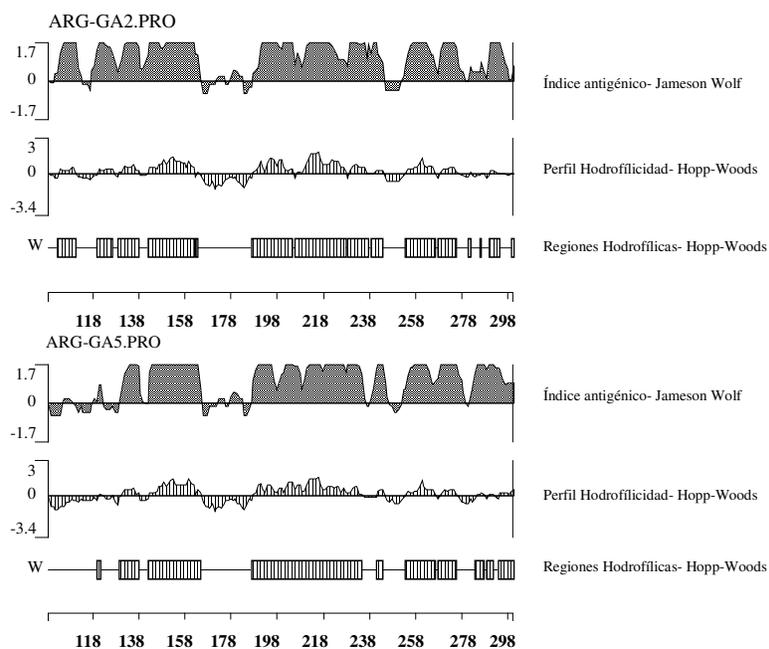
Continuando con las diferencias encontradas entre ambos genotipos, se realizaron los cálculos de dN/dS globales y por sitio para los dos genotipos por separado, y curiosamente los resultados fueron muy distintos. Para el caso del GA2, el valor dN/dS global fue de 0,7219 ($p < 0,05$) y se encontraron 23 sitios sujetos a selección positiva, mientras que sólo 10 con evidencia de selección negativa. Mientras que para el GA5, el cálculo global dio un valor menor, de 0,4869 ($p < 0,05$) y no se encontró evidencia de selección positiva sobre ningún sitio, mientras que se encontraron 29 sitios con probable selección negativa.

El análisis de las sustituciones para ambos genotipos, detallado previamente, se realizó con las secuencias aminoacídicas inferidas a partir de las secuencias de 605 nucleótidos de longitud, observándose las diferencias mencionadas, mientras que cuando se hicieron los cálculos utilizando sólo el tercio terminal de la glucoproteína G (longitud de secuencia normalmente utilizada en la mayoría de los trabajos sobre epidemiología molecular de

HRSV), las diferencias que habían sido significativas en cuanto a la diversidad dejaron de serlo. Con el objetivo de explicar estas observaciones, se analizó el perfil antigénico de ambos genotipos por separado (utilizando las secuencias completas, aa 98 a 297/298 de la cepa de referencia). Se obtuvieron secuencias aminoacídicas consenso para ambos genotipos y ambos perfiles se analizaron con el programa Protean (Figura 18). La comparación del índice antigénico de Jameson-Wolf y las regiones hidrofílicas de Hoop-Woods para las secuencias consenso mostraron que la mayoría de las regiones antigénicas en el tercio 3' terminal del ectodominio de G fueron muy similares para ambos genotipos. Mientras que la misma comparación para la primera región variable del ectodominio (aa 98 a 164) mostró que la secuencia de GA2 presentó al comienzo de la misma dos regiones antigénicas más que GA5 (entre los aa 98 y 120), con un índice de Jameson-Wolf por encima de 1,7 y mayor hidrofiliidad (Figura 18). A parte de ésto, se observó en ambos perfiles una región con menor índice de Jameson-Wolf e hidrofiliidad que incluyó los aa 164 a 187, coincidentes con la zona de unión al receptor celular (zona altamente hidrofóbica).

Figura 18. Comparación de perfiles antigénicos del ectodominio de la glucoproteína G completo.

Las cepas argentinas correspondientes a cada genotipo fueron analizadas como secuencias consenso. El índice antigénico de James-Wolf y las regiones hidrofílicas de Hopp-Woods fueron obtenidos con el programa Protean. ARG-GA2 y ARG-GA5 representan las secuencias consenso obtenidas con todas las secuencias argentinas de GA2 y GA5, respectivamente. Los números de la regla corresponden a los aminoácidos 98 a 298 de la cepa de referencia Long/56.



Por otro lado se predijeron los sitios potenciales de N- y O-glucosilación mediante los programas N-GlycoSite y NetOglyc, respectivamente. En el alineamiento de la Figura 19 se indican los seis sitios potenciales de N-glucosilación encontrados en las cepas argentinas con la secuencia NX[ST], donde X no es Pro. Para que fuera más claro el gráfico, no se indicaron los sitios de N-glucosilación que fueron generados en secuencias individuales. Dos de los residuos (Asn103 y Asn135) se encontraron en la primera región variable en todas las secuencias analizadas, y los cuatro restantes en la segunda región variable. Para ambos genotipos circulantes en Argentina los residuos Asn237 y Asn294 fueron compartidos, mientras que la Asn251 fue exclusiva del GA2, y los sitios Asn250 y Asn273 del GA5.

En cuanto a los sitios potenciales de O-glucosilación se encontró que las dos regiones variables de la glucoproteína G presentaron un alto porcentaje de los mismos, por tal motivo no se marcaron en el alineamiento de aminoácidos sino que se graficaron como potencial de O-glucosilación versus la posición del aminoácido para el caso de una secuencia particular, pero que representó el patrón general (Figura 20). Si bien el perfil de O-glucosilación se mantuvo constante entre todas las secuencias argentinas analizadas, mostrando que los sitios se encontraron distribuidos a lo largo de las dos regiones variables de la glucoproteína G, en cada una en particular hubo ciertas posiciones variables que llevaron a ganar o perder estos sitios. Por otro lado es importante destacar que la región central, donde no se encontraron sitios de glucosilación y donde se observó la menor variabilidad genética (región subrayada en el alineamiento de la Figura 19), corresponde al posible sitio de unión del virus al receptor celular. Asimismo las cuatro C (Cys) ubicadas en las posiciones 173, 176, 182 y 186 asociadas posiblemente a la unión al receptor celular dentro de esta región conservada, permanecieron invariantes en todas las secuencias analizadas (Figura 19), mostrando probablemente restricciones de tipo estructurales que no le permitieron variar en el tiempo.

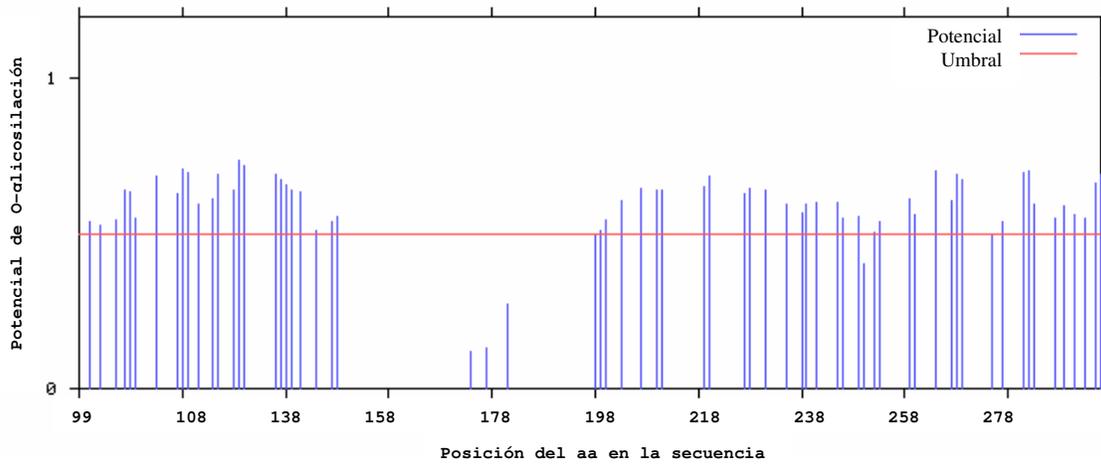
El alto número de sitios potenciales de N- y O-glucosilación se encontró en concordancia con la composición de los aminoácidos en mayor proporción para esta glucoproteína G: 23% de T (Thr), 11% de S (Ser), y 8% de N (Asn) entre otros.

Figura 19 (Página siguiente). Alineamiento de aminoácidos de las cepas del HRSV argentinas subtipo A. Las secuencias argentinas fueron inferidas utilizando el código genético universal y las mismas fueron alineadas usando el programa Clustal X. La posición de los codones fue referida a la cepa patrón Long/56. Con una flecha se indican los sitios potenciales de N-glucosilación. La región probable de unión al receptor se encuentra marcada con una línea negra.

RSVAR62251497
 RSVAR62251897
 RSVAR62284397
 RSVAR62251697
 RSVAR634799
 RSVAR650599
 RSVAR6132499
 RSVAR6143299
 RSVAR6145299
 RSVAR6149399
 RSVAR6165299
 RSVAR6208999
 RSVAR6226999
 RSVAR6235699
 RSVAR6265699
 RSVAR612300
 RSVAR622800
 RSVAR624800
 RSVAR625100
 RSVAR639200
 RSVAR653600
 RSVAR654500
 RSVAR657700
 RSVAR672900
 RSVAR6438901
 RSVAR6538401
 RSVAR655501
 RSVAR6566601
 RSVAR6582301
 RSVAR6603501
 RSVAR6617701
 RSVAR6620901
 RSVAR6656001
 RSVAR6675101
 RSVAR618002
 RSVAR675302
 RSVAR695802
 RSVAR6114102
 RSVAR6129602
 RSVAR6149302
 RSVAR6154102
 RSVAR6162802
 RSVAR6169202
 RSVAR6171102
 RSVAR6384603
 RSVAR6400903
 RSVAR6438503
 RSVAR6485203
 RSVAR6505703
 RSVAR6554103
 RSVAR6563203
 RSVAR6598203
 RSVAR6688503
 RSVAR61404
 RSVAR64404
 RSVAR610404
 RSVAR614504
 RSVAR6116004
 RSVAR6203504
 RSVAR6252504

Figura 20. Sitios potenciales de O-Glucosilación.

Se grafica Potencial de O-glucosilación vs la posición del aa en la secuencia de la glucoproteína G de una cepa de HRSV subtipo A analizada con el programa NetOglyc. Se utilizó un umbral de 0,5 como punto de corte para definir los sitios. Este perfil se mantuvo en todas las secuencias analizadas.



4.2.3. Análisis molecular del HRSV subtipo B.

4.2.3.1. Detección de los HRSV subtipo B con la duplicación de 60 nt

Continuando con el análisis molecular y filogenético del HRSV en el período 1999-2004, se procedió a analizar a nivel molecular las muestras correspondientes al subtipo B.

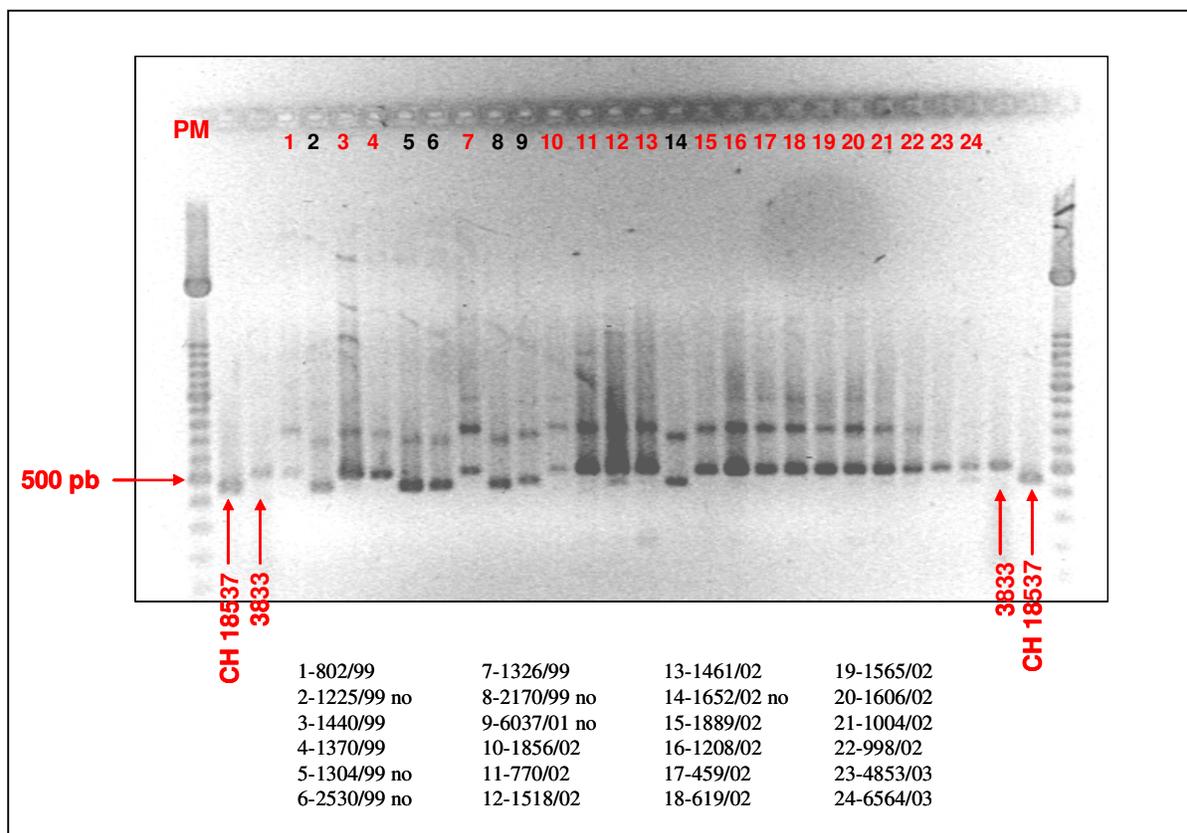
Como se mostró previamente en la Tabla V (sección 4.2.1), durante el período de estudio se encontraron por *multiplex* RT-PCR anidada un total de 121 muestras correspondientes al subtipo B sobre un total de 353 analizadas, encontrando que este subtipo prevaleció en los años 1999 y 2002, mientras que en el año 2000 no se encontraron muestras del mismo ($p < 0,0001$).

Posteriormente se amplificó el gen de la glucoproteína G de muestras elegidas al azar durante el período de estudio. Para ello se utilizaron los cebadores descritos en la sección materiales y métodos: OG₁₋₂₁ y F164, que generaron un fragmento de 1.162 nt. Curiosamente, cuando se analizaron los productos de amplificación en un gel de agarosa se encontró que 47 cepas tenían un retraso casi imperceptible en la migración del fragmento de PCR, debido tal vez a una pequeña diferencia de tamaño de esos fragmentos. Esta observación se hallaba en coincidencia con lo descrito por Trento y col en tres cepas del año 1999 (Trento *et al.*, 2003). Para poder confirmar este hallazgo en las cepas analizadas en este trabajo de Tesis, se decidió realizar a esas muestras una nueva RT-PCR con los cebadores F164 y OG_{CH496+}. Los cebadores amplificaban un fragmento de menor longitud (471 nt) que permitiría determinar si había alguna diferencia de tamaño en el gen de las muestras a las que se les había observado esa disminución en la migración. En la Figura 21 se muestra la foto de un gel de agarosa en el cual se sometieron a electroforesis varias de las muestras que presentaron esta particularidad y donde se pueden observar las diferencias en migración de las mismas, aquellas que corrieron como la cepa patrón para el subtipo B, CH18537/63 con un fragmento amplificado de 471 nt y aquellas que poseían un tamaño mayor de amplificado, entre 500 y 600 nt, que corrieron como la cepa cedida por los colegas del CEMIC (RSVBA3833/99), a la cual se le había confirmado, por secuenciación, la presencia de una inserción de 60 nt. De esta manera se confirmó que las 47 muestras subtipo B poseían una longitud mayor en el gen de la glucoproteína G y que se estaría ante la existencia de una inserción de una longitud no descrita hasta el momento para HRSV en el resto del mundo, ya que sólo se habían descrito inserciones puntuales de adenosinas (García-Barreno *et al.*, 1989).

En la Tabla VIII se lista el número de muestras del subtipo B que presentaron la inserción en relación a las muestras totales y a las que no la poseían, discriminadas por año.

Figura 21. Determinación del tamaño de los productos de amplificación del HRSV subtipo B amplificados con los cebadores F164 y OG_{CH496+}.

Productos de amplificación sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2%. La flecha horizontal indica la posición de la banda de 500 pb del patrón de peso molecular (100-1.500 pb). Con flechas verticales se indican las cepas utilizadas como controles de tamaño: CH18537/63 (cepa patrón de HRSV B sin inserción) y BA3833/99 (control de HRSV con inserción en gen de glucoproteína G, CEMIC). Al pie de la fotografía se listan las muestras analizadas y con un “no” se marcan las que no presentaron inserción.



A partir de este hallazgo, se decidió continuar con el análisis de estas cepas en el transcurso del tiempo, con el propósito de estudiar un evento genético no descrito para el HRSV y que podría aportar datos más interesantes sobre la evolución y circulación del HRSV.

4.2.3.2. Análisis filogenético y molecular

Con el objetivo de determinar cuál era el tamaño de la inserción encontrada en estas muestras, de estudiar su variabilidad a nivel nucleotídico y aminoacídico, de analizarlas desde el punto de vista filogenético y determinar el momento en el que se generaron, se continuó con la secuenciación completa del gen de la glucoproteína G. En 35 muestras se obtuvo la secuencia completa del gen de G, conteniendo las dos regiones variables (RV), más la región

transmembrana (Tabla VIII). Se intentó determinar con la secuenciación completa de G si en este caso habría en el resto del gen alguna delección que compensara a la proteína que presentaba estas características.

Tabla VIII. Circulación de cepas del HRSV subtipo B en Buenos Aires durante el período 1999-2004.

	Nº cepas HRSV ^a	Nº cepas HRSV B ^b (%)	Nº cepas HRSV B con inserción ^c (%)	Secuencias completas ^d
1999	56	35 (62,5)	5 (14,3)	4
2000	44	0 (0,0)	0 (0,0)	0
2001	41	7 (17,1)	1 (14,3)	0
2002	63	45 (71,4)	23 (51,1)	22
2003	92	24 (26,1)	12 (50,0)	6
2004	57	10 (17,5)	6 (60,0)	3

a. Número de muestras que resultaron positivas por *multiplex* RT-PCR anidada para la subtipificación de HRSV.

b. Número de muestras de HRSV que fueron clasificadas como subtipo B por *multiplex* RT-PCR anidada.

c. Número de muestras de HRSV subtipo B que presentaron bandas de mayor tamaño que la cepa patrón CH18537/63, indicativo de que presentaban una inserción en el gen de la glucoproteína G.

d. Número de muestras del subtipo B para los cuales se pudo obtener la secuencia completa de G.

De las muestras restantes, sólo se pudo obtener la secuencia parcial en 11 casos (tercio terminal del gen de la glucoproteína G) y para la única muestra correspondiente al año 2001 no se pudo obtener ninguna secuencia. La razón de estos resultados es que todas las amplificaciones se realizaron sobre las muestras clínicas directamente, ésto provocó que en algunos casos se hayan agotado las mismas, no permitiendo obtener resultados positivos en las secuencias, o se hayan obtenido secuencias más cortas.

El alineamiento de nucleótidos de las secuencias obtenidas junto con las de las cepas encontradas por el grupo colega, más la cepa patrón CH18537/63 permitió determinar que la diferencia en la migración en el gel de agarosa de las mismas se debía a una inserción de 60 nt en el gen de la glucoproteína G, más precisamente una duplicación que comenzaba en la posición nucleotídica 792 con respecto a la cepa patrón. No se encontraron inserciones, ni delecciones que compensaran esos 60 nucleótidos extra incorporados en la glucoproteína G. Las secuencias obtenidas en formato fasta se listan en el apéndice 2, las mismas se nombraron con la sigla RSVBA, más un número interno del laboratorio y el año de aislamiento, como fue descrito en la sección materiales y métodos. Algunos pares de muestras, RSVBA1606/02 y RSVBA1208/02; RSVBA619/02 y RSVBA164/02; y RSVBA1562/02 y RSVBA495/02, resultaron tener secuencias idénticas, pero en la mayoría de los casos se obtuvieron secuencias

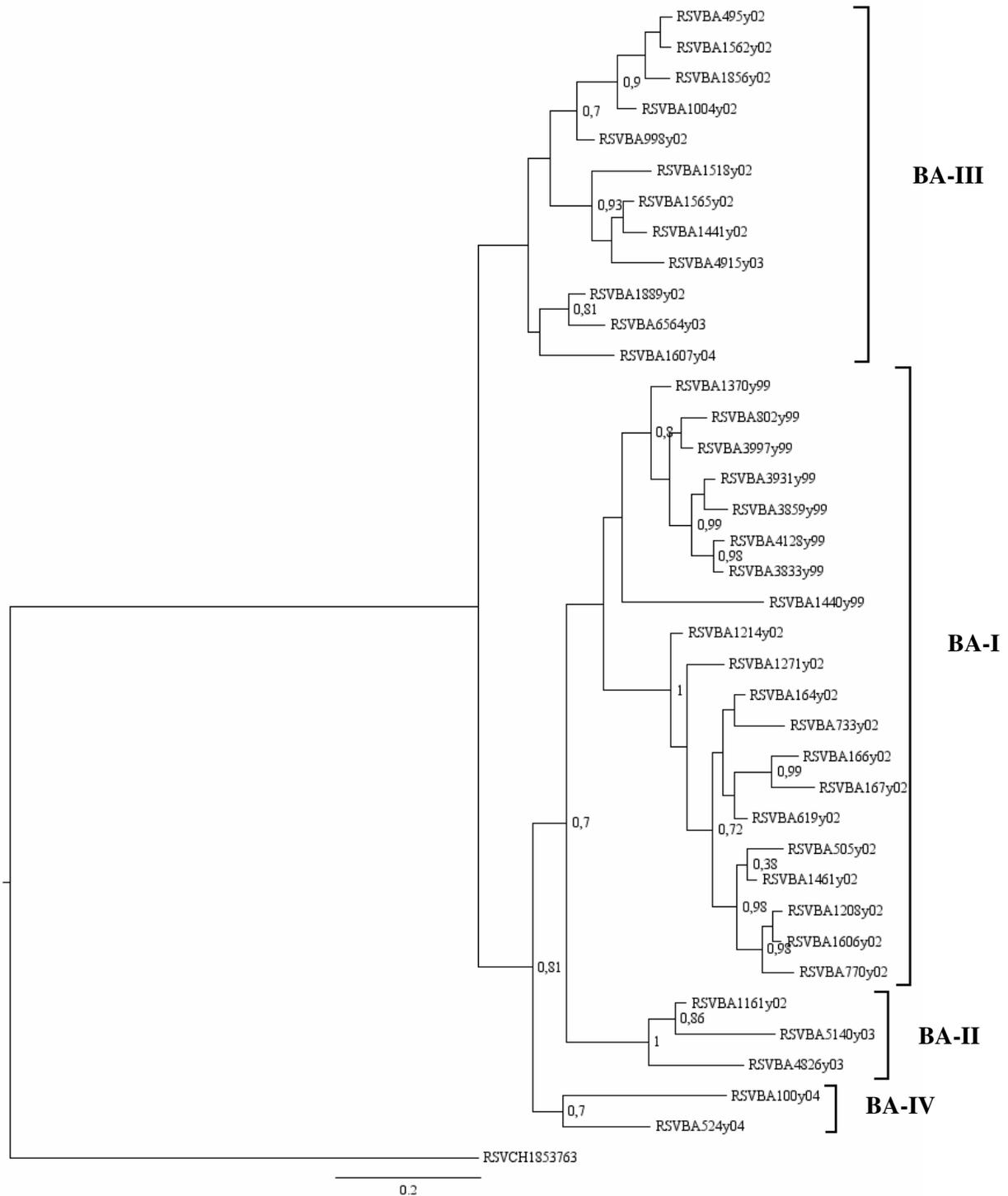
únicas para cada muestra amplificada. De manera interesante se encontró que mientras las secuencias de la duplicación provenientes del año 1999 eran una copia exacta de los 60 nt precedentes, durante los años posteriores se acumularon cambios nucleotídicos en los dos segmentos (ver más adelante).

Los valores de diversidad media por sitio por ciento para las secuencias del gen completo de la glucoproteína G de las muestras argentinas fueron del 1,2% (DS 0,2%) a nivel nucleotídico y del 2,2% (DS 0,4%) a nivel aminoacídico, reflejando una mayor variación de secuencias a nivel de la proteína que a nivel del ARN. Las comparaciones de los alineamientos de secuencias indicaron que las transiciones fueron más frecuentes que las transversiones (Ti/Tv= 3,97).

Se realizó un análisis filogenético de las secuencias de nt de G completas, que presentaron la duplicación, en el mismo se incorporaron las tres cepas reportadas por CEMIC en 1999. Se realizó un análisis bayesiano, utilizando la cepa patrón CH18537/63 como *outgroup* del árbol (Figura 22). Continuando con la metodología de estudio previa, también utilizó el criterio de MV para el análisis con el programa PAUP, utilizando el modelo de sustitución nucleotídico TrN+G, previamente determinado, como así también se realizaron análisis por parsimonia y distancia para observar si se mantenía la misma asociación de las secuencias argentinas que la obtenida con el criterio de análisis mostrado (ver apéndice 4 para los parámetros del modelo de sustitución y apéndice 5 por árboles de MV, parsimonia y distancia (Figuras 4-6 del apéndice 5). En el árbol de la Figura 22 se puede observar que las secuencias se agruparon en un genotipo denominado de ahora en adelante BA (ver más adelante) y pudieron ser clasificadas en al menos tres clados (BA-I, BA-II y BA-III) respaldados por probabilidades posteriores de 0,7. El clado BA-I incluyó todas las muestras del año 1999 (ocho muestras) y 12 muestras del 2002. Las restantes diez secuencias del año 2002 se encontraron asociadas en los clados BA-II y BA-III con otras secuencias del año 2003 y 2004. Dos secuencias completas obtenidas de muestras del año 2004 se agruparon en un clado separado (BA-IV), con un valor de probabilidad posterior en el análisis bayesiano de 0,7. Los otros métodos utilizados mostraron topologías y valores de soporte estadístico similares, salvo para el caso de este último clado. No obstante, la probabilidad posterior del análisis bayesiano, y los análisis que luego se mostraran con el extremo C-terminal (ver más adelante) indicarían que podría deberse a un grupo independiente.

Figura 22. Análisis filogenético de secuencias completas del gen de la glucoproteína G del HRSV subtipo B con una duplicación de 60 nt, aisladas en la Argentina en el período 1999-2004. Análisis bayesiano.

Sólo los valores de probabilidades posteriores mayores a 0,7 son mostrados. La cepa patrón CH18537/63 se utilizó como *outgroup*. Las cepas fueron nombradas con la sigla BA que denota la ciudad de aislamiento, permitiendo la comparación con cepas previamente publicadas con las mismas características de duplicación.



4.2.3.3. Comparación de las secuencias Argentinas (BA) con las cepas del HRSV con la duplicación de 60 nt aisladas en otras partes del mundo.

A partir de la descripción inicial de este nuevo grupo o genotipo de HRSV subtipo B con la duplicación de 60 nt, otros laboratorios del mundo informaron secuencias parciales de G obtenidas a partir de muestras clínicas con el mismo segmento duplicado. Los virus presentes en esas muestras fueron todos clasificados dentro del subtipo antigénico B de HRSV mediante técnicas de RT-PCR subtipo específicas o mediante secuenciación nucleotídica. Los diferentes reportes incluyeron muestras de Sapporo (Japón) en 2000 y 2002, de Niigata (Japón) en 2003, de Kenia en 2003, de Quebec (Canadá) en 2001 y 2002, de Bélgica desde 1999 a 2005, de Nueva Zelanda en 2004 y Nueva Delhi (India) desde 2001 a 2005. Notablemente, todas estas muestras fueron aisladas más recientemente que las encontradas por primera vez en nuestro país (1° muestra: RSVBA802/99 obtenida en mayo de 1999). En todos los casos, las secuencias de los bordes del segmento duplicado fueron las mismas. En relación a la variabilidad observada en las muestras del resto del mundo, fue encontrado cierto grado de divergencia dentro de las dos copias del segmento duplicado en la mayoría de los casos, excepto en las muestras más cercanas a 1999, como se observó en las secuencias RSVBA presentadas en este trabajo de Tesis. A pesar de que todos estos datos sugieren que los virus con el segmento duplicado en la glucoproteína G compartirían un ancestro común y que podrían haber sido originados a partir de un evento único de duplicación, no se puede excluir absolutamente la posibilidad que todos estos virus descritos se hubieran originado en varios eventos independientes. Por lo tanto, para testear si los virus RSVBA con la duplicación de 60 nt, descritos en este trabajo y los reportados en otras partes del mundo tuvieron un ancestro común, se realizó un análisis filogenético con los mismos. Un total de 46 secuencias RSVBA con la duplicación de 60 nt fueron incluidas en el análisis, de las cuales sólo 30 correspondieron a secuencias únicas y fueron comparadas con las reportadas por los países mencionados previamente y obtenidas de *GenBank*. Además se agregaron para el análisis y comparación, 31 secuencias correspondientes a los genotipos GB1-GB4, SAB1-SAB3, URU1 y URU-2 previamente descritos para HRSV subtipo B (ver apéndice 3). Algunas de estas muestras agregadas correspondían a virus aislados contemporáneamente en nuestro país o en países vecinos (Montevideo, Uruguay) pero no poseían el segmento duplicado. Debido a que la mayoría de las secuencias de HRSV subtipo B reportadas en la base de datos del *GenBank* contenían sólo el extremo C-terminal del gen de la glucoproteína G, se realizó el análisis filogenético con los últimos 330 nt (nt 652 a 982 del gen de G) para

los virus con la duplicación y los últimos 270 nt (nt 652 a 922 del gen de G) para el caso de los demás genotipos. La Figura 23 muestra el árbol obtenido por análisis bayesiano (ver apéndice 5 para otros métodos de inferencia filogenético (Figuras 7-9 del apéndice 5)). Todas las secuencias con la duplicación de 60 nt se agruparon en el nuevo genotipo BA, separadas de aquellas asignadas previamente a otros genotipos descriptos para HRSV subtipo B. Se puede observar que este nuevo genotipo presentó un soporte estadístico alto, con una probabilidad posterior de 0,95. Por otro lado, ninguna de las secuencias prototipo asignadas a los otros genotipos previamente reportados se asociaron con las secuencias del nuevo genotipo BA. Estos resultados dan un fuerte soporte a la hipótesis de que existe un ancestro común para todas las secuencias con la duplicación en la proteína G. Para descartar la posibilidad de que el segmento duplicado (primera o segunda duplicación), hubiere introducido alteraciones en el análisis filogenético, se realizó el mismo análisis filogenético pero excluyendo de a uno por vez los segmentos de 60 nt en cuestión (duplicación). En las Figura 24-a) y -b), se puede observar que la topología general de los árboles se mantuvo sin cambios, conservando al genotipo BA separado del resto de los genotipos, y eliminando así la posibilidad de sesgos producidos por el segmento duplicado. Además, en la Figura 23 se identificaron dos nuevos clados (BA-V y BA-VI) dentro del genotipo BA, los cuales no habían sido reconocidos previamente en el árbol de la Figura 22. El clado BA-V incluyó sólo tres secuencias de muestras aisladas en Niigata (Japón) durante el brote de 2003, y el BA-VI contenía casi exclusivamente secuencias de muestras aisladas en Bélgica, excepto una de Sapporo y otra de Quebec. Notablemente, el clado BA-III descrito previamente en la Figura 22, contiene sólo secuencias de muestras aisladas en Buenos Aires desde 2002 a 2004. Aunque en los últimos años se detectaron secuencias pertenecientes a este clado en Brasil y una secuencia de Bélgica también ese mismo año (secuencias no incluidas en el análisis). Por último, el clado más heterogéneo fue el BA-IV, en relación al lugar y año de aislamiento de las muestras. El mismo incluyó secuencias de Bélgica (1999, 2001 y 2003), Quebec (2001 y 2002), Nueva Delhi (2003 y 2004), Kenya (2003), Nueva Zelanda (2004) y curiosamente sólo secuencias de Buenos Aires de 2004, mostrando que podría ser un grupo genético reintroducido en nuestro país.

Todas las secuencias argentinas clasificadas dentro de los diferentes clados en la Figura 22 la cual se obtuvo por análisis de la secuencia completa de la glucoproteína G, se mantuvieron esencialmente invariables en el análisis con el extremo C-terminal de la Figura 23.

Figura 23. Árbol filogenético correspondiente al extremo C-terminal del gen de la glucoproteína G del HRSV subtipo B, construido mediante análisis bayesiano.

Sólo las probabilidades posteriores mayores a 0,7 son mostradas. Las siglas QUE, NG, SAP, Ken, DEL y BE, corresponden a Quebec, Niigata, Sapporo, Kenya, Nueva Delhi y Bélgica, respectivamente. La cepa patrón CH18537/63 se utilizó como *outgroup*. Las secuencias argentinas se presentan de color rojo.

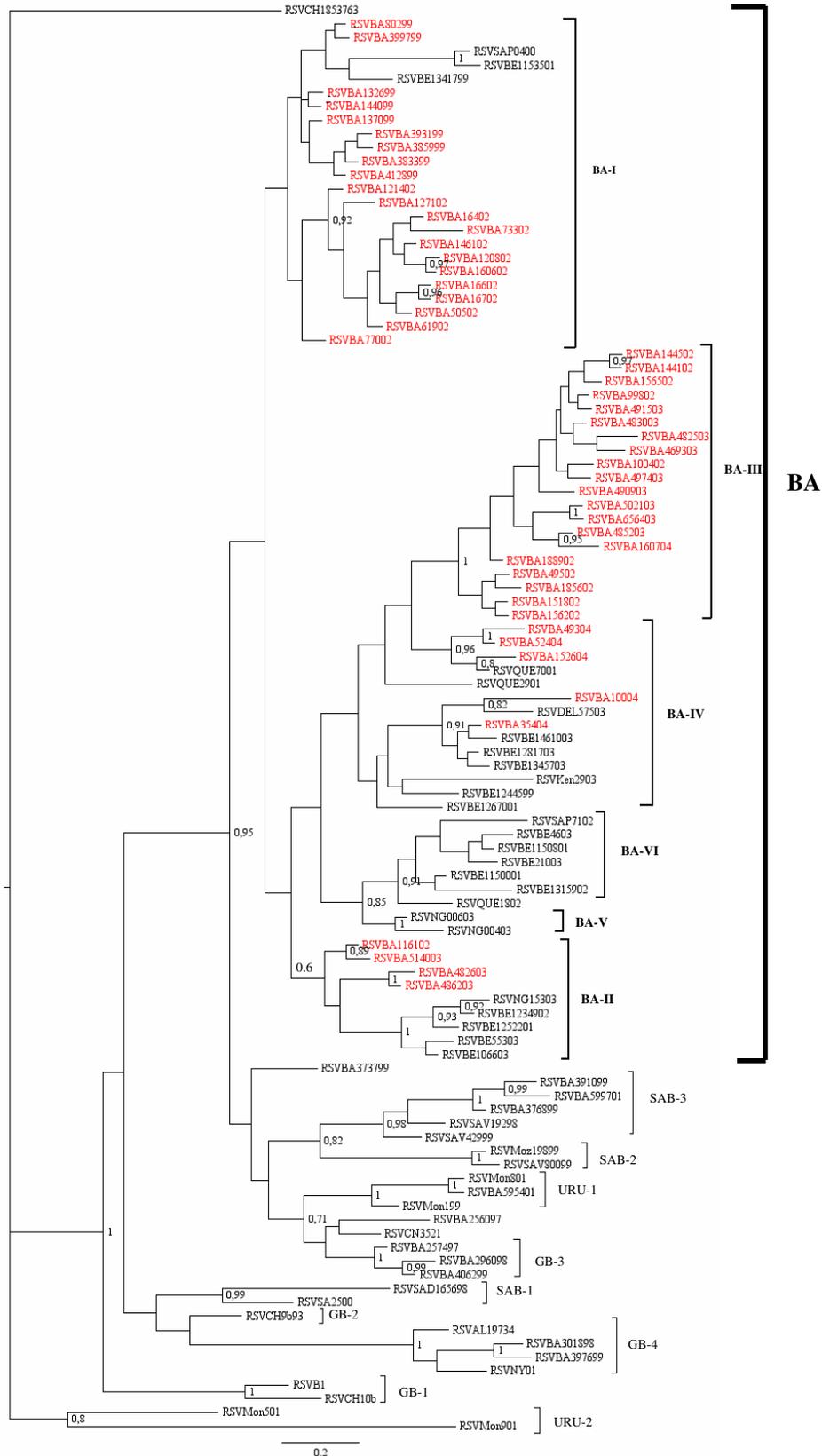
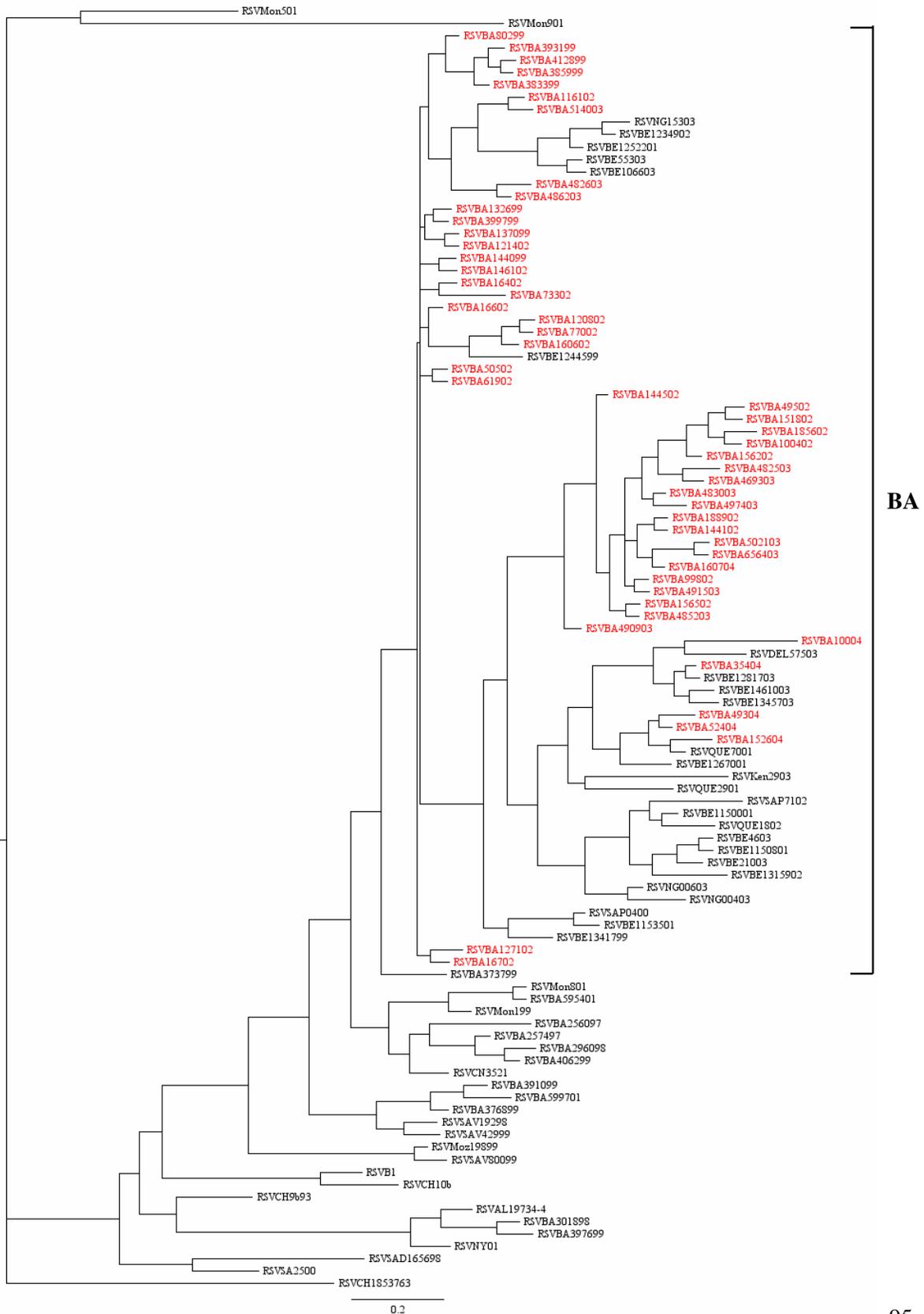
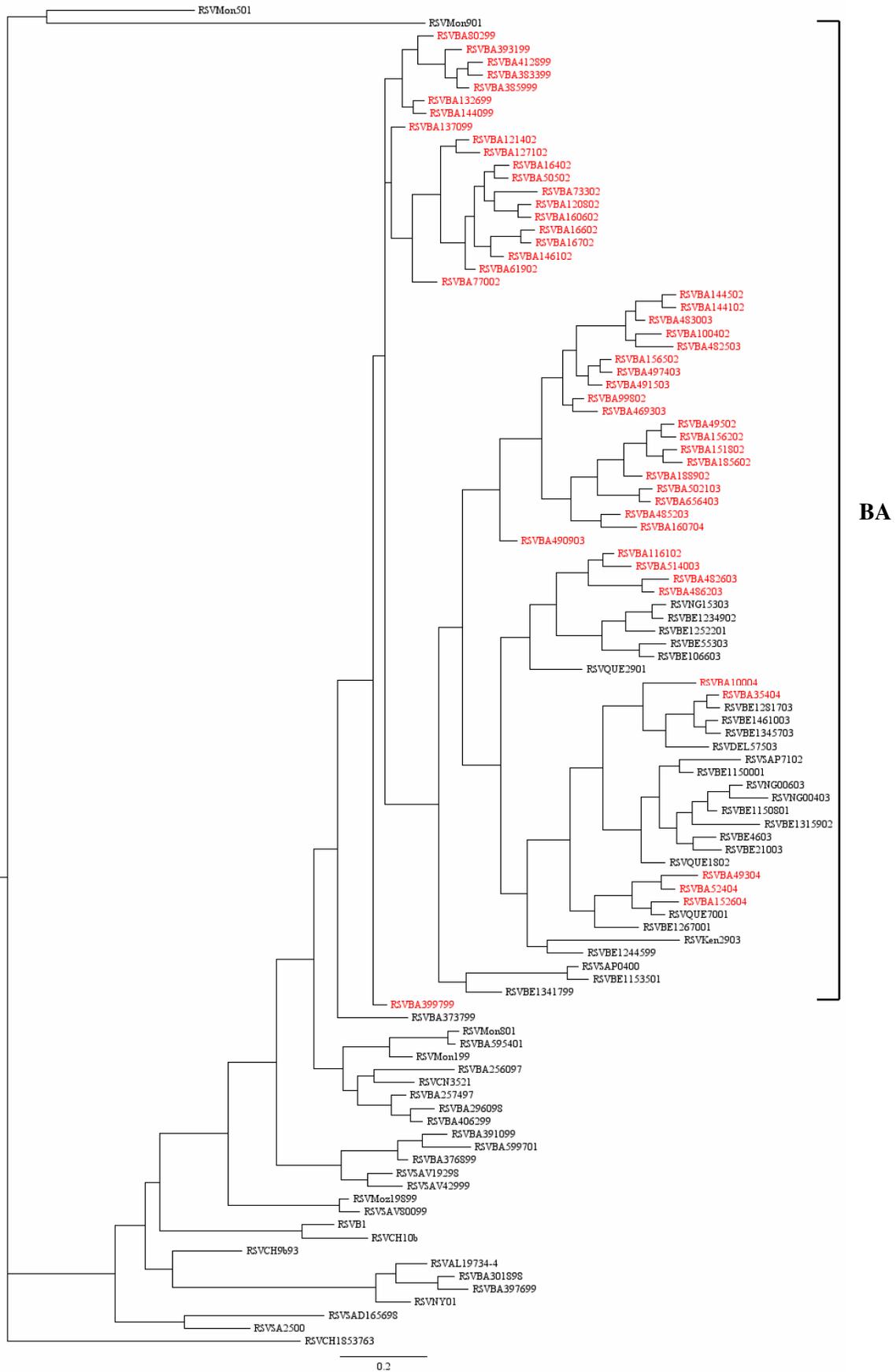


Figura 24. Árbol filogenético construido por inferencia bayesiana correspondiente al extremo C-terminal del gen de la glucoproteína G del HRSV subtipo B a) sin los primeros y b) sin los segundos, 60 nt de la duplicación en las secuencias del genotipo BA.

Las secuencias argentinas se presentan de color rojo. Para más claridad sólo se indica el genotipo BA.



b)

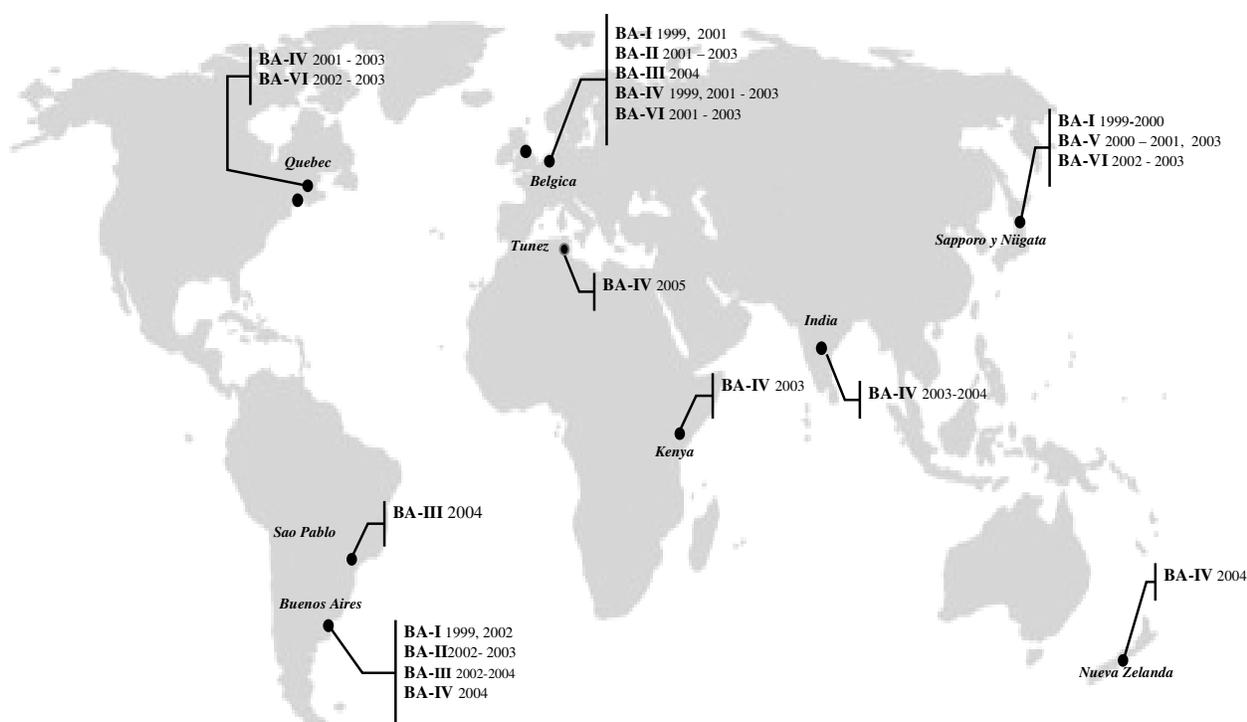


BA

Todo este análisis detallado permitió utilizar a la aparición de la duplicación como un marcador genético para trazar un mapa mundial de circulación de este virus y poder describirlo desde el punto de vista filogeográfico, como así analizar su participación en la generación de variabilidad para HRSV. Tomando en cuenta que las primeras muestras fueron aisladas en Argentina y a partir de aquí se fueron diseminando al resto del mundo se realizó un mapa con las ubicaciones geográficas de los virus BA, así como los clados obtenidos por análisis filogenético y los años de circulación (Figura 25).

Figura 25. Distribución geográfica de las secuencias BA con la duplicación de 60 nt.

En cada país se indica el o los clados que fueron encontrados entre las secuencias halladas y el año de aislamiento.



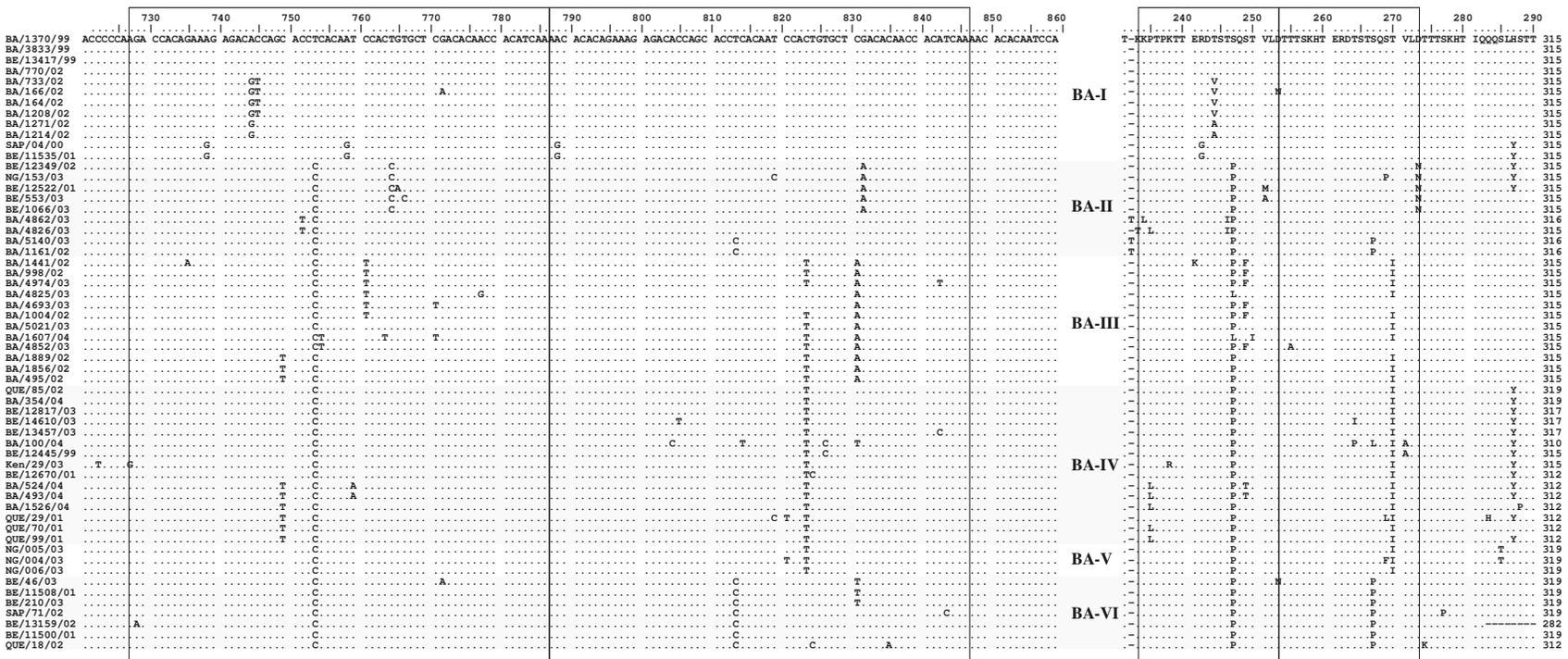
4.2.3.4. Análisis de la variabilidad nucleotídica y aminoacídica dentro de la duplicación de 60 nt.

El alineamiento parcial de las secuencias que contienen el segmento duplicado que se asociaron al genotipo BA en los árboles del punto anterior se muestra en la Figura 26. Como se mencionó anteriormente, la duplicación presentó dos copias idénticas de secuencia sólo en las muestras más tempranas del año 1999. En todos los otros casos un limitado número de sustituciones nucleotídicas se fueron acumulando en las dos copias del segmento duplicado,

excepto en la segunda copia de las muestras correspondientes al clado BA-I. La transición T754C fue encontrada en todas las secuencias de todos los grupos dentro del genotipo BA, excepto en BA-I. Las otras sustituciones nucleotídicas encontradas estaban restringidas sólo a ciertos grupos o fueron específicas de una secuencia en particular o un subgrupo de secuencias particulares. Analizando globalmente, se observó una acumulación de cambios nucleotídicos con el tiempo en las secuencias de la Figura 26.

El alineamiento parcial de las secuencias de aminoácidos que incluyen el segmento duplicado de G también se muestra en la Figura 26. En general las variaciones observadas a nivel aminoacídico reflejaron los cambios a nivel nucleotídico. Por ejemplo, la sustitución aminoacídica S247P, fue encontrada en las secuencias de todos los grupos BA excepto en el BA-I. Otros cambios aminoacídicos observados fueron específicos de grupo o restringidos a ciertas secuencias. El uso de codones de terminación alternativos (no mostrado en la Figura 26 por razones de espacio), como ha sido reportado para otros virus pertenecientes al subtipo B, se observó entre las secuencias determinando la longitud de la proteína (Martínez *et al.*, 1999). No obstante, otros cambios inusuales, fuera del segmento duplicado, también contribuyeron a polimorfismos en la longitud de la proteína. Por ejemplo, tres secuencias (RSVBA1161/02, RSVBA4862/03, y RSVBA5140/03) tenían el triplete AAA insertado luego del nt 712, que no cambió el marco de lectura sino que agregó una Lys en la posición 234 de la proteína. Además, la secuencia RSVBA100/04 presentó una delección de seis nucleótidos luego de la posición 489. Inserciones y delecciones de otros tripletes como fue observado en las secuencias argentinas se han encontrado entre las secuencias de muestras aisladas en Bélgica (incluidas en la Figura 26). En una de esas muestras (RSVBE13159/02) se encontró un codón de terminación prematuro que acortó la proteína a 282 aminoácidos. A pesar de estos cambios, pudo verse una correlación global entre la clasificación de las secuencias en los diferentes grupos y la longitud de la cadena proteica (Figura 26). Es importante mencionar, que el residuo Thr229 (fuera del segmento duplicado), que ha sido reportado como conservado en todas las secuencias de HRSV subtipo B hasta la fecha, se encontró cambiado a Ile en todas las secuencias del genotipo BA (T229I), excepto en la secuencia RSVBA733/02, en la cual el cambio fue T229F. Esta observación también apoya la idea de un ancestro común para los virus del genotipo BA con el segmento duplicado de 60 nt.

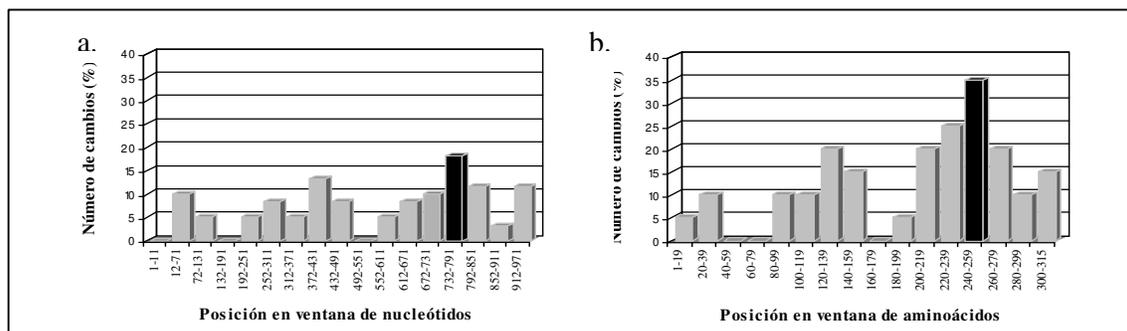
Figura 26. Alineamiento de nt y aa de las secuencias parciales del gen de la glucoproteína G con la duplicación de 60 nt.
 Las secuencias de nucleótidos se muestran a la izquierda de la figura, y su correspondiente traducción a aminoácidos es mostrada a la derecha, con los nombres de los grupos dentro del genotipo BA en el centro. Los dos copias de la secuencia duplicada son marcadas con rectángulos. Los residuos idénticos se marcan con puntos. La longitud de la proteína se muestra a la derecha de cada secuencia parcial de aminoácidos.



Para comparar la variabilidad del segmento duplicado con respecto a otras regiones del gen de la glucoproteína G, las secuencias de nucleótidos del gen completo provenientes de las muestras del genotipo BA descritas en este trabajo de Tesis, fueron alineadas con el programa ClustalX. Luego, los cambios de secuencia fueron calculados usando ventanas de 60 nucleótidos no solapadas de manera de que una de ellas coincidiera con el segmento duplicado (Figura 27 a)). Los porcentajes de cambios en nucleótidos se diferenciaron considerablemente entre las distintas regiones del gen de la glucoproteína G, siguiendo el patrón general observado en estudios previos (Melero *et al.*,1997). Dos regiones, las que codifican para el dominio transmembrana (nt 132 a 191) y el segmento que presenta el *cluster* de cuatro cisteínas presentes en el ectodominio del gen de G asociado al sitio de unión al receptor celular (nt 492 a 551), se encontraron conservados en todas las secuencias BA. En contraste, se encontraron altos niveles de variación de secuencia en otras partes del gen. Notablemente, la primera copia del segmento duplicado (nt 732 a 791, barra negra en Figura 27-a)) mostró variaciones nucleotídicas significativamente mayores que otras partes del gen, inclusive la segunda copia del segmento duplicado (nt 792 a 851). Con valores de diversidades nucleotídicas media por ciento de 3,76% (DS 0,37%) para la primera copia vs 2,1% (DS 0,35%) para la segunda.

La misma variabilidad se observó cuando se realizó el análisis a nivel de la secuencia de aminoácidos, pero utilizando ventanas no solapadas de una longitud de 20 aa (Figura 27 b). Nuevamente la alta variabilidad a nivel nucleotídico se tradujo a nivel aminoacídico, indicando que en ciertas regiones predominan los cambios no sinónimos, sobre los sinónimos.

Figura 27. Variación de las secuencias a lo largo del gen de la glucoproteína G de las muestras con la duplicación de 60 nt. a) Número de cambios nucleotídicos expresados como porcentajes calculados por ventanas de a 60 nt no solapadas en las secuencias completas provenientes de las muestras BA. b) Número de cambios para las secuencias de aminoácidos calculados por ventanas de a 20 aa no solapadas. La primera copia de la duplicación se indica en barras negras.



Con el objetivo de determinar si las regiones en donde se observó mayor variabilidad operaba cierta selección positiva se calculó en primera instancia el valor global de dN/dS que fue de 0,7062 ($p < 0,05$), mostrando que a pesar de que en conjunto operaría sobre la proteína entera una selección purificadora ($\omega < 1$), existen 70,62 % más chances de que las sustituciones no sinónimas se fijen en la población en estudio. El cálculo de la relación dN/dS por sitio se muestra en la Tabla IX, en donde se encontraron 11 sitios con selección positiva detectada por al menos uno de los tres métodos utilizados y cinco sitios con selección negativa (calculados a partir del paquete del programa HyPhy y realizados a través de su servidor *on line* Datamonkeyweb).

Tabla IX. Sitios con selección positiva y negativa en cepas BA de HRSV subtipo B.

Se determinaron los valores de dN/dS sitio por sitio mediante los métodos SLAC, FEL y REL. Los residuos aa correspondientes y el tipo de selección para cada codón están indicados. Para los métodos SLAC y FEL se utilizó un nivel de significancia de 0,05, y un factor de Bayes de 50 para REL.

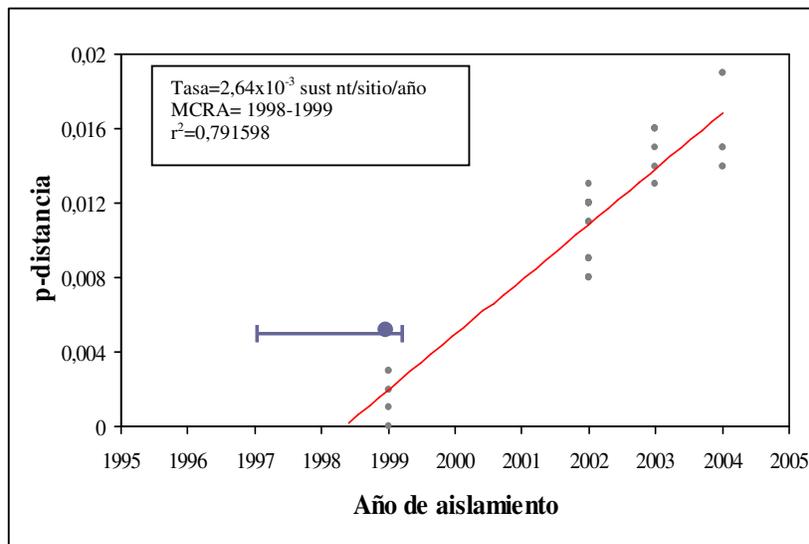
Codón	SLAC $dN-dS$	SLAC p	FEL $dN-dS$	FEL p	REL $dN-dS$	REL Factor Bayes	aminoácido	Tipo de Selección
61	-3,575	0,256	-17,441	0,054	-2,145	82,100	Phe	Negativa
77	2,650	0,853	28,472	0,777	1,970	56,176	Gln-Ser	Positiva
98	2,961	0,383	32,335	0,241	2,156	118,273	Arg-Lys	Positiva
99	4,118	0,296	15,454	0,060	2,505	2412,420	Ala-Val-Leu	Positiva
120	-8,236	0,037	-34,193	0,012	-4,180	31,562	Pro	Negativa
200	2,561	0,511	10,775	0,539	2,085	51,049	Ile-Thr	Positiva
218	2,710	0,460	20,484	0,392	2,119	82,994	Thr-Lys-Ile	Positiva
219	4,250	0,185	10,052	0,276	2,247	64,756	Leu-Pro	Positiva
236	2,764	0,438	2,185	0,461	2,120	60,983	Pro-Leu	Positiva
245	5,490	0,198	38,429	0,038	2,339	13380,000	Ala-Thr	Positiva
246	-14,298	0,004	-117,371	0,005	-30,874	300,527	Ser	Negativa
248	2,914	0,425	11,941	0,488	2,107	57,965	Ser-Pro-Leu	Positiva
250	5,380	0,214	20,109	0,110	2,333	10113,100	Ser-Phe-Thr	Positiva
253	-2,745	0,333	-12,852	0,085	-2,000	56,703	Leu	Negativa
268	3,091	0,410	11,785	0,465	2,120	60,143	Ser-Leu-Pro	Positiva
273	-4,459	0,168	-26,771	0,016	-2,433	51,686	Leu	Negativa

4.2.3.5. Estimación de la fecha del ancestro común más reciente (MRCA) de las secuencias con la duplicación de 60 nt.

Para determinar la fecha del MRCA de los virus del genotipo BA con el segmento duplicado, se utilizaron distintos criterios de análisis. Por un lado se realizó un análisis bayesiano para calcular la tasa de sustitución mediante el programa Beast, que dio como resultado una tasa de evolución media de $3,11 \times 10^{-3}$ sustituciones nt/sitio/año (IC 95%= $1,8-4,5 \times 10^{-3}$ sustituciones nt/sitio/año) y el tiempo desde MRCA al año 2004 (último año de análisis) fue de 7,7 años con un IC 95%=6,11-9,7 (MRCA correspondiente al año 1997). Por otro lado continuando con la línea de comparación de distintos métodos filogenéticos para el análisis de las secuencias, se realizó el análisis por MV bajo el modelo de sustitución simple SRDT (en inglés *single-rate model*, modelo de tasa sustitución simple) utilizando el programa TipDate. Este último método dio como resultado a 1999 como el año del MRCA para las secuencias BA (IC 95%= 1997-1999), y una tasa de evolución de $2,5 \times 10^{-3}$ sustituciones nt/sitio/año (IC 95%= $1,7-3,5 \times 10^{-3}$ sustituciones nt/sitio/año). Por último se graficaron las longitudes de las ramas filogenéticas (p-distancias o distancias genéticas calculadas a través del programa MEGA) versus el año de aislamiento de cada muestra (Figura 28). Se ajustaron los datos a una recta realizando un análisis por regresión lineal y la secuencia raíz fue fijada de tal manera que se maximizara el valor de r^2 de la regresión. El origen de la recta podría interpretarse como el año del MRCA, que fue determinado por extrapolación al eje de las abscisas entre los años 1998 y 1999, poco antes de la fecha de los primeros aislamientos con la duplicación en nuestro país (mayo 1999). La tasa de evolución del gen de la glucoproteína G calculado como la pendiente de la regresión lineal fue de $2,64 \times 10^{-3}$ sustituciones nt/sitio/año, con una buena correlación entre las distancias genéticas y el año de las muestras ($r^2=0,7916$). El valor calculado por el análisis por regresión lineal se correlacionó bien con aquel obtenido por los otros criterios. Todos los métodos coinciden en que esta duplicación se habría generado en un evento aproximadamente ocurrido entre los años 1997-1999, en concordancia con las descripciones de las secuencias reportadas en todo el mundo sobre HRSV subtipo B, siendo las argentinas las primeras encontradas y publicadas.

Figura 28. Tasa de evolución y estimación del año del ancestro común más reciente de las secuencias BA con la duplicación de 60 nt.

Las distancias genéticas en nucleótidos (p-distancias calculadas con MEGA) fueron graficadas vs el año de aislamiento de cada muestra. Se graficó una recta por regresión lineal, la secuencia utilizada como raíz fue fijada de manera de maximizar el valor de r^2 . El punto y la barra horizontal representan el año del MRCA estimado por el criterio de MV con un intervalo de confianza del 95%.



El mismo tipo de gráfico fue realizado con las secuencias parciales de las muestras aisladas de todo el mundo que contenían el segmento duplicado. La alta dispersión de los datos debido al limitado número de nucleótidos secuenciados en todas las muestras resultó en valores poco significativos estadísticamente. No obstante, el año del MRCA (1997-1999) y la tasa de evolución (3×10^{-3} sustituciones nt/sitio/año) estimada por regresión lineal para todas las secuencias con la duplicación fueron muy similares a aquellos calculados con las secuencias BA completas.

4.3. Análisis Molecular Intramuestras

4.3.1. Análisis de cuasiespecies y su rol en la generación de variabilidad genética del HRSV. Selección de las muestras analizadas.

El objetivo principal de esta sección es la de testear la hipótesis de que el HRSV existe en la naturaleza como una distribución de variantes genéticas muy estrechamente relacionadas, las cuales bajo distintas condiciones naturales de una infección podrían funcionar como un reservorio génico para darle plasticidad molecular y así le permita al virus enfrentar diferentes ambientes inmunes en pacientes con diferentes susceptibilidades. Para ello se estudió la variabilidad molecular del HRSV durante el transcurso de infecciones a diferentes tiempos.

Para concretar el objetivo propuesto para esta sección, se seleccionaron determinadas muestras clínicas (ANF) de acuerdo a diferentes características en cuanto a la infección de los pacientes de quien provenían. A continuación se detallan dichas características:

a) Muestras ARG1160/04-ARG2525/04: Provenientes de un paciente de siete meses de edad en el momento del primer episodio de bronquiolitis severa por el cual fue hospitalizado el 29/6/2004. Se le tomo un ANF que resultó positivo por IFI para HRSV. Luego de once días de internación fue dado de alta. Cuarenta y un días después del primer episodio respiratorio (09/8/2004), el niño es reinternado en el hospital con enfermedad respiratoria complicada. Nuevamente se determinó la presencia del HRSV en una muestra de ANF por IFI. A este paciente se le había diagnosticado Síndrome de Down sin ninguna complicación cardiaca tres meses antes del primer episodio respiratorio. Cabe mencionar, que este paciente concurrió al hospital en numerosas oportunidades por distintos episodios clínicos como consecuencia de su diagnóstico de Síndrome de Down, mostrando un nivel de hospitalización elevado para su corta edad.

b) Muestras ARG6560/01-ARG6751/01: Provenientes de un paciente de siete meses de edad al momento de la internación por un cuadro de bronquiolitis, durante la cual se le tomó una muestra de ANF y por IFI resultó positiva para HRSV. Posteriormente en la internación se le diagnosticó HIV (transmisión vertical). Dieciocho días después de la primera muestra se le volvió a tomar un ANF debido a que continuaba con síntomas respiratorios, se le realizó una IFI y nuevamente se diagnosticó HRSV. Este paciente presentaba historia de haber tenido dos internaciones previas en otro hospital, como consecuencia de haber presentado tres episodios

de bronquiolitis entre los tres y cinco meses de edad, sin rescate de muestras clínicas para la búsqueda del agente etiológico.

c) Muestras ARG4018/01 y ARG4389/01: Provenientes de bebés de cinco y seis meses de edad internados en la misma UCIP con enfermedad respiratoria. Ambas admisiones ocurrieron separadas por un mes. Ambos pacientes presentaron ANF positivos para HRSV por IFI, las muestras habían sido tomadas dos y cuatro días luego de comenzados los síntomas respiratorios, respectivamente.

Las restantes muestras analizadas en esta sección (**ARG22516/97** y **ARG577/00**) fueron tomadas de niños menores de un año de edad, internados en el hospital. Los pacientes tenían diagnóstico clínico de IRAB y la etiología viral fue estudiada dentro de los tres a cinco días de comenzado el cuadro respiratorio, confirmando por IFI que presentaban una infección por HRSV.

Las muestras anteriormente detalladas fueron seleccionadas para realizar este análisis debido a que los pacientes de quienes fueron tomadas presentaron particularidades de acuerdo a su evolución clínica y/o de observaciones distintivas halladas en su análisis molecular realizado en secciones precedentes (sección 4.2.2. Análisis molecular de HRSV subtipo A). Cada muestra clínica fue asociada a una secuencia nucleotídica directa de la glucoproteína G, a las cuales se les había asignado la siguiente nomenclatura: **RSVARG1160/04**, **RSVARG2525/04**, **RSVARG6560/01**, **RSVARG6751/01**, **RSVARG4018/01**, **RSVARG4389/01**, **RSVARG22516/97** y **RSVARG577/00**. Entre las observaciones que dieron fundamento al análisis de esta sección se encontró que: 1) cuando se le asignaron genotipos a cada una de las secuencias correspondientes al par de muestras del inciso a) provenientes de un mismo paciente, ambas presentaron dos genotipos distintos (GA2 y GA5); 2) las secuencias directas del par de muestras ARG6560/01-ARG6751/01, también provenientes de un mismo paciente, fueron exactamente iguales, y 3) las secuencias directas obtenidas del par de muestras ARG4018/01 y ARG4389/01 provenientes de dos pacientes diferentes pero internados en la misma unidad fueron casi idénticas con escasa diferencia de dos nt entre sí.

Comenzando con el estudio de esta sección se procedió a clonar en un vector plasmídico los fragmentos amplificados de la glucoproteína G de cada muestra y se seleccionaron entre ocho y 12 clones de cada una para realizar los análisis que se detallan a continuación.

4.3.2. Caracterización molecular de las variantes encontradas en cada muestra clínica

A partir de los alineamientos de las secuencias de nucleótidos de los clones se calcularon para cada muestra, las distancias genéticas medias en nucleótidos por sitio. En la Tabla X se observa que para cada población de variantes analizadas (distintos grupos de clones) las mismas variaron entre $0,85 \times 10^{-3}$ y $29,7 \times 10^{-3}$ sustituciones nucleotídicas por sitio. Especial atención tomaron los elevados valores de distancias medias encontradas para el par de muestras ARG1160/04 y ARG2525/04, los cuales fueron de $18,0 \times 10^{-3}$ (DS 0,00293) y $29,7 \times 10^{-3}$ (DS 0,00359), respectivamente. Con el objetivo de determinar el grado de incorporaciones nucleotídicas erróneas durante los procedimientos de amplificación por RT-PCR para obtener los fragmentos a clonar y posteriormente el procedimiento de secuenciación, se amplificó el gen de la glucoproteína G de un clon de la cepa patrón Long/56 obtenido previamente por dos rondas sucesivas de purificación por plaqueo (método de dilución límite). Se utilizó el mismo protocolo de amplificación y clonado que el usado para las muestras clínicas. Se seleccionaron 14 clones, se secuenciaron y a partir de su alineamiento de nucleótidos y comparación con la secuencia de la cepa patrón publicada en *GenBank* (número de acceso M17212) se encontraron siete mutaciones totales en 8.358 nucleótidos secuenciados (ver apéndice 6 para alineamiento y cálculo del error). Estos datos resultaron en una tasa de error de $0,84 \times 10^{-3}$ mutaciones incorporadas/nt secuenciado (distancia genética media $1,64 \times 10^{-3}$, DS 0,00058). Cuando este valor se comparó estadísticamente con las distancias genéticas obtenidas para cada muestra analizada, las diferencias resultaron significativas, excepto para el caso de las muestras ARG6751/01, ARG22516/97 y ARG577/00 para las cuales no se pudo determinar si las sustituciones halladas fueron producto de la variabilidad intrínseca de las muestras o de errores incorporados durante el proceso de obtención (Tabla X).

Tabla X. Estimación de las distancias genéticas medias por sitio para el conjunto de clones correspondientes a cada muestra analizada (expresadas como el número medio de sustituciones nucleotídicas por sitio).

También se presentan el número de clones obtenidos, el número total de nucleótidos secuenciados y los valores de desviación estándar. Estas últimas fueron calculadas por el método de *bootstrap* (1.000 replicados). El análisis fue realizado bajo el criterio de MV, a partir del modelo HKY+G obtenido para el conjunto de secuencias en estudio. (*) En la última columna se aplicó el Test estadístico Mann-Whitney para comparar los valores de distancias genéticas medias por sitio obtenidas con cada muestra vs el error obtenido para el sistema utilizado ($1,64 \times 10^{-3}$, DS 0,00058). NS: no significativo.

Nº Muestra	Clones (n)	Nucleótidos Secuenciados	Distancia genética media por sitio	Desviación estándar (DS)	P* (IC 95%)
ARG1160/04	10	5.970	$18,00 \times 10^{-3}$	0.00293	<0.0001
ARG2525/04	10	5.970	$29,7 \times 10^{-3}$	0.00359	<0.0001
ARG6560/01	11	6.567	$4,01 \times 10^{-3}$	0.00099	<0.0001
ARG6751/01	12	7.164	$1,69 \times 10^{-3}$	0.00064	NS
ARG4018/01	8	4.776	$3,39 \times 10^{-3}$	0.00118	<0.0001
ARG4389/01	9	5.373	$3,01 \times 10^{-3}$	0.00107	<0.0001
ARG22516/97	8	4.776	$0,85 \times 10^{-3}$	0.00058	NS
ARG577/00	12	7.164	$1,69 \times 10^{-3}$	0.00064	NS

Continuando con el análisis estadístico, se compararon entre sí las distancias genéticas medias por sitio del par de muestras provenientes del mismo paciente separadas por 41 días (ARG1160/04 y ARG2525/04) aplicando la hipótesis de que la media de la primera era menor que la correspondiente a la segunda, la cual resultó en una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0067$), mostrando que para ese paciente la variabilidad del virus aumentó en el transcurso del tiempo. Luego se compararon las medias de las muestras ARG6560/01 y ARG6751/01 (provenientes de un mismo paciente pero separadas por 18 días), resultando nuevamente diferencias estadísticamente significativas ($p<0,0001$). Y por último, se realizó la comparación de las medias de ARG4018/01 y ARG4389/01, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ambas.

Para examinar las características de las sustituciones presentes en las variantes encontradas en cada muestra se determinaron el número de sustituciones sinónimas (S), no sinónimas (N), deleciones/insersiones (*indel*), transiciones (Ti) y transversiones (Tv) (Tabla XI). En general no se hallaron deleciones, ni insersiones entre los 80 clones totales analizados, excepto en un clon de la muestra ARG1160/04 (clon 5) en el cual se encontró una deleción de un triplete (nt 412-414), y en un clon de la muestra ARG6560/01 (clon 8) en el cual se encontró una

inserción de un triplete (en la posición nt 417), ambos generaron la delección o inserción de un aminoácido en las proteínas finales, sin cambiar el marco de lectura de las mismas.

Tabla XI. Número y características de los sitios polimórficos encontrados en cada grupo de variantes correspondientes a cada muestra analizada.

Nº Muestra	Sitios Polimórficos (n totales)	Sustituciones sinónimas S (n)	Sustituciones no sinónimas N (n)	Delecciones/ Inserciones <i>indel</i> (n)	Transiciones Ti (n)	Transversiones Tv (n)
ARG1160/04	39	12	24	3	31	5
ARG2525/04	67	21	46	0	54	13
ARG6560/01	16	3	10	3	7	6
ARG6751/01	6	4	2	0	4	2
ARG4018/01	8	3	5	0	5	3
ARG4389/01	8	4	4	0	7	1
ARG22516/97	2	1	1	0	2	0
ARG577/00	6	3	3	0	6	0

Con respecto al tipo de sustituciones presentes entre las distintas variantes analizadas para cada muestra, se encontró que no hubo diferencias significativas entre el número de sustituciones *S* y *N*, excepto en el caso particular del par de muestras ARG1160/04 y ARG2525/04 para las cuales las relaciones *N/S* fueron de 24/12 y 46/21, respectivamente, mostrando que la mayoría de las sustituciones nucleotídicas llevaron a cambios aminoacídicos. Para el caso de las transiciones, éstas fueron en todos los casos más frecuentes que las transversiones. La distribución de las sustituciones encontradas a lo largo del ectodominio de la glucoproteína G, mostró que la región central del mismo (aa 165-190, probable sitio de unión al receptor celular) se halló muy conservada entre todas las variantes analizadas para cada muestra y que la mayoría de las sustituciones *N* se distribuyeron principalmente en las dos regiones variables descritas, apoyando la hipótesis de que fueron sustituciones verdaderas y no errores del método de obtención. A excepción de unas pocas, todas las sustituciones encontradas fueron únicas, sugiriendo que a pesar de que las variantes genéticas se generan a altas tasas, cada variante específica se mantuvo a baja frecuencia. De todas maneras, en el caso del par ARG1160/04-ARG2525/04, las variantes analizadas presentaron sustituciones fijadas.

En relación al análisis a nivel aminoacídico, se obtuvo el alineamiento de las secuencias de aminoácidos inferidas utilizando el código genético universal (Figura 29). Cada grupo de variantes presentes en cada muestra clínica mostró una longitud de la proteína homogénea dentro de la misma de 297 o 298 aminoácidos dependiendo del grupo en cuestión, excepto para el caso de la muestra ARG2525/04, para la cual se encontró que ciertas variantes

presentaban 297 aa y otras presentaban 298 aa de longitud (Figura 29). Asimismo, uno los clones analizados de la muestra ARG4018/01 (clon 6), presentó un codón de terminación prematuro (278 CAA→TAA), resultando en una proteína de 277 aminoácidos de longitud.

Se calcularon las distancias genéticas medias por sitio en aminoácidos para cada conjunto de clones, obteniéndose valores superiores a los calculados para los alineamientos de nucleótidos, apoyando la hipótesis que la mayoría de los cambios nucleotídicos se tradujeron a cambios aminoacídicos (Tabla XII).

Tabla XII. Estimación de las distancias genéticas medias por sitio para cada conjunto de clones correspondientes a cada muestra analizada (expresadas como el número medio de diferencias en aminoácidos por sitio) y sus desviaciones estándar (DS).

Nº Muestra	Distancia genética media por sitio (aa)	Desviación estándar (DS)
ARG1160/04	35,06x10 ⁻³	0,00675
ARG2525/04	59,63x10 ⁻³	0,0087
ARG6560/01	9,14x10 ⁻³	0,00274
ARG6751/01	2,50x10 ⁻³	0,00137
ARG4018/01	5,03x10 ⁻³	0,00238
ARG4389/01	6,70x10 ⁻³	0,00264
ARG22516/97	1,26x10 ⁻³	0,00123
ARG577/00	2,5110 ⁻³	0,00143

Figura 29 (Página siguiente). Alineamiento de aminoácidos obtenido con el programa Clustal X, correspondiente a todos los clones analizados de las muestras clínicas estudiadas.

La identidad de aminoácidos se encuentra indicada con un punto. La letra X marca la ausencia de aminoácido. El codón de terminación para cada secuencia se indica con un *. La región probable unión al receptor se encuentra marcada con una línea negra.

RSVARG116004C1
RSVARG116004C2
RSVARG116004C3
RSVARG116004C4
RSVARG116004C5
RSVARG116004C6
RSVARG116004C7
RSVARG116004C8
RSVARG116004C9
RSVARG116004C10
RSVARG22504C1
RSVARG22504C2
RSVARG22504C3
RSVARG22504C4
RSVARG22504C5
RSVARG22504C6
RSVARG22504C7
RSVARG22504C8
RSVARG22504C9
RSVARG22504C10
RSVARG22504C11
RSVARG22504C12
RSVARG22504C13
RSVARG22504C14
RSVARG22504C15
RSVARG22504C16
RSVARG22504C17
RSVARG22504C18
RSVARG22504C19
RSVARG22504C20
RSVARG22504C21
RSVARG22504C22
RSVARG22504C23
RSVARG22504C24
RSVARG22504C25
RSVARG22504C26
RSVARG22504C27
RSVARG22504C28
RSVARG22504C29
RSVARG22504C30
RSVARG22504C31
RSVARG22504C32
RSVARG22504C33
RSVARG22504C34
RSVARG22504C35
RSVARG22504C36
RSVARG22504C37
RSVARG22504C38
RSVARG22504C39
RSVARG22504C40
RSVARG22504C41
RSVARG22504C42
RSVARG22504C43
RSVARG22504C44
RSVARG22504C45
RSVARG22504C46
RSVARG22504C47
RSVARG22504C48
RSVARG22504C49
RSVARG22504C50
RSVARG22504C51
RSVARG22504C52
RSVARG22504C53
RSVARG22504C54
RSVARG22504C55
RSVARG22504C56
RSVARG22504C57
RSVARG22504C58
RSVARG22504C59
RSVARG22504C60
RSVARG22504C61
RSVARG22504C62
RSVARG22504C63
RSVARG22504C64
RSVARG22504C65
RSVARG22504C66
RSVARG22504C67
RSVARG22504C68
RSVARG22504C69
RSVARG22504C70
RSVARG22504C71
RSVARG22504C72
RSVARG22504C73
RSVARG22504C74
RSVARG22504C75
RSVARG22504C76
RSVARG22504C77
RSVARG22504C78
RSVARG22504C79
RSVARG22504C80
RSVARG22504C81
RSVARG22504C82
RSVARG22504C83
RSVARG22504C84
RSVARG22504C85
RSVARG22504C86
RSVARG22504C87
RSVARG22504C88
RSVARG22504C89
RSVARG22504C90
RSVARG22504C91
RSVARG22504C92
RSVARG22504C93
RSVARG22504C94
RSVARG22504C95
RSVARG22504C96
RSVARG22504C97
RSVARG22504C98
RSVARG22504C99
RSVARG22504C100

4.3.3. Dinámica y evolución de las variantes encontradas en las muestras clínicas analizadas

Para analizar el contexto de las poblaciones virales encontradas en cada muestra clínica y determinar si alguna variante hallada entre las mismas tenía relación con las cepas que circularon en el país durante el período en estudio, se determinaron las relaciones filogenéticas entre las secuencias nucleotídicas de todos los clones y las secuencias directas de las cepas argentinas que habían sido analizadas en la sección correspondiente al análisis molecular de HRSV subtipo A. En la Figura 30 se muestra el árbol obtenido por inferencia bayesiana en el cual se utilizó la cepa patrón Long/56 como outgroup. Todas las cepas argentinas secuenciadas en forma directa permanecieron asociadas a los dos genotipos que se les habían asignado previamente (GA2 y GA5). Con respecto a los diferentes grupos de variantes correspondientes a cada muestra, se observaron distintos comportamientos:

- Para el caso del par ARG6560/01-ARG6751/01, todas las variantes analizadas se asociaron junto con sus secuencias directas en un clado independiente de los demás soportado por una probabilidad posterior de 1, dentro del genotipo GA5. Además en el mismo clado se encontraron asociadas cepas que circularon el año anterior y ese mismo año (2000 y 2001). No se diferenciaron las variantes de la primera muestra de las de la segunda muestra.
- En el caso de las muestras ARG4018/01 y ARG4389/01, se observó que todas las variantes de la muestra ARG4018/01 se asociaron entre sí con su secuencia directa (probabilidad posterior 0,83). Ocho de las nueve variantes analizadas de la muestra ARG4389/01 también se asociaron entre sí a su secuencia directa y a cepas que circularon durante el mismo período en el país (probabilidad posterior 0,83) pero en un clado separado de las variantes de la muestra ARG4018/01. Mientras que la variante restante (clon 8), se alejó de éstas y se asoció a un clado separado.
- Las variantes de las muestras ARG577/00 y ARG22516/97 se asociaron nuevamente entre sí y con sus secuencias directas, y para el caso de la primera, ésta se encontró relacionada con cepas que circularon durante el mismo año (2000). Ambos clados fueron soportados por una probabilidad posterior de 1.

En el caso particular del par de muestras ARG1160/04-ARG2525/04 se realizaron observaciones atípicas en el árbol filogenético de la Figura 30:

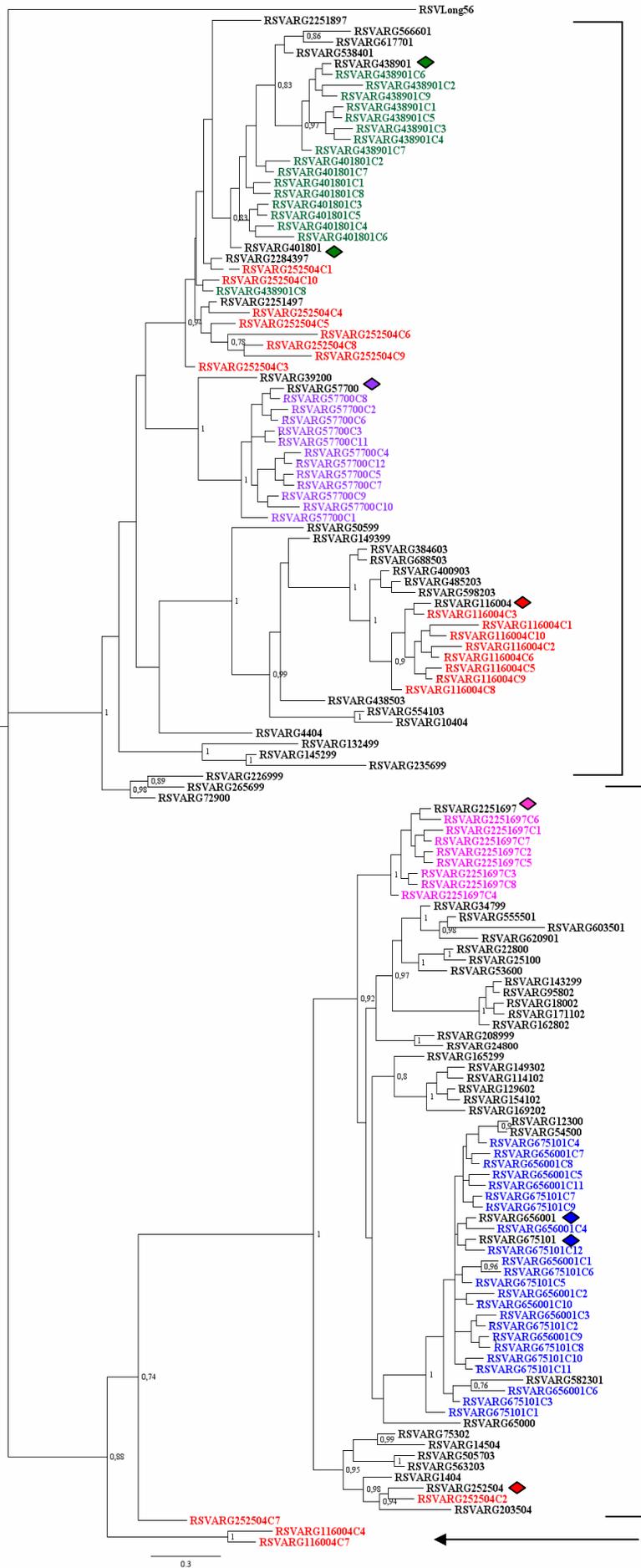
- Ocho de las 10 variantes analizadas de la muestra ARG1160/04 se asociaron en un clado con la secuencia directa de esta muestra, soportadas por una probabilidad posterior de 0,9, dentro del genotipo GA2. Las dos variantes restantes (clones 4 y 7) se hallaron asociadas entre sí en un clado separado con un buen soporte estadístico, pero notablemente fuera de los dos grandes genotipos descritos previamente en los que habían sido clasificadas las cepas argentinas (GA2 y GA5).
- Las variantes de la muestra ARG2525/04 se encontraron distribuidas en todo el árbol. Por un lado sólo una de las mismas (clon 2) se encontró asociada con la secuencia directa dentro del genotipo GA5 (asignado para esta cepa en la sección anterior), a su vez se encontró relacionada con cepas argentinas que circularon durante el mismo año 2004 y el anterior 2003 (clado soportado por una probabilidad posterior de 0,95).

El clon RSVARG2525/04C7 se asoció a las dos variantes de la muestra ARG1160/04 (clones 4 y 7) antes mencionadas en un clado separado del de los genotipos descritos. Para corroborar que este nuevo clado no correspondiera a otro genotipo ya existente pero no descrito entre las cepas argentinas pertenecientes a este estudio, se realizó un nuevo análisis filogenético agregando cepas correspondientes a distintos brotes anuales provenientes de distintos lugares del mundo que habían sido utilizadas para realizar los árboles de la sección correspondiente al subtipo A (obtenidas de *GenBank*). Nuevamente se observó que pesar de agregar cepas representativas de todos los genotipos descritos previamente, estas tres variantes (RSVARG1160/04C4, RSVARG1160/04C7 y RSVARG2525/04C7) continuaron asociadas entre sí y en un clado aparte del resto de los genotipos representados, soportado por una probabilidad posterior de 1 (Figura 31).

Las ocho variantes restantes de la muestra ARG2525/04 se hallaron asociadas con el genotipo GA2, coincidiendo con el asignado a la secuencia directa de la primera muestra clínica de este paciente (ARG1160/04). No obstante, estas variantes se encontraron en un clado separado del correspondiente a las variantes de la primera muestra (Figura 30 y Figura 31).

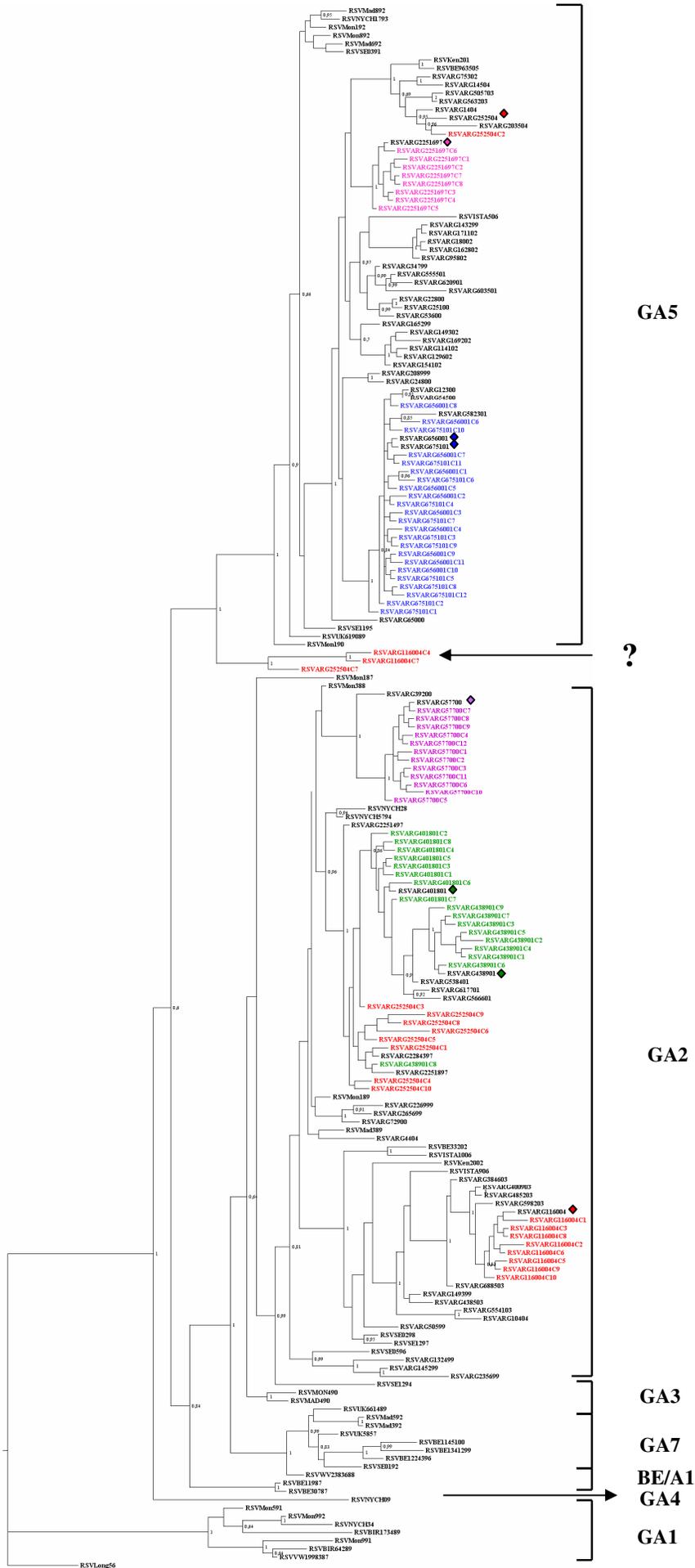
Figura 30 (Página siguiente). Árbol filogenético construido por inferencia bayesiana relacionando a las cepas argentinas del HRSV correspondientes al subtipo A (circulantes durante el período 1999-2004) y la totalidad de las variantes genéticas (clones) encontradas en las muestras clínicas analizadas en esta sección.

Los distintos grupos de variantes pertenecientes a cada par de muestras clínicas se encuentran marcados en colores individuales y su secuencia directa correspondiente se indica con un rombo del mismo color. Los genotipos son delimitados por corchetes. Las tres variantes ubicadas en un genotipo independiente de los otros conocidos previamente, se marcan con un signo de interrogación. Sólo las probabilidades posteriores mayores a 0,6 son mostradas.



GA2

GA5



GA5

?

GA2

GA3

GA7

BE/A1

GA4

GA1

Figura 31 (Página anterior). Árbol filogenético construido por inferencia bayesiana relacionando cepas del HRSV subtipo A (circulantes en el mundo durante el período 1999-2004) y la totalidad de las variantes genéticas (clones) encontradas en las muestras clínicas analizadas en esta sección.

Los distintos grupos de variantes pertenecientes a cada par de muestras clínicas se encuentran marcados en colores individuales y su secuencia directa correspondiente se indica con un rombo del mismo color. Los genotipos son delimitados por corchetes. Las tres variantes ubicadas en un genotipo independiente de los otros conocidos previamente, se marcan con un signo de interrogación. Sólo las probabilidades posteriores mayores a 0,6 son mostradas.

Tomando en cuenta la prologada infección con HRSV que presentó el paciente de quien fueron tomadas las muestras ARG1160/04 y ARG2525/04 (al menos 41 días), sumado a las observaciones previamente detalladas en relación a los elevados valores de distancias genéticas para cada conjunto de clones, la existencia de sustituciones N en regiones informadas como altamente variables, como así también las señales filogenéticas generadas por las tres variantes descritas ubicadas en una posición intermedia en los árboles obtenidos (Figura 30 y Figura 31), llevaron a profundizar el análisis en este par de muestras.

En la Figura 32 se representa el alineamiento de nucleótidos correspondiente a todos los clones analizados para estas muestras. En el mismo se observa que entre los clones de la primera muestra (RSVARG1160/04C1-10) se encontraron en principio dos tipos de variantes genéticas mayoritarias, con una frecuencia de 2/10 correspondientes a los clones 4 y 7 con las características filogenéticas atípicas en cuanto a su genotipo, y el resto de las variantes (8/10) pertenecientes al genotipo GA2. Entre las variantes de la segunda muestra (RSVARG2525/04C1-10), se encontraron al menos tres tipos de secuencias nucleotídicas diferentes, dos de los cuales correspondían a los dos genotipos descritos GA2 y GA5 (Figura 32). A su vez, ninguna de las variantes halladas en la primera muestra presentó la misma secuencia nucleotídica que las analizadas en la segunda, pero notoriamente entre las encontradas en la segunda muestra, la variante RSVARG2525/04C7 poseía, entre los nt 286 y aproximadamente el nt 470, exactamente la misma secuencia de nucleótidos que las variantes RSVARG1160/04C4 y C7, y que luego el resto de su secuencia nucleotídica era casi idéntica a variantes halladas en la misma muestra (ARG2525/04).

Figura 32 (Página siguiente). Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las variantes analizadas para el par de muestras ARG1160/04-ARG2525/04.

Las identidades en nucleótidos se encuentran indicadas con puntos. Las secuencias de las variantes de cada muestra que se hallaron en un clado intermedio en la Figura 30 y la Figura 31 se indican con una línea continua, y sus nombres recuadrados en color rojo.

A pesar de que no se descarta que este paciente se haya coinfectado con varios tipos de virus a la vez, no se encontró ninguna secuencia con las mismas características genéticas de estas tres variantes atípicas entre todas las cepas argentinas que circularon durante el mismo período que ocurría este evento. Asimismo, las similitudes en distintos fragmentos de la secuencia nucleotídica de la variante RSVARG2525/04C7 descritas en el párrafo anterior, conjuntamente con las señales filogenéticas observadas, eran indicios de que podría haber ocurrido un evento de recombinación intergenotípica entre variantes que coinfectaban a este paciente.

Continuando con el análisis, en primera instancia se intentó explicar por qué sólo una variante estudiada de la muestra ARG2525/04 (clon 2) se asociaba en el análisis filogenético con su secuencia directa correspondiente. Analizando en detalle los electroferogramas obtenidos previamente, se observó que en ciertas posiciones de los mismos había ambigüedad de bases nucleotídicas que coincidían con las posiciones que estaban representadas por más de una base entre las variantes encontradas en la muestra clínica. De todas maneras no se explicaba la baja frecuencia de la variante correspondiente al clon 2, y el predominio de los picos de sus bases en el electroferograma. Para eliminar la posibilidad de que estos eventos se debieran a defectos en la amplificación producidos por la polimerasa utilizada o el método de clonación, se procedió a repetir la extracción de ARN de la muestra clínica. Se reamplificó la glucoproteína G, y nuevamente se secuenció la misma en forma directa. Posteriormente se clonó el nuevo fragmento amplificado y se seleccionaron 12 nuevos clones que fueron secuenciados (RSVARG2525/04C11-22).

La secuencia directa de la muestra reextraída y reamplificada resultó ser exactamente igual a la obtenida previamente, perteneciendo al genotipo GA5, y presentando las mismas ambigüedades en los electroferogramas. El alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los 12 nuevos clones, más las secuencias de las variantes obtenidas previamente se ilustra en al Figura 33. El nuevo proceso de clonado y secuenciación permitió confirmar a las variantes encontradas y descritas anteriormente, pero la frecuencia de las mismas fue diferente. Este hecho fue observado en el alineamiento de la Figura 33 así como en el análisis filogenético agregando el nuevo grupo de variantes (RSVARG2525/04C11-22, ver apéndice 5, Figura 10 y Figura 11). Se encontró que ocho de los 12 clones analizados se asociaron en el clado de la variante RSVARG2525/04C2 junto con la secuencia directa de esta cepa apoyando la asignación del genotipo GA5 previa para la misma y aumentando la frecuencia de la variante

genética correspondiente al clon 2. Era evidente que la frecuencia de las variantes en esta muestra no estaba totalmente representada en el primer clonado (Tabla XI y Tabla XII). Los cuatro nuevos clones (clones 11 y 17-19) se asociaron en el clado del de las variantes mayoritarias del proceso de clonado anterior en el genotipo GA2.

Figura 33 (Página siguiente). Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las 22 variantes analizadas para la muestra ARG2525/04.
Las identidades en nucleótidos se encuentran indicadas con puntos.

Para determinar si las posiciones filogenéticas intermedias de las tres variantes descritas previamente se debían a eventos de recombinación entre los dos genotipos de HRSV que estaban coinfectando el mismo paciente, se aplicó el programa que analiza este tipo de eventos RDP3. Cuando se analizaron en conjunto todos los clones correspondientes a ambas muestras del mismo paciente se identificaron tres eventos de recombinación con probabilidades significativas para las variantes RSVARG1160/04C4, RSVARG1160/04C7 y RSVARG2525/04C7, los mismos serán denominados a partir de ahora como eventos 1, 2 y 3, respectivamente. En la Tabla XIII se presentan los valores de las probabilidades determinadas para cada evento detectado por los distintos métodos aplicados. Como puede observarse seis de los nueve métodos detectaron eventos de recombinación entre las variantes que coinfectaban al paciente. Los puntos de corte donde probablemente hayan ocurrido los mismos detectados por los seis métodos de RDP3, fueron en las posiciones nucleotídicas 472 para las variantes RSVARG1160/04C4 y RSVARG1160/04C7; y 573 para RSVARG2525/04C7. Se analizaron las secuencias parentales para cada posible recombinante. En el caso de las dos primeras variantes, las probables secuencias parentales correspondían a una variante perteneciente a la segunda muestra clínica o posterior en el tiempo (ARG2525/04) y otra a la misma muestra de la variante recombinante (ARG1160/04), evento que no era factible debido a que no podía existir en la primer muestra clínica una variante recombinante originada por una variante que infectó posteriormente al paciente. No obstante, podía suceder que esa variante no se hubiera detectado entre los 10 clones que se analizaron en la primer muestra, pero sí hubiera estado presente en la misma, puesto que la evidencia de recombinación se detectó en esas variantes inclusive analizando todas las cepas circulantes en Argentina durante el mismo período, más las variantes genéticas encontradas en todas las muestras clínicas estudiadas.

Tabla XIII. Análisis de recombinación mediante el programa RDP3.

Resultado generado al analizar el alineamiento de las secuencias de las variantes genéticas encontradas en las muestras ARG1160/04 y ARG2525/04. nd: no detectado.

Método utilizado para detectar recombinación	Nº de eventos detectados	Av. P-Val
RDP	nd	nd
GENECONV	nd	nd
BootScan	2	2,470x10-3
MaxChi	3	3,722x10-5
Chimera	3	3,335x10-5
SiScan	3	6,825x10-10
PhylPro	nd	nd
LARD	1	3,186x10-316
3Seq	3	4,275x10-9

Para el caso de la variante probable recombinante encontrada en la segunda muestra clínica (RSVARG2525/04C7), las posibles secuencias parentales pertenecían: una a la primera muestra clínica (en este caso era lógico) y otra a la segunda muestra. De todas maneras era posible que esta variante se hubiera generado a partir de la recombinación de secuencias sólo encontradas al mismo tiempo en la segunda muestra clínica. Para ello se aplicó el programa RDP3 sólo a las 22 variantes pertenecientes a la muestra ARG2525/04, en este nuevo análisis siete de los nueve métodos detectaron un evento de recombinación para RSVARG2525/04C7, con valores de probabilidad superiores a los obtenidos anteriormente (Tabla XIV). El punto de corte nuevamente fue la posición nt 573, y las secuencias parentales se encontraban entre las demás variantes halladas en la misma muestra.

Tabla XIV. Análisis de recombinación mediante el programa RDP3.

Resultado generado al analizar el alineamiento de las secuencias de las variantes genéticas encontradas en la muestra ARG2525/04. nd: no detectado.

Método utilizado para detectar recombinación	Nº de eventos detectados	Av. P-Val
RDP	nd	nd
GENECONV	1	6,358x10 ⁻³
BootScan	1	4,492x10 ⁻⁵
MaxChi	1	1,339x10 ⁻⁶
Chimera	1	1,148x10 ⁻⁶
SiScan	1	5,607x10 ⁻⁷
PhylPro	nd	nd
LARD	1	9,894x10 ⁻³¹⁷
3Seq	1	5,031x10 ⁻¹⁰

Para testear la recombinación en forma adicional, se construyeron árboles filogenéticos por inferencia bayesiana para las regiones de las secuencias de nucleótidos correspondientes a ambos lados de los puntos de corte detectados por los métodos del programa RDP3 (Figura 34 y Figura 35).

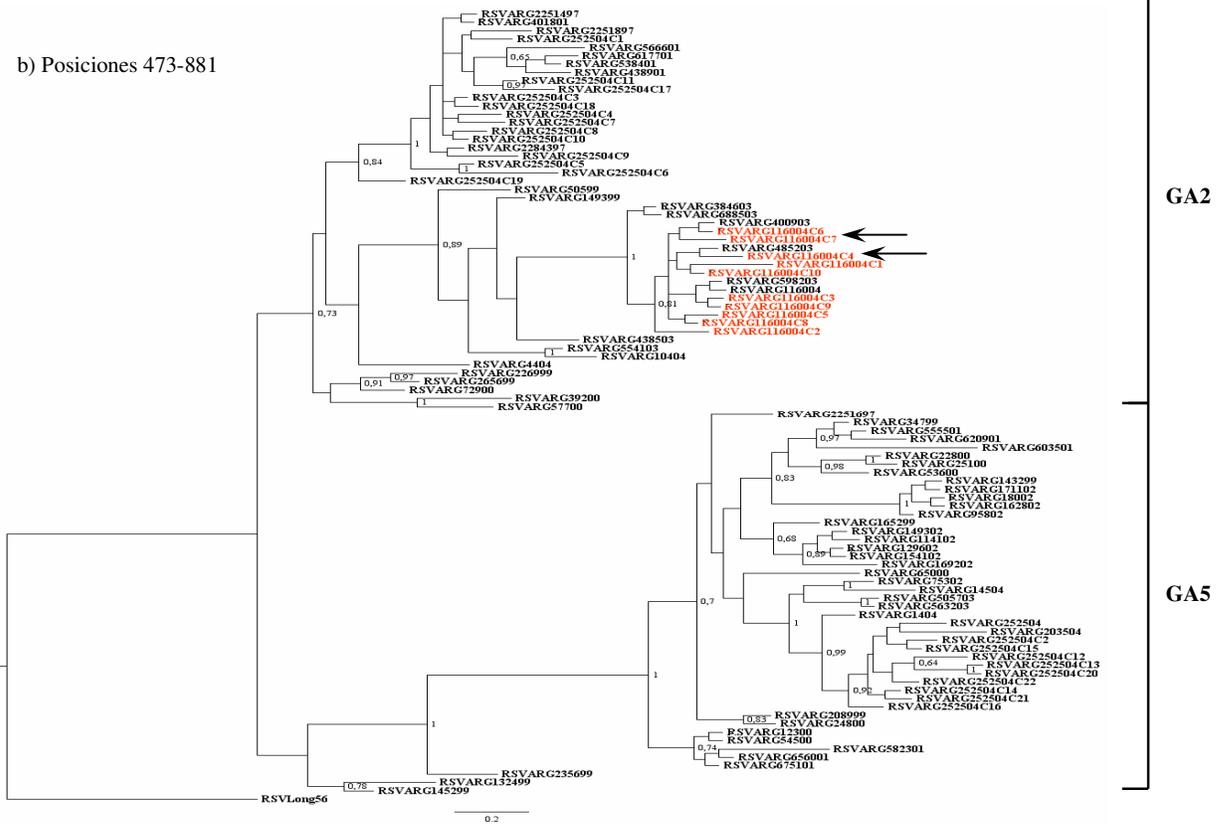
Figura 34 (Página siguiente). Posiciones filogenéticas cambiantes de las variantes RSVARG1160/04C4 y RSVARG1160/04C7 (marcadas con una flecha) indicativas de probable recombinación intergenotípica (eventos 1 y 2).

Los árboles fueron obtenidos por inferencia bayesiana para los fragmentos a ambos lados del punto de corte (nt 472). Se utilizaron todas las secuencias de los clones de las muestras clínicas en estudio (color rojo) más las secuencias directas de las cepas que circularon en la Argentina durante el periodo analizado. Sólo las probabilidades posteriores superiores a 0,6 son mostradas.

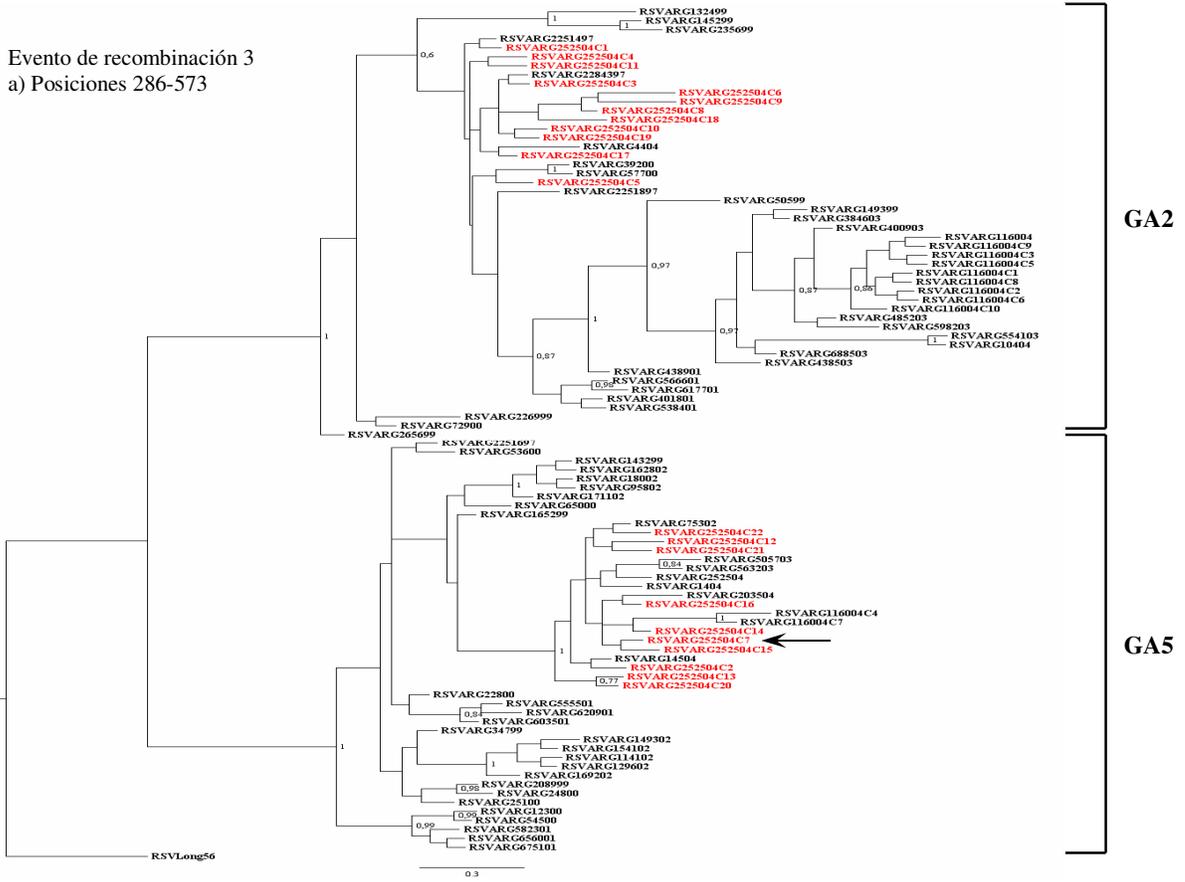
Eventos de recombinación
1 y 2
a) Posiciones 286-472



b) Posiciones 473-881



Evento de recombinación 3
a) Posiciones 286-733



b) Posiciones 574-881

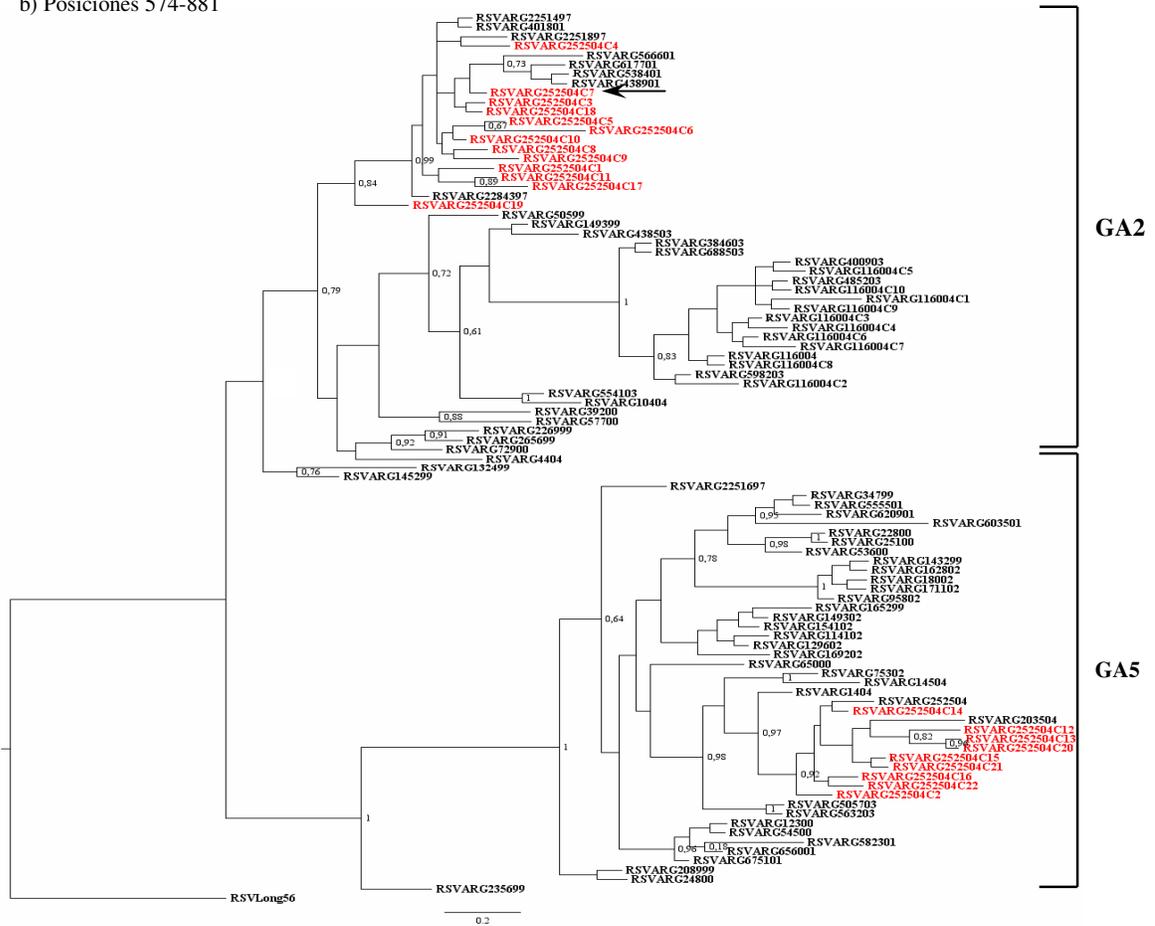


Figura 35 (Página anterior). Posición filogenética cambiante de la variante RSVARG2525/04C7 (marcada con una flecha) indicativa de recombinación intergenotípica (evento 3).

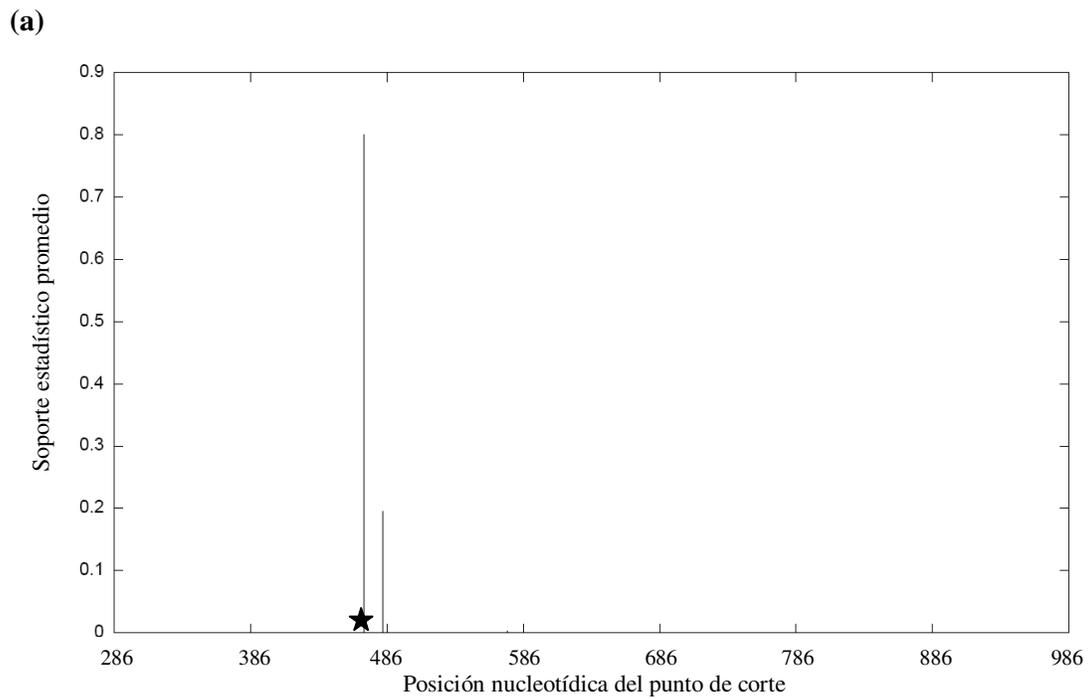
Los árboles fueron obtenidos por inferencia bayesiana para los fragmentos a ambos lados del punto de corte (nt 573). Se utilizaron todas las secuencias de los clones de las muestras clínicas en estudio (color rojo) más las secuencias directas de las cepas que circularon en la Argentina durante el periodo analizado. Sólo las probabilidades posteriores superiores a 0,6 son mostradas.

Este análisis proporcionó evidencia convincente de recombinación entre los genotipos GA2 y GA5 que coinfectaron al paciente, involucrando las variantes RSVARG1160/04C4 y RSVARG1160/04C7 (eventos de recombinación 1 y 2, Figura 34) y la variante RSVARG2525/04C7 (evento de recombinación 3, Figura 35). Para cada uno de estos recombinantes, se observó fuerte incongruencia filogenética indicativa de probables eventos de recombinación. Estos virus ocuparon diferentes posiciones filogenéticas (genotípicas) a ambos lados de los puntos de corte específicos que fueron soportados por altos valores de probabilidades posteriores en los árboles. Ninguna de las otras variantes correspondientes a cada muestra clínica, ni las secuencias directas de las muestras circulantes en Argentina durante el período en estudio agregadas en este análisis, mostró incongruencia filogenética como la observada con las variantes en cuestión.

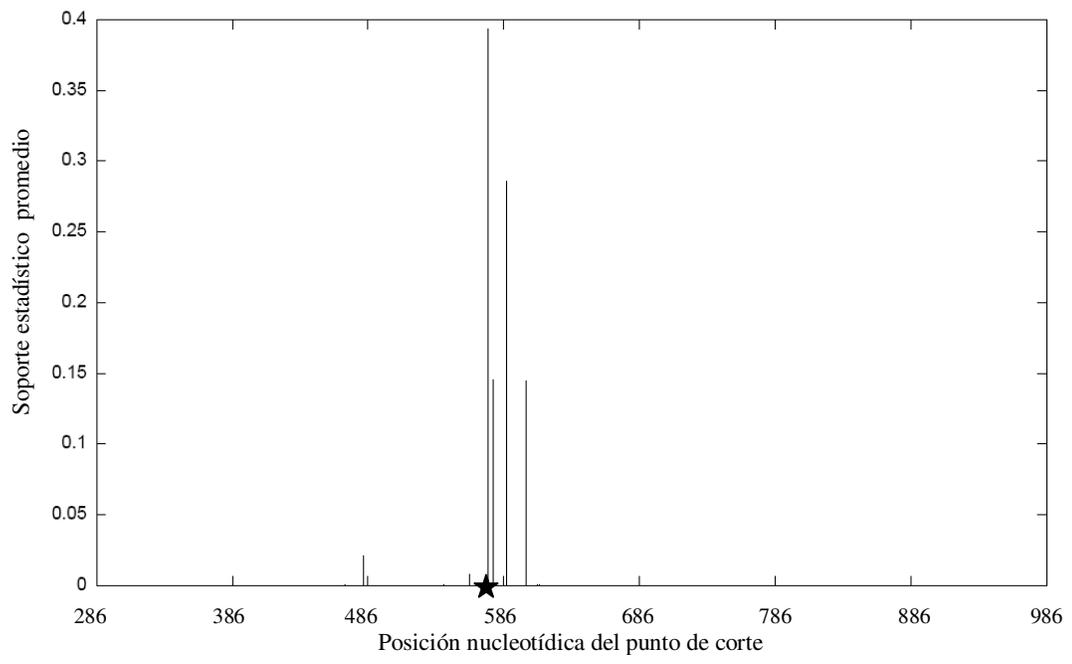
Por último se utilizó el método GARD, basado en el criterio de MV, para confirmar los puntos de corte. El mismo se aplicó sobre el alineamiento de la totalidad de las variantes presentes en ambas muestras clínicas, y sobre el alineamiento de las 22 variantes de la muestra ARG2525/04. En ambos casos la posición de los sitios de recombinación coincidió con la determinada previamente por los distintos métodos del programa RDP3, siendo la posición nucleotídica 472, para los eventos 1 y 2, y la posición 573 para el evento 3. En la Figura 36 se muestran los gráficos obtenidos para ambos casos, en los cuales se observó para el primero un soporte estadístico elevado para la posición 472, mientras que para el segundo caso, si bien la posición 573 fue la mejor soportada estadísticamente, existieron otros puntos de corte probables, pero que se encontraban muy cercanos a la posición antes determinada. Esta observación podría deberse a que si se analiza detalladamente el alineamiento de la Figura 33, todas las variantes correspondientes a la muestra ARG2525/04 son casi idénticas entre sus nucleótidos 573 y 599, posiciones que probablemente pudieran ser puntos de corte para la recombinación.

Todos los métodos aplicados apoyan la posibilidad de recombinación homóloga del RSV en el humano, al menos en este caso, el de una infección persistente en un paciente con una enfermedad de base que se encontraba coinfectado por más de un genotipo a la vez. Un evento genético de estas características no ha sido descrito previamente para el HRSV y es importante tenerlo en cuenta ya que podrían tener implicaciones en la generación de variabilidad genética y se debería analizar su presencia y efectos en un futuro en el cual pueda diseñarse y producirse una vacuna.

Figura 36. Valores de soporte estadístico promedio del modelo aplicado a cada punto de corte de recombinación detectado para a) el alineamiento de todas las variantes de las muestras ARG1160/04 y ARG2525/04 y b) el alineamiento de las variantes de la muestra ARG2525/04. Los puntos de corte detectados con mayores soportes estadísticos y coincidentes con los determinados por métodos aplicados previamente están marcados con una estrella.



(b)



5. DISCUSIÓN

5.1 Marco Epidemiológico De Las IRAB En Pacientes Pediátricos En La Ciudad De Buenos Aires, Argentina.

Durante los seis períodos epidémicos consecutivos estudiados en el presente trabajo de Tesis Doctoral (1999-2004) se analizaron en el Laboratorio de Virología del Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez un total de 22.416 muestras de ANF provenientes de niños hospitalizados en la ciudad de Buenos Aires y el gran Bs. As. que presentaban IRAB. El diagnóstico de la etiología viral se realizó por IFI, un método rápido que permite procesar diariamente un elevado número de muestras clínicas. Asimismo es la técnica de elección para el diagnóstico de virus respiratorios en muestras de ANF provenientes de pacientes pediátricos, teniendo una alta sensibilidad y especificidad (93-98% y 92-97%, respectivamente) para el caso del HRSV en los primeros días de comenzados los síntomas clínicos (Henrickson and Hall, 2007).

La frecuencia global de la etiología viral detectada fue elevada y casi constante entre los años 2000 y 2002 alcanzando valores cercanos al 40%, luego en los años siguientes (2003-2004) mostró un incremento de casi ocho puntos en su frecuencia. Sin embargo en el año 1999, esta frecuencia fue significativamente menor (26,2%), particularmente en el número total de casos con HRSV como agente causal de la IRAB. Además, aunque el análisis del año 1998 no está incluido en este trabajo, el número total de muestras de ANF que se recibieron en el laboratorio fue de 3.458, sin embargo también hubo menos casos con etiología viral asignada (N=749, 21,6%). Durante este último período (1998-1999) se produjo un brote epidémico de Sarampión en nuestro país, presentando su pico máximo en la ciudad de Buenos Aires en julio de 1998, con un número total de 6.283 casos confirmados en niños menores de cinco años (Bilkis *et al.*,2000; Hersh *et al.*,2000). Tomando en cuenta que este último, es un virus que presenta la misma vía de ingreso al organismo (vías aéreas superiores), que los individuos susceptibles son los mismos y que cierto grado de protección cruzada podría existir entre el HRSV y el Sarampión, ambos como miembros pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae*, es posible que haya influido en los resultados obtenidos, ocupando el mismo nicho de los virus respiratorios analizados en este trabajo de Tesis

(Barrero *et al.*,2001; Collins *et al.*,2001). También es posible que durante esos años hubiera circulado alguno de los virus respiratorios que hasta ese momento no habían sido incluidos dentro de panel de los virus respiratorios que se analizaban como probables agentes etiológicos de las IRAB en pediatría, pero que hoy en día se incluyen en dichos estudios (por ej: MPV, rinovirus, bocavirus, etc).

El HRSV fue el patógeno viral más frecuentemente detectado durante los meses de invierno alcanzando una frecuencia global del 80,2% de los casos positivos. Este predominio sobre el resto de los virus respiratorios fue observado en los seis años analizados, según el diagnóstico clínico (63% BQL) y distribución de edades de los pacientes (93% niños menores de un año) y en concordancia con estudios previos y recientes sobre la etiología viral de las IRAB en pacientes pediátricos (Videla *et al.*,1998; Straliozzo *et al.*,2002; Kling and Chen, 2003; Tang *et al.*,2008; Marguet *et al.*,2009; Mlinaric-Galinovic *et al.*,2009). Debido a que la inmunidad contra el HRSV es incompleta y no dura toda la vida, las reinfecciones son comunes y podrían ser un factor que permita que este virus sea el más prevalente entre todos los virus respiratorios estudiados (Mufson *et al.*,1987).

Por otro lado, en la bibliografía no existe consenso con respecto a la frecuencia y prevalencia respecto de los virus restantes estudiados, principalmente debido a los diversos métodos de detección utilizados, las poblaciones en estudio y los criterios de selección de las mismas. Los resultados hallados en este trabajo de Tesis muestran que FluA fue la segunda etiología viral más frecuentemente detectada (8,2% de los casos positivos), seguido de HAdV (6,72%), PIV (4,74%) y FluB (0,3%). Como fue mencionado en la introducción, en los últimos años los estudios de otros autores han mostrado que el rinovirus era la segunda etiología viral más frecuente, seguida por HAdV, FluA y PIV, otros autores informaron que PIV predominaba sobre los restantes virus, con escasas diferencias entre HAdV y FluA, o que HAdV lo hacía sobre los restantes (Carballal *et al.*,2001; Claesson *et al.*,1989; Kim *et al.*,2000; Mahony, 2008; Bharaj *et al.*,2008). A pesar de que en el año 2001 se describió al MPV como agente productor de IRAB en pacientes pediátricos, no fue hasta los últimos años incorporado al diagnóstico de rutina de los laboratorios de virología, encontrándose una frecuencia de entre 1,5-5% (Heikkinen *et al.*,2008; Kaplan *et al.*,2008).

De manera interesante, en el año 2002, no se detectaron casos de FluA en el laboratorio, mientras que en el año 2001 este virus alcanzó su mayor frecuencia sobre todo el período de estudio. En el año 2001, en la ciudad de Buenos Aires se realizó una gran campaña informativa resaltando la importancia de la prevención contra el virus de influenza mediante la utilización de la vacuna. Ésto llevó a una vacunación masiva con la formulación de la vacuna sugerida por la Organización Mundial de la Salud para el hemisferio sur, la cual compartía características antigénicas con los virus de influenza circulantes en 2001 y posteriormente en 2002 (Boletín GROG, 2000 and 2001; WHO, 2000 and 2001). Por consiguiente, como resultado de la vacunación durante el 2001 que confirió inmunidad contra el FluA en 2002, es probable que la circulación viral se haya reducido, y haya llevado a una disminución de la transmisión del virus de persona a persona, disminuyendo el número de casos de FluA detectados. Curiosamente, en el año 2002 las frecuencias de HAdV y PIV compensaron parcialmente la ausencia de FluA durante ese año (9,7 y 10,2%, respectivamente).

Con respecto a la estacionalidad, los datos presentados en este trabajo de Tesis muestran una clara tendencia cíclica anual para los virus analizados, como ha sido reportado previamente (Curwen, 1997; Lieberman *et al.*, 1999; Carballal *et al.*, 2001). La mayoría de los investigadores han tratado de explicar la alta tasa de IRAB en los meses de invierno como una consecuencia directa de las condiciones de hacinamiento de individuos susceptibles en habitaciones muy calefaccionadas y ambientes viciados (Collier and Oxford, 2000). No obstante, no es una razón suficiente para explicar la variación observada entre los distintos virus respiratorios, por ejemplo, el clima debería jugar un rol importante. De esta manera la estacionalidad podría tener dos componentes: la susceptibilidad del huésped y la viabilidad viral. Se ha sugerido que la exposición invernal al aire causa enfriamiento de las vías aéreas nasales llevando a una defensa de mucosas disminuida, que incluiría la reducción del aclarado mucociliar y la alteración del movimiento continuo de mucus al exterior que actúa como barrera física, mecanismo sumamente importante en la inmunidad primaria contra las infecciones respiratorias. Por consiguiente, la caída de la temperatura disminuiría la actividad metabólica y reduciría tanto la frecuencia del movimiento ciliar, como la velocidad de secreción de mucus, así como la respuesta inmune local que involucra los leucocitos polimorfonucleares fagocíticos y las células natural killers (Proctor, 1982; Eccles,

2002). Por lo tanto, cuando el cuerpo disminuye su temperatura como resultado de un ambiente frío, el ingreso de los virus al tracto respiratorio inferior se vería favorecido.

Por otro lado, la viabilidad viral también podría verse afectada por los factores climáticos. Cuando se calculó el test de correlación de Spearman para el caso del HRSV, el coeficiente reveló una asociación inversa significativa con la temperatura media mensual y la radiación solar UVB, mientras que se obtuvo una asociación positiva significativa cuando se consideró la humedad relativa. Este virus es propenso a perder infectividad bajo condiciones ambientales hostiles tales como las altas temperaturas, la alta radiación solar UVB y la baja humedad relativa (también se ha observado para el FluA). Ésto sería atribuible a la naturaleza lábil de su estructura, debido a que es un virus envuelto y posee un genoma más inestable (ARN) y expuesto que el HAdV (ADN) entre otros (Hambling, 1964; Rechsteiner and Winkler, 1969; Hammond *et al.*, 1989). Es decir, que la correlación entre la frecuencia del HRSV y la temperatura, la radiación solar UVB, y la humedad relativa podrían ser una de las razones que explicarían por qué los brotes ocurren en invierno solamente. En contraste y a modo explicativo, el HAdV al ser un virus no envuelto, parecería no ser afectado por las condiciones ambientales como se ha evidenciado en su patrón de circulación anual (Viegas *et al.*, 2004). La posibilidad de poder predecir los brotes epidémicos de las infecciones respiratorias virales a través de la asociación entre sus frecuencias y los parámetros meteorológicos (determinando la estacionalidad de los mismos), debería ser considerada como una guía útil para el planeamiento médico, el diagnóstico de laboratorio y la prevención de las IRAB. De esta manera se contribuiría por ejemplo, a la utilización racional de antibióticos que llevan a la propagación de resistencia a los mismos, como así tomar los recaudos necesarios en cuanto al aislamiento de los pacientes susceptibles en determinadas épocas del año. También instaurar terapias preventivas en pacientes a riesgo, como por ejemplo la administración del anticuerpo monoclonal humanizado (Palivizumab, MedImmune) para prevenir HRSV durante los meses que dura el brote epidémico de este virus.

5.2. Análisis Molecular Intermuestras

5.2.1. Distribución De Subtipos Del HRSV Durante El Período Analizado

Como fue mencionado anteriormente el HRSV fue el patógeno respiratorio viral más comúnmente detectado en los meses de invierno durante el período en estudio. No obstante, existe poca información disponible acerca de las características genéticas y antigénicas de sus brotes en países en vías de desarrollo como la Argentina, a excepción de unos pocos (Galiano *et al.*, 2005a; 2005b).

En este trabajo de Tesis se describe la caracterización genética del gen de la glucoproteína G de aislamientos de HRSV obtenidos de niños hospitalizados durante el período comprendido entre 1999 a 2004, más algunos aislamientos de 1997. Todo el análisis molecular fue realizado directamente sobre las muestras clínicas debido a que el rendimiento de las técnicas utilizadas fue suficiente para poder desarrollar todos los ensayos propuestos. Además, de esa manera se evitaba que el crecimiento de los virus en cultivo pudiera probablemente introducir variabilidad extra como mutaciones al gen de estudio, así como la posibilidad de seleccionar variantes distintas de las originales ante líneas celulares que utilizan diferentes receptores frente a los virus.

Se utilizó una multiplex RT-PCR anidada para clasificar a las muestras de HRSV en los dos subtipos A y B. Un total de 353 muestras fueron seleccionadas al azar, representando la totalidad de cada brote estudiado. Como ha sido publicado en estudios previos de diferentes autores y países, se observó una circulación simultánea de ambos subtipos durante el período analizado (Carballal *et al.*, 2000; Straliozzo *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001; Avendaño *et al.*, 2003). A pesar de que el subtipo A fue, en general, claramente dominante (65,7%), el subtipo B predominó durante dos períodos epidémicos (1999 y 2002), sugiriendo un rol importante para ambos subtipos en los brotes producidos por este virus en nuestro país.

5.2.2. Análisis Molecular Del HRSV Subtipo A

Para continuar con el estudio molecular, se realizó un análisis por RFLP de las cepas subtipo A obtenidas en la clasificación previa. La razón por la que se decidió utilizar esta técnica para el caso del subtipo A, con proyecciones posteriores al subtipo B, fue el de realizar un tamizaje previo que permitiera la selección de ciertas cepas para la secuenciación posterior del gen de la glucoproteína G, asimismo analizar si era posible correlacionarlas, y comparar con los resultados de publicaciones previas.

A pesar de que las designaciones de los patrones compuestos obtenidos en este estudio fueron diferentes de los publicados por otros autores, se encontró que algunos patrones individuales para ciertas enzimas utilizadas fueron previamente descritos por Rajala y col en 2003 (Rajala *et al.*, 2003), y eran comparables con los obtenidos de las muestras analizadas en esta Tesis. Por ejemplo, sus patrones individuales ra1, pa1, pa2 y ha1 fueron equivalentes a los encontrados entre las muestras argentinas, indicando la circulación mundial de cepas de HRSV con esos patrones. Desafortunadamente, estos autores no discriminaron el año de aislamiento de sus muestras y los patrones de restricción correspondientes, como para permitir comparar la distribución de los patrones argentinos con las obtenidas por ellos en distintos años.

En general, si bien se encontraron nueve patrones de restricción compuestos, los patrones PA1 (ra1pa1ha1) y PA2 (ra2pa1ha2) fueron los dominantes en el período estudiado (1999-2003), con frecuencias del 44,9% y 35,9%, respectivamente. El análisis de la distribución de los mismos año a año, mostró que no hubo alternancia entre los predomios de cada uno, y tomando en cuenta que estos dos patrones representaban el 80% de las muestras analizadas, no permitían obtener una variabilidad tal que sirviera de elección para el análisis genético posterior. Por tal motivo en el año 2003 se concluyó que este tipo de análisis no aportaba suficiente información en la clasificación molecular de las muestras, ni parecía ser una buena estrategia de selección de cepas para la secuenciación posterior. Luego en el año 2004 no se realizó este estudio sobre las muestras analizadas para el subtipo A, ni se utilizó posteriormente en el análisis molecular del subtipo B. A pesar de que la técnica de RFLP ha sido históricamente utilizada como una herramienta molecular para la clasificación de diversos microorganismos desde el punto de vista genético, permitiendo realizar diferentes

análisis estadísticos y hasta la construcción de árboles filogenéticos (Nei and Kumar, 2000), en la actualidad el avance de las técnicas de secuenciación de genes y hasta de genomas completos para el caso de los virus, la ha ido reemplazando. Asimismo, para el caso de virus con alta variabilidad genética como lo son los virus con genoma compuesto por ARN como es el HRSV, la utilización de los estudios moleculares mencionados permitieron obtener información más completa y realizar análisis evolutivos que de otra manera hubieran sido imposibles de alcanzar, debido a que sólo una sustitución nucleotídica es responsable de la generación de un determinado patrón de restricción, pero más de una sustitución es necesaria para asociar a un aislamiento con un genotipo y subgenotipo específico, definido por análisis filogenético. De todas maneras, si se quisiera realizar un estudio por RFLP que generara información sólo cercana a nivel genómico, se requerirían numerosas enzimas de restricción en conjunto para obtener resultados significativos, lo que haría de esta técnica artesanal un trabajo muy complejo que la alejaría del objetivo original para el que había sido propuesta como mecanismo de tamizaje previo.

Sin embargo hubo una observación interesante en cuanto a los patrones encontrados durante el año 1999, se halló una gran variabilidad representada por diferentes patrones de restricción compuestos (PA1, PA2 y PA4-PA7), mientras que los años restantes se encontraron como máximo tres patrones compuestos. Como se mencionó previamente durante el año 1999, hubo pocos casos de HRSV (N=802) en comparación con los demás años analizados. Podría ser posible que el bajo número de virus circulantes durante ese año permitiera la transmisión de ciertas variantes, las cuales no hubieran podido sobrevivir entre el 2000 y el 2004. Cuando un elevado número de virus está circulando en la población, se produce una masiva transmisión de partículas virales entre personas susceptibles (característica de grandes brotes), provocando que en un individuo afectado no se permitan cambios abruptos en la secuencia consenso de los virus que están infectándolo, sí en cambio puede permitir la selección de los virus más aptos. En contraste, cuando un brote presenta bajo número de virus circulantes (como lo observado en 1999) un cambio abrupto en la secuencia consenso está típicamente guiada por presión de selección positiva y a menudo involucra la transmisión de pequeñas poblaciones o aun de una sola partícula viral entre individuos susceptibles, permitiendo la circulación de múltiples variantes virales en la población (Holland *et al.*, 1992; Domingo and Holland, 1997; Larsen *et al.*, 2000).

A pesar de lo expuesto en el párrafo anterior y como consecuencia de las conclusiones encontradas en cuanto a la validez del tamizaje por RFLP, para el análisis por secuenciación se seleccionaron al azar 62 cepas de HRSV subtipo A, entre las que también se encontraban las que habían generado un patrón de restricción compuesto diferente de los dos principales mencionados (PA3-PA9, correspondientes al 20% de las cepas analizadas por RFLP). El análisis filogenético de las secuencias obtenidas por los diferentes criterios de inferencia filogenética mostró sólo dos genotipos previamente descritos GA2 y GA5 cocirculando durante el período de estudio, con una ligera predominancia del genotipo GA5. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por investigadores de otras partes del mundo durante los últimos años (Scott *et al.*,2004; Zlateva *et al.*,2004 and 2007, Sato *et al.*,2005; Reiche and Schweiger, 2009). En concordancia, en países limítrofes como Uruguay y Brasil, la mayoría de los aislamientos de HRSV subtipo A correspondieron a los mismos genotipos descritos en este estudio, no obstante también se encontraron cepas de los genotipos GA1 y GA7 (Frabasil *et al.*,2003; Araújo *et al.*,2004). Un trabajo realizado por un grupo de investigadores de CEMIC en nuestro país durante el período 1995-2001, coincidió con los genotipos hallados en este trabajo como así también que había otros como GA1, GA3 y GA7 pero en escasas muestras y pertenecientes a años previos a 1999 (Galiano *et al.*,2005). Además, en un trabajo publicado en 2008 y realizado en Campinas, Brasil se informa la circulación de cepas correspondientes al genotipo GA7 durante el año 1999 (da Silva *et al.*,2008). Una razón que explique las diferencias mencionadas previamente en relación a lo descrito en este trabajo de Tesis, podría deberse a que, como fue mencionado anteriormente, el 93% de los pacientes hospitalizados analizados en este estudio fueron niños menores de un año de edad, mientras que en general todos los trabajos referenciados fueron realizados en niños menores de cinco años. Los niños menores de un año podrían estar sufriendo su primer episodio de IRAB producida por HRSV, y no tendrían altos títulos de anticuerpos neutralizantes anti-HRSV, sólo los recibidos por vía materna. Tomando en cuenta que GA2 y GA5 son los genotipos virales que circularon más frecuentemente en la población, podrían haber constituido la “oferta viral” más probable para esos niños. Mientras que los niños de edades mayores a un año podrían estar cursando su segundo o tercer episodio de HRSV, y así estarían infectados sólo con genotipos que tuviesen mayores diferencias genéticas con aquellos virus con los que pudieron haber sido infectados en su primer episodio de IRAB por

HRSV y contra los cuales hubieren generado anticuerpos. Se ha sugerido que esas diferencias genéticas podrían favorecer el “escape” de los virus a la respuesta inmune previa y contribuir a la capacidad del HRSV de establecer infecciones durante toda la vida de un individuo (Melero *et al.*, 1993; García *et al.*, 1994).

Por otro lado, en relación a la circulación del genotipo GA1, observando los años en que fueron aisladas las cepas que se asociaron al mismo (1987, 1989, 1991 y 1992) y viendo la distribución y soporte de los clados en los análisis filogenéticos, podría tratarse de un genotipo que ha sido reemplazado por los demás a través de los años, indicando que la capacidad de adaptación viral (del inglés *viral fitness*) podría tener un rol importante en la distribución y circulación de los genotipos.

A diferencia de lo esperado y publicado previamente sobre el HRSV (Choi and Lee, 2000; Venter *et al.*, 2001; Roca *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2004), no hubo alternancia general en el predominio de los genotipos encontrados en este estudio, ya que en los años 1997 y 1999 predominó el GA2, luego en el período 2000-2002 el GA5, para luego en 2003 pasar al GA2 y en el 2004 nuevamente al GA5. La causa de esta variación en el patrón de presentación podría deberse a que, a pesar de la distribución global de las diferentes variantes virales, los virus evolucionen con patrones diferentes determinados por la cepa viral, el tipo de huéspedes, y las características locales (Choi and Lee, 2000). En este sentido, el estudio de la distribución anual y circulación de las diferentes cepas del subtipo A en la Argentina realizado a través del análisis de partición y representado en la Figura 16, permitió observar por un lado, que dentro de un mismo genotipo, secuencias en un clado específico pueden permanecer indetectables durante algunos años y reemerger luego en la población, revelando que a pesar de no haber alternancia de genotipos, sí la hay entre linajes dentro de los mismos. De esta manera aislamientos clasificados dentro de un genotipo se encontrarían ampliamente separados en el tiempo. Y por otro lado que existe una amplia coexistencia de diferentes linajes en varios puntos en el tiempo. Este patrón diferente en el predominio y coexistencia de ciertas variantes es compatible con un modelo en el cual uno de los dos genotipos o un linaje en particular domina la población viral hasta que se genera suficiente inmunidad en la población frente al mismo (probablemente porque numerosos individuos infectados por el mismo se hayan recuperado de la infección y hayan generado anticuerpos frente a éstos) de manera que en ese momento el otro genotipo o linaje

dentro de un genotipo pueda incrementar su frecuencia. Esta observación ha sido descrita exhaustivamente para el caso de los virus de Influenza B (Chen and Holmes, 2008).

La coexistencia de múltiples linajes puede ocupar diferentes regiones dentro de un espacio de aptitudes virales (del inglés *landscape of viral fitness*) que le permitirían a estos virus adaptarse rápidamente a cambios en la topología de este espacio mencionado dependiendo del estado inmunológico que presenten los huéspedes (Holmes, 2008).

Considerando la circulación a nivel global de los diferentes genotipos y linajes, el análisis de la Figura 17 muestra que el genotipo GA2 está distribuido más ampliamente que el GA5, entre las cepas argentinas y las obtenidas de *GenBank*. Mientras que en forma individual para las cepas argentinas, algunas observaciones particulares de la georeferenciación explican ciertos comportamientos observados en el análisis de partición realizado previamente. Por ejemplo en el mapa correspondiente a GA2, se observa que los virus pertenecientes al clado 1 (rojo) circularon en nuestro país los años 1997, 1999-2001, para volver a circular en el 2004, pero durante los años 2002 y 2003 estos virus fueron encontrados en países de Europa como Bélgica. Al igual que el clado 2 (azul) que en nuestro país no circuló durante los años 2000-2002, años en los cuales este tipo viral fue hallado en el resto de los continentes, para luego resurgir en los años 2003 y 2004 en la Argentina. Así como en el clado 3 (celeste), cepas que circularon en Asia y Europa durante 2000-2004, fueron detectadas en Argentina recién a partir de 2003. Dentro de este mismo genotipo el clado 4 (verde) estuvo presente en nuestro país y en Mozambique en el año 1999 para luego desaparecer de la circulación general ya que sólo se habían encontrado cepas de estas características previamente en Seúl en 1996; evidentemente este grupo viral habría desaparecido de la circulación mundial, tal vez por tener una menor adaptación (del inglés *fitness*) con respecto a los restantes tipos virales que circularon al mismo tiempo, probablemente porque el estado inmunológico de la población haya limitado su circulación. Luego hay clados como el 5 (rosa) y el 6 (naranja) que no se han observado en nuestro país durante el período analizado.

Para el caso del genotipo GA5, puede verse como el clado 2 (rosa) al circular casi exclusivamente en la Argentina persistió durante varios años en forma continua. Por otro lado el clado 5 (naranja), al igual que lo mencionado para el clado 6 del GA2, no se detectó entre las cepas argentinas, mientras que circuló en Europa y Oceanía entre el

2001 y el 2006, mostrando ser probablemente un linaje viral nuevo dentro de este genotipo. De todas maneras, es posible que si se analizaran cepas de nuestro país en los años posteriores al 2004, podrían detectarse ambos linajes virales. El clado 1 (azul), se encontró en nuestro país recién en 2002 y permaneció hasta 2004, mientras que había circulado en brotes anteriores en el resto de los continentes.

En este sentido, y teniendo en cuenta que los estudios de los virus con genoma de ARN que infectan humanos han revelado un número importante de generalidades epidemiológicas y en particular se han observado una variedad de patrones filogeográficos diferentes, se intentó encontrar un patrón que describiera las características filodinámicas del HRSV subtipo A detalladas previamente. Si bien es cierto que la circulación de ningún virus responde exclusivamente a uno en particular, se han definido cinco patrones generales, los cuales se detallan a continuación (Holmes, 2008):

- i) patrones sin estructura espacial clara en donde existe una compleja mezcla al azar entre los aislamientos muestreados en diferentes regiones geográficas, indicando un tráfico viral frecuente entre las distintas localidades;
- ii) patrones que presentan una transmisión en ondas en donde los virus se mueven de un lugar central como punto de partida, produciendo una relación relativamente simple entre las distancias geográficas y las distancias genéticas (ejemplo Sarampión);
- iii) patrones que responden a un modelo llamado “núcleo-satélites” en donde una o limitadas áreas geográficas actúan como origen de la población, exportando linajes virales a otras poblaciones receptoras donde los virus pueden sólo sobrevivir a corto plazo (quizás con bases fuertemente estacionales) y pueden generar ondas de transmisión;
- iv) patrones que presentan dinámicas tipo gravitatorias en donde los patrones de transmisión viral son dirigidos por los grandes centros poblacionales, los cuales actúan como atractores gravitatorios, tal vez siguiendo los patrones del flujo de la circulación y/o el trabajo humano; y
- v) patrones que presentan una fuerte división espacial en los cuales diferentes localidades geográficas están caracterizadas por la presencia de aislamientos filogenéticamente diferentes con poca evidencia de tráfico viral entre ellos.

Por lo tanto, la circulación de los linajes virales pertenecientes a los clados representados por el color naranja en la Figura 17 (clados 6 para GA2 y 5 para GA5) que se hallaron restringidos a la circulación fuera de la Argentina durante el período 2000-2006, y al clado 2 para el GA5 (rosa) sólo encontrado en la Argentina en forma continua, podría estar representada por el patrón cinco. Encontrándose microevolución en el tiempo de estas variantes limitadas a ciertas áreas geográficas, tal vez sujetas a deriva génica. Por otro lado, los linajes virales pertenecientes al resto de los distintos clados como el clado 1 para GA5 (azul) se comportarían según el patrón tres, debido a que se presentan como ondas de transmisión, siguiendo los ciclos estacionales.

El cálculo de la tasa de sustitución nucleotídica para el HRSV subtipo A, proporcionó un valor elevado del orden de 10^{-3} sustituciones nt/sitio/año, como ha sido observado para el caso de los virus con genoma ARN, sobre todo los que tienen simple cadena y tamaño pequeño (15,2 Kb para HRSV) y además poseen una polimerasa carente de actividad correctora (Duffy *et al.*, 2008). Las sustituciones han ido fijándose en el tiempo, llevando a los elevados valores de tasas de sustitución en general encontrados, incluso en estudios que abarcan cortos períodos de tiempo (este trabajo, Zlateva *et al.*, 2004; Matheson *et al.*, 2006). A pesar de que cuando se realizó el cálculo de la tasa de sustitución por separado para ambos genotipos no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los mismos, el valor obtenido para el genotipo GA2 fue levemente mayor que para el GA5, continuando con la tendencia observada en todos los análisis realizados. El grado de asociación temporal y espacial podría estar gobernado por la tasa de sustitución de los virus y su habilidad de persistir en la población. En una población viral que evoluciona a una baja tasa, uno esperaría que las cepas más antiguas persistan en la misma y las distancias genéticas entre los clados sean bajas, como ha sido observado para el caso del genotipo GA5, para el cual el análisis de partición mostró que los diferentes linajes permanecieron por más tiempo en la población argentina que los encontrados para el genotipo GA2. Además, como se mencionó anteriormente la distribución global de GA2 fue mayor que la de GA5 (Matheson *et al.*, 2006).

Ambos genotipos encontrados entre las cepas argentinas fueron analizados desde el punto de vista de su variabilidad molecular. A pesar de que los dos genotipos exhibieron elevados valores de diversidad, los resultados muestran que el genotipo GA5 es significativamente menos diverso que el GA2, tanto a nivel nucleotídico, como

aminoacídico. Una razón que permitiría explicar estos resultados y los previos, se desprende del análisis de los perfiles antigénicos para ambos genotipos por separado, debido a que, si bien la segunda región variable de la glucoproteína G mostró tener regiones antigénicas equivalentes para ambos, se encontraron diferencias en los índices antigénicos para la primera región variable. Estas diferencias encontradas podrían deberse a que sobre los mismos estarían actuando diferentes fuerzas de selección. Por lo tanto, se realizó el cálculo de la relación global dN/dS (0,655) y éste mostró cómo para estos virus existen más chances de fijarse las mutaciones no sinónimas que las sinónimas (selección positiva), pero al ser el valor <1 en forma global actuaría una fuerte selección purificadora. El análisis por sitio de dN/dS , indicó que a pesar de que en general hay varios sitios sujetos a selección negativa, algunos “sitios calientes” (del inglés *hot spots*) podrían estar presentes, los cuales acumularían mutaciones a mayor tasa debido a estar sujetos a selección positiva y/o tener menores restricciones selectivas, sobre todo en la segunda región variable (aa 256, 286 y 289). Si bien estas tres posiciones coinciden con aquellas descritas previamente, siendo probablemente sitios inmunodominantes, la mayoría de los trabajos publicados en los que se determinan sitios sujetos a selección positiva y negativa para la glucoproteína G de HRSV subtipo A, han informado un mayor número de sitios con selección positiva en relación a los encontrados en este estudio. Una explicación posible para esta diferencia hallada sería que en los mismos siempre utilizan un elevado número de secuencias para hacer los análisis, debido a que no sólo analizan las obtenidas en sus laboratorios (propias del lugar de estudio), sino también secuencias recuperadas de la base de datos *GenBank*. Ésto podría llevar a un sesgo en los resultados obtenidos, representando datos globales, más que locales. En cambio, las secuencias utilizadas en este trabajo de Tesis sólo se restringen a la población en estudio, y entonces representarían la selección que operó sobre las cepas argentinas en el período de análisis, probablemente sujeta a presentar epitopes neutralizantes que operan de diferente manera sobre los distintos virus circulantes y en una población con bagaje genético diferente (Botosso *et al.*, 2008). Al mismo tiempo, continuando con la línea de análisis, y tratando de explicar las diferencias en tasas de sustitución, circulación, diversidad y perfiles antigénicos encontradas entre los dos genotipos, se realizaron los cálculos por separado. Nuevamente se encontraron diferencias entre ambos a nivel global y por sitio de dN/dS , el GA2 mostró un valor global mayor que el GA5 (0,7219 vs 0,4869, respectivamente),

así como 23 sitios con evidencia de selección positiva mientras que para el GA5 ningún sitio mostró esa evidencia, pero sí presentó un gran número de sitios sujetos a selección negativa (N=29), datos muy diferentes de los que habían sido obtenidos en el análisis global. Si bien para explicar estos resultados sería necesario desarrollar un análisis antigénico más detallado tanto experimental como bioinformático, evaluando por ejemplo, si hay diferencias en epitopes neutralizantes para ambos genotipos en esas regiones, analizando mutantes de escape a diferentes anticuerpos genotipo específicos, se podría especular, que la población susceptible no respondería de la misma manera para cada genotipo, ejerciendo diferentes presiones, como se observó en una primera instancia en los perfiles antigénicos. De esta manera se concluye que sería conveniente cuando se realiza el análisis molecular, ya sea desde el punto de vista epidemiológico molecular, evolutivo, antigénico, etc., hacerlo sobre los genotipos en forma separada.

Por último, se ha postulado que tanto la N- como la O-glucosilación de la glucoproteína G ayudarían al HRSV a evadir la respuesta inmune. Se ha demostrado que los azúcares O-ligados son necesarios para la unión de la mayoría de los anticuerpos anti-glucoproteína G (Palomo *et al.*,1991). Analizando el patrón de O-glucosilación encontrado entre las cepas argentinas, se observó que se mantenía en general relativamente constante, pero que existían ciertos cambios en algunas posiciones. De esta manera la mayoría de los cambios aminoacídicos que se ubicaron en las dos regiones variables correspondieron a la generación o eliminación de estos sitios, implicando cierta presión selectiva sobre los mismos. Por otro lado, se ha publicado en numerosos trabajos que la segunda región variable del ectodominio de G, contiene cuatro sitios potenciales de N-glucosilación (Satake *et al.*,1985; Wertz *et al.*,1985; Jonson *et al.*,1987). Para el caso de las cepas argentinas, los sitios de N-glucosilación ubicados en la primer región variable se hallaron compartidos por ambos genotipos, mientras que en la segunda región variable mostró sitios compartidos y algunos genotipo específicos. Al mismo tiempo, un ejemplo interesante fue el sitio individual que se generó en la posición 258 en las secuencias del año 2003, pertenecientes al GA2: RSVARG3846/03; RSVARG4009/03; RSVARG4852/03; RSVARG5982/03; RSVARG6885/03 que coincidió con el de la secuencia obtenida de la cepa RSVARG1160/04 (ver Figura 19). Esta asociación entre cepas del año 2003 y una del 2004, también observada en los análisis filogenéticos, tiene relevancia en la sección 4.3 (Análisis Molecular Intramuestras). En definitiva, la variación del número y patrón de

distribución de los sitios potenciales de N y O-glucosilación podría influenciar la expresión de ciertos epitopes, tanto enmascarando como exponiendo al reconocimiento por anticuerpos específicos anti-HRSV (Melero *et al.*,1997; Palomo *et al.*,1991 and 2000).

5.2.3. Análisis Molecular Del HRSV Subtipo B

El análisis del subtipo B fue diferente del realizado con el subtipo A en la sección anterior, debido a que en vez de efectuar un estudio general de estas muestras, se decidió analizar un grupo de 47 cepas que habían presentado una característica particular durante la amplificación del gen de la glucoproteína G posterior a la subtipificación. La característica mencionada fue la de presentar inicialmente una leve alteración en la migración en los geles de agarosa de las bandas obtenidas durante la amplificación del gen en cuestión (fragmento total de 1.162 nt). Analizando la bibliografía disponible en relación a este hallazgo, sólo se encontró que un grupo de colegas de otro laboratorio de la Ciudad de Buenos Aires (CEMIC) habían descrito tres aislamientos correspondientes al año 1999 de HRSV subtipo B con características similares a las descritas (Trento *et al.*, 2003). Este grupo gentilmente cedió a nuestro laboratorio un cebador (OGCH₄₉₆₊) que junto a uno de los cebadores utilizados anteriormente (F164), permitió realizar una nueva RT-PCR. De esta manera se obtuvo como resultado un fragmento de menor tamaño (471 nt) que permitió determinar por simple observación de los geles de agarosa una migración marcadamente menor en esas cepas en relación al resto de las cepas del subtipo B analizadas, incluida la cepa patrón para este subtipo (CH18537/63) (Figura 21). La secuenciación posterior del gen confirmó las observaciones previas, encontrándose una duplicación de 60 nt que iniciaba en la posición nucleotídica 792 con respecto a la cepa patrón. El análisis del total de las muestras correspondientes al subtipo B (N=121), permitió determinar que las cepas con la duplicación (N=47) se mantuvieron circulando durante todo el período de estudio entre 1999 y 2004 (Tabla VIII). Estas observaciones llevaron a continuar con el análisis de este grupo, con el propósito de profundizar el estudio de un evento genético nuevo no descrito en el transcurso del tiempo hasta ese momento para el HRSV y que aportaría datos más interesantes a la evolución y circulación del HRSV.

A pesar de que previamente se han informado secuencias de la glucoproteína G de HRSV con duplicaciones o deleciones de uno a dos tripletes (este trabajo; García *et al.*, 1994; Melero *et al.*, 1997; Moura *et al.*, 2004; Blanc *et al.*, 2005; Zlateva *et al.*, 2005), las mismas han sido encontradas esporádicamente en ciertos brotes epidémicos sin continuidad en el tiempo. Precisamente, es sorprendente que virus con la duplicación

más grande descrita hasta el momento para HRSV (60 nucleótidos) hayan circulado por al menos seis años sucesivos e inclusive hayan reemplazado a otros genotipos predominantes. Por ejemplo, secuencias con la duplicación de 60 nt dan cuentas de entre el 50 a 60% de los virus del subtipo B en Buenos Aires en los últimos años correspondientes a este estudio (Tabla VIII). De manera similar, secuencias pertenecientes a este nuevo genotipo denominado BA, por haber sido identificados por primera vez en Buenos Aires, han predominado entre los virus del subtipo B en epidemias recientes en Bélgica (Zlateva *et al.*, 2005), Japón (Nagai *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2005), Nueva Zelanda (Matheson *et al.*, 2006), India (Parveen *et al.*, 2006) y Brasil entre otros (da Silva *et al.*, 2008).

Se ha postulado que la estructura secundaria relativamente estable del ARN viral formada transitoriamente durante el proceso de replicación viral podría tener alguna relación con la generación del segmento duplicado en el gen de la glucoproteína G del HRSV observado en las muestras BA (Trento *et al.*, 2003). A pesar de que probablemente este sea un evento genético raro que contribuye a una lista de cambios de secuencia inusuales observados en el gen de la glucoproteína G de numerosos aislamientos de HRSV (Melero *et al.*, 1997; Zlateva *et al.*, 2005) podría haber sucedido más de una vez durante la historia de la evolución del HRSV. El hecho de que las secuencias nucleotídicas lindantes al segmento duplicado fueran idénticas en todas las cepas que presentaron este cambio genético (Figura 26), podría simplemente reflejar las restricciones estructurales o funcionales para ese cambio en otras partes del gen de la glucoproteína G. No obstante, la observación de que todas las secuencias con el segmento duplicado de 60 nt se asociaron en el mismo genotipo (BA) cuando se realizó el análisis filogenético mostrado en la Figura 23 (genotipo que excluye a todas las otras secuencias del subtipo B sin la duplicación) provee una fuerte evidencia de que todas poseen un ancestro en común y de esta manera ofrece un extraordinario escenario para reevaluar las características epidemiológicas del HRSV. Del mismo modo, apoyando esta observación cuando se realizó el análisis filogenético excluyendo de a uno por vez ambos segmentos duplicados, nuevamente se observó que todas estas cepas continuaban asociándose en un genotipo separado de los demás, mostrando que la presencia de la duplicación no genera distorsiones en el análisis.

Debido a que el patrón de evolución de las secuencias del HRSV con el segmento duplicado no fue diferente del observado generalmente para los subtipos A y B (Cane, 2000), la Figura 23 provee un excepcional ejemplo de la historia natural del HRSV durante seis años consecutivos. A nivel local, la Figura 22 refleja la circulación de los virus BA durante los seis años consecutivos que abarca este trabajo de Tesis. Mientras que todos los virus aislados en el año 1999 se encontraron relacionados cercanamente a un ancestro común (clado BA-I) y contenían una copia exacta del segmento duplicado, los virus que circularon los brotes siguientes se agruparon en cuatro ramas separadas (BA-I, BA-II, BA-III, y BA-VI). Estos resultados ejemplifican el reemplazo de genotipos localmente predominantes en brotes sucesivos, como se observó para el subtipo A en este trabajo de Tesis, y ha sido extensamente publicado en la literatura tanto para cepas del subtipo A como para cepas del B sin el segmento duplicado inclusive (Cane *et al.*, 1994; Coggins *et al.*, 1998; Peret *et al.*, 1998 and 2000; Matheson *et al.*, 2006; Zlateva *et al.*, 2007; Botosso *et al.*, 2008; Mlinaric-Galinovic *et al.*, 2009). Es importante notar que los virus BA-I aparentemente dejaron de circular en Buenos Aires y en otros lugares del mundo luego del 2002 (Figura 22 y Figura 23, respectivamente). Se podría especular que la incorporación de sustituciones nucleotídicas en el gen de la glucoproteína G podría haber llevado al mejoramiento de la capacidad de adaptación viral (del inglés *viral fitness*) y así estas nuevas variantes pudieron haber reemplazado a las que originalmente se generaron. Por ejemplo, la transición T754C fue encontrada en todas las secuencias BA (todos sus clados) excepto en BA-I. Además, la segunda copia del segmento duplicado de estas cepas presentó cambios en sus secuencias que no se observaron en las pertenecientes al clado BA-I (Figura 26).

La Figura 23 y la Figura 25 reflejan la diseminación global de los virus BA desde que fueron originados posiblemente en 1997-1999. Como se mencionó previamente los virus del clado BA-I circularon extensamente en Buenos Aires desde mayo a agosto de 1999. En diciembre del mismo año, en Bélgica se encontró la primera secuencia BA-I con una copia exacta del segmento duplicado (Zlateva *et al.*, 2005). De esta manera queda claro que los virus BA-I cruzaron el Atlántico (en ambas direcciones) en un corto período de tiempo. En años posteriores estos virus, que acumularon cambios en el segmento duplicado, han circulado en lugares muy distantes entre sí, dando una evidencia directa de la rápida diseminación del HRSV en el mundo y la generación de variabilidad molecular. Obviamente, no se conocen las rutas seguidas por los virus BA

para alcanzar los diferentes lugares pero puede haber habido ciertos efectos de cuello de botella, con impacto en la evolución de HRSV, lo cual contribuyó a la diseminación exclusiva de ciertas ramas restringidas en determinadas áreas. Por ejemplo los virus BA-III fueron encontrados sólo en Buenos Aires hasta el año 2004, año en el que se publicaron secuencias de estas características en Brasil (da Silva *et al.*, 2008) y por primera vez en Bélgica. Por otro lado los virus BA-V sólo se encontraron en Niigata, Japón (Sato *et al.*, 2005). Asimismo los virus BA-IV, no se encontraron en Buenos Aires hasta el año 2004. Debido a que estos virus están cercanamente relacionados con aquellos que circularon en otros lugares como Quebec (Canadá) y Bélgica durante años previos, y comparten una longitud inusual en la proteína (317-319 aa), es probable que hayan sido importados desde esos lugares. Por consiguiente, dos tipos de virus con el segmento duplicado circularon en Buenos Aires durante el año 2004: i) aquellos del clado BA-III que probablemente evolucionaron a partir de virus que continuaron circulando localmente durante todo el período de análisis, debido a que no se han informado secuencias pertenecientes a este clado en lugares tan distantes del mundo excepto en países vecinos como Brasil y en años posteriores en Bélgica y ii) aquellos del clado BA-IV que probablemente fueron importados. Esta compleja situación puede confundir las conclusiones alcanzadas en otros análisis filogenéticos cuando el origen del ancestro común es incierto, como ha sido resaltado por Cane en su trabajo de revisión sobre la epidemiología molecular del HRSV (Cane, 2001).

Asimismo, en relación a la circulación de estos virus es sorprendente señalar que durante el invierno del año 2000 en el hemisferio sur y el invierno que le sucedió en el hemisferio norte (años 2000-2001), los virus BA no fueron encontrados en general en el mundo a excepción de Japón (Sato *et al.*, 2005). Es probable que los virus BA-I (a pesar de haber sido probablemente los que sufrieron inicialmente la duplicación), no tuvieran una capacidad de adaptación que les permitiera permanecer circulando en la población mundial por mucho tiempo, y ese cuello de botella generado, haya hecho por un lado que en Japón se hayan seleccionado nuevas variantes como los virus BA-V que sólo fueron encontrados allí durante el invierno de 2000 a 2001 y que en el resto del mundo se hayan generado otras variantes como BA-II, BA-III y BA-IV más adaptadas tal vez la inmunidad previa de la población o a alguna restricción de tipo estructural, que le haya permitido inclusive posteriormente superar a los otros genotipos circulantes correspondientes al subtipo B, como fue señalado previamente.

Por último en relación a la circulación de estos virus y como fuera citado en la discusión de la sección anterior, se han descrito cinco patrones filogeográficos que intentan interpretar las características filodinámicas de los virus con genoma ARN que infectan humanos (Holmes, 2008). Para el caso de los virus del genotipo BA, se podría hacer un análisis a distintas escalas, ya que si se piensa que estos virus podrían haber surgido de un único evento genético, el genotipo BA podría ser representado por un patrón que responde a un modelo de circulación de tipo “núcleo-satélites” (patrón tres descrito por Holmes, ver sección anterior), en donde probablemente Argentina o algún país cercano no estudiado haya sido el generador de este evento genético inusual para luego exportarlo a distintas regiones donde posteriormente fue descrito. Pero si se analiza a un nivel subgenotípico, dentro de BA, podemos encontrar cierta representación de varios de los patrones filodinámicos enumerados, ya que por un lado encontramos ciertos clados confinados a determinadas zonas geográficas (ejemplo Clado BA-III) y otros que surgieron en un lugar y rápidamente se encontraron en otras partes del mundo (ejemplo Clado BA-I).

En relación al estudio de las secuencias del genotipo BA a nivel aminoacídico, las proteínas inferidas a partir de las secuencias de nucleótidos obtenidas, presentaron cinco diferentes longitudes de aminoácidos (310, 312, 315, 316 y 319 aa) (Figura 26). Los mecanismos responsables de esta gran variabilidad incluyeron sustituciones de aminoácidos, inserciones, deleciones, y el uso de codones de terminación prematuros, constituyendo la duplicación el mecanismo más drástico que dio origen al genotipo BA. Los cambios en el uso de codones de terminación han sido asociados con importantes variaciones antigénicas en ciertos mutantes de escape seleccionados con anticuerpos monoclonales obtenidos con cepas de HRSV subtipo A (Rueda *et al.*, 1991 and 1995; Martínez *et al.*, 1997). De esta manera, las mutaciones que llevaron al uso de codones de terminación prematuros podrían haberle conferido una ventaja a estos virus para persistir en la comunidad a expensas de evadir la respuesta inmune preexistente. El hecho de que tanto la primera como la segunda copia del segmento duplicado presentaron mayores variaciones nucleotídicas y aminoacídicas que las restantes regiones de la glucoproteína G (Figura 27 a) y b)), sugiere que algún tipo de presión de selección podría estar operando sobre esta región. De hecho, se ha publicado en numerosos trabajos que cierta presión de selección inmune operaría en el ectodominio de la glucoproteína G durante la evolución del HRSV (Woelk and Holmes, 2001;

Zlateva *et al.*, 2004; Botosso *et al.*, 2008). El análisis de los valores dN/dS por sitio calculados permitió encontrar que cinco posiciones ubicadas en la región duplicada o cercana a ella, estarían sujetas a selección positiva (aa 236, 245, 248, 250 y 268, Tabla IX). Sin embargo, en un trabajo publicado recientemente por Bottoso y col, se encontró un número superior de sitios sujetos a selección positiva que el obtenido en este análisis. Es probable que el bajo número de sitios detectado entre las cepas argentinas en relación a este trabajo publicado se deba al menor número de secuencias utilizadas para realizar el análisis (N=47), en comparación al mismo en donde utilizaron 673 secuencias del subtipo B entre las obtenidas por sus investigadores y las recuperadas de *GenBank* (Botosso *et al.*, 2008).

Al mismo tiempo, el análisis de la variabilidad de la glucoproteína G a nivel nucleotídico y aminoacídico permitió corroborar lo que había sido observado desde el punto de vista filogenético en relación a que los virus del genotipo BA tendrían un ancestro común, ya que ciertas sustituciones como la mencionada T229I fue hallada en todas las secuencias BA, mientras que hasta la fecha no había sido descrita dentro de las secuencias pertenecientes a otros genotipos dentro del subtipo B.

La alta tasa de sustitución observada para el HRSV, como para los virus con ARN en general (Domingo and Holland, 1994), probablemente haya contribuido a la variación genética observada entre las secuencias del genotipo BA descrito en este trabajo de Tesis. No obstante, la rápida acumulación de cambios genéticos con el tiempo en la glucoproteína G de estos virus es indicativa de que ciertas fuerzas de selección podrían estar favoreciendo la generación de sustituciones nucleotídicas. La tasa de evolución calculada para las secuencias BA por los diferentes métodos (2,5 a $3,11 \times 10^{-3}$ sustituciones nt/sitio/año) es mayor a la reportada para otras secuencias de HRSV de ambos subtipos: $1,83 \times 10^{-3}$ sustituciones nt/sitio/año para el subtipo A, y $1,95 \times 10^{-3}$ sustituciones nt/sitio/año para el subtipo B (Jenkins *et al.*, 2002; Zlateva *et al.*, 2004 and 2005). Ésto podría haber contribuido a la acelerada acumulación de mutaciones en el segmento duplicado comparado con los resultados obtenidos para otros segmentos de la glucoproteína G como fue mencionado previamente.

La observación de que a partir de los cálculos realizados por distintos métodos filogenéticos se determinó que los virus del genotipo BA muy probablemente se hayan generado entre los años 1997 y 1999 (fechas calculadas para el MRCA), como así

también que no hayan sido descritos en otras partes del mundo previo a esos tiempos, sugiere que estos virus realmente fueron nuevos para la población humana. La ventaja selectiva de los mismos sobre los otros genotipos, es desconocida, pero, como fue explicado previamente, la condición inmunológica virgen (del francés *naïve*) de la población humana con respecto a los mismos podría haber contribuido a su rápida diseminación mundial.

Es importante notar que a pesar de que en este trabajo se han propuesto distintas maneras de demostrar el origen común los virus del genotipo BA, no se puede descartar que los distintos clados descritos en diferentes partes del mundo (BA-I a BA-VI) hubieran sido generados en eventos genéticos diferentes y luego evolucionado por convergencia a pertenecer al mismo genotipo.

Estudios prospectivos permitirán determinar si estos virus alcanzarán su extinción en años futuros como ha sido observado para numerosos genotipos como por ejemplo el GA1 para el HRSV subtipo A. Al respecto, los programas de vigilancia epidemiológica a nivel molecular como lo ha constituido en parte este trabajo de Tesis, serán de principal importancia para determinar el destino del HRSV con el segmento duplicado en su glucoproteína G. El conocimiento obtenido de este tipo de estudios tendrá impacto no sólo en la comprensión de la evolución de este virus sino también en otras áreas como el desarrollo de vacunas.

5.3. Análisis Molecular Intramuestras. Rol De Las Cuasiespecies En La Evolución Del HRSV

La mayoría de los estudios epidemiológicos realizados a partir del análisis de secuencias nucleotídicas para los virus con genoma de ARN, han utilizado secuencias consenso de poblaciones de estos virus; a partir de cada paciente se obtiene una secuencia única que representa los nucleótidos más comunes en cada posición en esa muestra viral particular. A pesar de que el uso de secuencias consenso es un camino válido (y por supuesto más económico) y útil para responder muchas preguntas sobre la epidemiología molecular de estos virus, como por ejemplo cuál es la circulación local y global de diferentes cepas (análisis realizado en las secciones anteriores para el caso de los subtipos A y B de HRSV), brinda limitada información acerca de muchos de los complicados patrones de evolución de los mismos. En particular, hay evidencia creciente de que el uso de las secuencias consenso enmascararían la diversidad genotípica que reside dentro de un huésped individual. En particular, la importancia de la variación intrahuésped ha sido extensamente descrita para las infecciones virales crónicas (como las producidas por HCV y HIV), en las cuales el clonado de moléculas de ARN individuales y el análisis de las cuasiespecies es algo de rutina, pero la relevancia de tales análisis para las infecciones agudas sólo recientemente se ha vuelto evidente (Holmes, 2009). Este tipo de estudios han revelado la existencia de subpoblaciones virales minoritarias presentes en un huésped que no habían sido detectadas por análisis de secuencias consenso (Aaskov *et al.*, 2006). Asimismo, tomando en cuenta las altas tasas de mutación que presentan los virus con genoma ARN (del orden 10^{-3} sustituciones nt/sitio), así como la gran población de virus que pueden infectar a un individuo, tal diversidad genética y fenotípica es esperable. En especial en el caso del HRSV, el mecanismo de evolución durante el curso de una infección natural y el modelo de transmisión y generación de variabilidad no ha sido completamente explicado. Además poco se conoce acerca de la evolución del genoma del HRSV en individuos con infección prolongada. Por otro lado, a pesar de que las cuasiespecies virales han sido recientemente descriptas para el BRSV (Deplanche *et al.*, 2007), no se han descrito tales distribuciones para el HRSV hasta el momento.

Existen principalmente dos métodos para analizar el espectro de mutantes que infectan un individuo para el caso de un virus con ARN (cuasiespecies virales). Uno es el de aislar partículas virales individuales, a partir de placas en cultivos celulares obtenidas de

una infección seguida a una dilución límite. El otro método implica la extracción total del ARN de la muestra biológica, someterlo a una RT-PCR, seguido de clonado molecular y secuenciado de clones individuales. El primer método podría llevar a obtener información con cierto sesgo al analizar sólo los genomas que sean más infecciosos en el sistema celular que se haya elegido para su análisis (como por ejemplo analizar aquellas partículas productoras de efecto citopático temprano, o aquellas formadoras de placas de mayor tamaño). En el segundo método mencionado, el sesgo podría surgir como consecuencia de la baja fidelidad de las enzimas utilizadas para realizar la RT-PCR, las cuales podrían resultar en una sobreestimación de la heterogeneidad nucleotídica encontrada. Esto último puede ser resuelto utilizando enzimas polimerasas con alta fidelidad, correctas condiciones de amplificación, y diseño de controles experimentales que permitan determinar el error basal del propio sistema utilizado (Arias *et al.*, 2001). Este último método fue el seleccionado para analizar las cuasispecies en HRSV en este trabajo de Tesis, tomando en cuenta el uso de una enzima con actividad correctora con las condiciones de amplificación ideales y la determinación del error experimental propio.

Por otro lado, para el análisis de tales cuasispecies virales, normalmente se utilizan distintos parámetros para caracterizar el espectro de mutantes de las mismas, entre los que se encuentran la frecuencia de mutación, la entropía de Shannon, las distancias genéticas y las de Hamming (Domingo *et al.*, 2006).

En esta sección se analizó la presencia de tales distribuciones en muestras clínicas provenientes de pacientes con IRAB producida por HRSV. Entre las mismas hay muestras que habían sido tomadas dentro de los primeros días de comenzados los síntomas clínicos, mientras que un par de muestras correspondieron a un paciente que presentó dos muestras sucesivas positivas por IFI para HRSV separadas por 18 días (con historia previa de bronquiolitis sin diagnóstico etiológico), y otro par de muestras provenientes de un paciente con una infección prolongada de al menos 41 días de duración. El clonado y secuenciación de los fragmentos amplificados y secuenciados previamente en forma directa permitió observar a través del cálculo de las distancias genéticas medias para cada grupo de clones analizados, valores entre 0.85×10^{-3} y $29,7 \times 10^{-3}$ sustituciones nucleotídicas por sitio. Estas distancias son similares a aquellas observadas para virus con genoma ARN altamente variables, tales como el virus de la

estomatitis vesicular y los virus polio (Duffy *et al.*,2008). La comparación estadística entre el error introducido por el método de amplificación utilizado y los valores de distancias genéticas obtenidas, permitió determinar que, excepto para el caso de las muestras ARG6751/01, ARG22516/97 y ARG577/00, las diferencias fueron significativas. Como consecuencia, los cambios encontrados entre los distintos clones serían verdaderas sustituciones más que artefactos del método.

Del análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las diferentes variantes encontradas en cada muestra clínica se puede concluir que dependiendo del tiempo de evolución entre el comienzo de los síntomas de la IRAB y la toma de la muestra clínica, se observa mayor o menor variabilidad en cada conjunto de variantes analizadas. Debido a que un corto período de evolución de la IRAB transcurrido hasta la toma de muestra, como se observó en los casos ARG4018/01, ARG4389/01, ARG22516/97 y ARG577/00, se evidenció con un menor número de sitios polimórficos. Mientras que la variabilidad para las muestras ARG1160/04 y ARG2525/04 (muestras entre las que transcurrió un período de 41 días) determinada como distancia genética media y número de sitios polimórficos, aumentó a medida que transcurrió el tiempo, así como el tipo de sustituciones encontradas ($N>S$). Un tiempo de evolución corto, como generalmente transcurre en la mayoría de los episodios de las IRAB, podría no permitir que se produzcan un gran número de rondas de replicación del genoma y como resultado, se generarían pocas sustituciones. Por otro lado, la permanencia de la infección por el virus durante un tiempo superior al normal del que transcurre en una infección aguda, llevaría a la acumulación de cambios N (no sinónimos) en la proteína, similares a los observados en estudios longitudinales sobre la variabilidad del virus pero entre pacientes durante uno o más brotes epidémicos (análisis realizados en las secciones anteriores). De todas maneras, del estudio de las características de las sustituciones encontradas, hay ciertas claves que apoyan los hallazgos sobre la variabilidad intrapaciente. Primero, las sustituciones en el gen de la glucoproteína G halladas entre los distintos clones analizados se encontraron principalmente en las dos regiones variables de la misma, manteniéndose la región central sin variaciones, tal vez como consecuencia de las restricciones de tipo estructurales, por ser este el sitio de probable unión al receptor celular. Segundo, se encontró una alta frecuencia de transiciones A→G entre los clones analizados, este tipo de sustituciones han sido analizadas previamente por Martínez y Melero en 2002. Ellos describieron varios virus mutantes de escape obtenidos con

anticuerpos monoclonales específicos contra la glucoproteína G, los cuales presentaban múltiples transiciones A→G en el gen de esta proteína. Los autores propusieron que las mismas podían ser generadas por una adenosina-deaminasa celular que actúa sobre el ARN cuando éste presenta ciertas estructuras secundarias estables, como las que se han predicho para pequeñas regiones de 100 a 200 residuos del ARN formadas transitoriamente durante los ciclos de replicación/trascricpción del genoma del HRSV (Martínez and Melero, 2002).

Tercero, el análisis a nivel aminoacídico en particular de las muestras: ARG577/00 y ARG22516/97, aquellas que presentaron la menor variabilidad, mostró que las tres sustituciones no sinónimas halladas entre los clones pertenecientes a ARG577/00 se encontraron en la primera región variable de la proteína G (posiciones 118, 132 y 134). Los aminoácidos 132 y 134 se encuentran en una región comprendida entre las posiciones aminoacídicas 124 a 203, la cual se ha demostrado que confiere completa resistencia a la replicación del HRSV en ratones (Simard *et al.*, 1995). La sustitución K132R, fue descrita en un paciente que sufrió una infección repetida en el mismo brote epidémico (Sullender *et al.*, 1998). Además, se ha informado que esta posición presenta altas probabilidades de sufrir selección positiva (Zlateva *et al.*, 2004). De todas maneras cuando se analizó la presencia de selección positiva para las cepas argentinas correspondientes al subtipo A, esta posición no fue probable. La única sustitución no sinónima hallada entre el grupo de clones analizados para la muestra ARG22516/97, se encontró en la segunda región variable (posición 234). El cambio P234L alteró un motivo K-P-X encontrado en forma repetitiva a lo largo de la proteína G, este tipo de motivos estarían asociados a la gran O-glucosilación que presenta esta proteína, y al enmascaramiento de sitios potenciales de reconocimiento de anticuerpos monoclonales específicos de cepa (Cane, 2001).

Para el caso de las muestras ARG4018/01 y ARG4389/01, las mismas habían sido tomadas de dos pacientes distintos internados en la misma Unidad de Terapia Intensiva, pero distanciadas por un mes. Si bien ambas presentaron un bajo número de sustituciones no sinónimas, nuevamente las mismas se encontraron en las dos regiones variables de la glucoproteína G. No obstante, en conjunto el espectro de sus secuencias se mantuvo relativamente invariable cuando las mismas se compararon entre sí. Es notable esta baja variabilidad, si se tiene en cuenta que el análisis de distintas cepas

durante un brote ha mostrado una alta diversidad. De todas maneras este virus probablemente haya circulado en la sala de cuidados intensivos, asociado a formas severas de infección respiratoria. Cabe destacar que un clon de la muestra ARG4018/01 presentó un codón prematuro de terminación en la posición 278 (Q278STOP), resultando en una proteína de 277 aminoácidos de longitud. A pesar de que sólo se encontró un clon con esas características, esta sustitución se halló dentro de una región, entre los aminoácidos 258-298, en la que se habían seleccionado varios virus mutantes de escape con anticuerpos monoclonales también con codones de terminación prematuros, los cuales resultaron en cepas viables (Rueda *et al.*,1991; Melero *et al.*,1997). A pesar de que entre las cepas de HRSV subtipo A analizadas ese mismo año (2001), no se encontró ninguna con la misma secuencia de la glucoproteína G, sería importante analizar el impacto en la circulación general de un virus con las características de la variante mencionada. Debido a que en un trabajo en el que se estudió la variabilidad de la proteína G en tres muestras sucesivas tomadas de un paciente que sufría inmunodeficiencia combinada severa y que presentó una infección por HRSV que se prolongó durante dos meses, también fue descrita una cepa con las mismas características. Es importante mencionar que el paciente del que se aisló la misma había sido tratado durante todo el período invernal en forma mensual con inmunoglobulina intravenosa, más una única dosis del anticuerpo monoclonal humanizado Palivizumab (MedImmune), ambas terapias inmunopreventivas utilizadas en pacientes con riesgo a sufrir infecciones graves por HRSV. Además los autores del trabajo analizaron durante el mismo período y posteriores las cepas que circularon en esa región y tampoco encontraron alguna con características semejantes. Posiblemente el tratamiento continuo con la inmunoglobulina haya ejercido alguna presión de selección sobre la cepa viral que se aisló y haya generado la sustitución descrita (Lazar *et al.*,2006). Al mismo tiempo, se ha postulado que a pesar de que muchos virus presentan altas tasas de sustitución intrahuésped, mostrando que esa parte del ciclo biológico del virus podría estar dominada por la selección positiva (permitiéndole al virus evadir la respuesta inmune generada), muchas de las sustituciones que ocurren dentro de un huésped son purgadas en la transmisión interhuéspedes, debido a que sobre ellos actuaría una fuerte selección purificadora. Lo que haría que ciertas variantes generadas en menor proporción no lleguen a transmitirse entre la población y como consecuencia se pierdan (Duffy *et al.*, 2008).

Excepto para el par de muestras ARG1160/04 y ARG2525/04, las sustituciones encontradas en todas las variantes analizadas fueron únicas, sugiriendo que a pesar de que este espectro de mutantes se generaría a altas tasas, cada variante específica se mantiene a baja frecuencia, reforzando lo mencionado en párrafos anteriores con relación al tiempo de evolución de la infección viral en los distintos pacientes. Asimismo en relación a este análisis, y tomando en cuenta la baja variabilidad encontrada entre las muestras mencionadas, más la del par ARG6560/01 y ARG6751/01 se puede concluir que a pesar de que el virus tiene la posibilidad de presentar elevada diversidad, y cocircular en la población con distintos genotipos, linajes, etc; lo haría dependiendo del bagaje inmunológico de los pacientes susceptibles a los que se enfrenta. El virus tendría la capacidad de explorar diferentes posibilidades moleculares, desde variar a altas tasas a mantenerse relativamente invariante en situaciones donde los individuos susceptibles no lo requieren.

Con respecto al análisis aminoacídico del par de muestras ARG1160/04 y ARG2525/04, el mismo presentó una relación ω (dN/dS) mayor a uno, sugiriendo que cierta selección positiva podría estar actuando sobre el conjunto de variantes de las mismas. Pero, lo más interesante del análisis del conjunto de clones es que para el caso de la segunda muestra clínica, la misma presentó variantes con una longitud de proteína de 297 aa, mientras que otras tenían una longitud de 298 aa. Ésto llevó a determinar luego en el análisis filogenético que el paciente estaba coinfectado con más de un genotipo viral, tanto el GA2 como el GA5, esta observación es posible debido a que ambos genotipos habían sido descritos como cocirculantes durante el año en el que fueron obtenidas las muestras clínicas (ver discusión en próximos párrafos).

El árbol filogenético que permitió realizar el análisis de la dinámica de las distintas variantes halladas para cada muestra clínica, mostró que para cada caso en particular, dependiendo de las características clínicas de los pacientes de quienes habían sido tomadas las muestras, las relaciones filogenéticas fueron diferentes. En general para los casos agudos, las variantes se mantuvieron asociadas entre sí con la secuencia directa de las mismas. Éste fue el caso de las muestras ARG577/00 y ARG22516/97.

Para el caso del par de muestras ARG6560/01 y ARG6751/01, no se diferenciaron las variantes de la primera muestra con las de la segunda tomada 18 días después, tiempo en el que el paciente tuvo persistencia de los síntomas respiratorios. Este paciente tenía

diagnóstico de HIV, e historias previas de bronquiolitis entre los tres y cinco meses de edad, sin rescate de muestras clínicas para el diagnóstico del agente etiológico de la misma. Independientemente del estado de los recuentos de células T CD4+, es muy probable que este paciente haya presentado persistencia de la infección por el virus durante todo el período mencionado. De todas maneras la posibilidad de reinfección no se puede descartar, ni evaluar. Este caso clínico se asemeja al publicado por Arbiza y col en 2006, en el cual un paciente con HIV persistió infectado por HRSV durante 112 días, y el análisis por secuencia directa de la glucoproteína G, no mostró diferencias entre las tres muestras tomadas durante el período mencionado (Arbiza *et al.*, 2006). A pesar de que el tiempo de excreción para este último caso fue mucho más prolongado que el observado en este trabajo de Tesis, el análisis de las secuencias mostró poca variabilidad. Lamentablemente los autores no analizaron las poblaciones virales presentes en cada muestra proveniente de este paciente como para poder comparar con nuestro estudio, pero es probable que la baja variabilidad encontrada por ellos, sumada a la observada entre las variantes de las muestras ARG6560/01 y ARG6751/01, se deban a que en pacientes con estas características, donde no habría presión de selección inmune, actúe una selección purificadora sobre las mismas y de esta manera no se produzca variación en sitios normalmente antigénicos. De todas maneras, si no se toma en cuenta que este paciente tuvo episodios previos de bronquiolitis, debido a que no se tiene la certeza de la etiología viral que las produjo, los 18 días que transcurrieron entre la primera y segunda muestra clínica se encuentran dentro de los períodos de excreción normales del HRSV (Henrickson and Hall, 2007).

No son numerosos los trabajos que han hablado de persistencia en pacientes por el HRSV. Asimismo, los trabajos que se han realizado sobre muestras clínicas de pacientes con alguna inmunodeficiencia, no han demostrado ni a través de las secuencias directas ni del clonado, gran variabilidad de la proteína G. Tal vez por esa razón es que no se ha continuado este tipo de estudios. Igualmente, al producir el HRSV infecciones agudas, es imposible poder predecir con anterioridad un caso clínico con persistencia de la infección viral como para poder programar la toma de muestras clínicas. Éste es el caso del paciente del que se rescataron sólo dos de las muestras clínicas anteriormente analizadas (ARG6560/01 y ARG6751/01), mientras que hubo tres episodios previos documentados de IRAB, de las que no se obtuvo muestra clínica. De todas maneras varios trabajos hablan de que el HRSV puede persistir en distintos

tipos celulares, replicando a baja tasa (Tripp, 2004; Mejías *et al.*, 2008), siendo posible entonces que el mismo se mantenga así entre los sucesivos períodos invernales hasta la aparición de nuevos huéspedes susceptibles, y/o que en ellos se generen nuevas variantes virales que persistirán en el tiempo entre temporadas.

Por último y en relación con el análisis de la dinámica de las variantes encontradas en cada muestra, especial atención tuvieron el par de muestras ARG1160/04 y ARG2525/04. En forma global, y coincidente con los valores de distancias genéticas discutidos previamente, la primera muestra (ARG1160/04) presentó menor variabilidad que la segunda, observado en el árbol como asociación de las distintas variantes en un clado independiente junto con la secuencia directa de las mismas dentro del genotipo GA2 y muy buen soporte estadístico. Sin embargo es importante resaltar, que tanto las variantes mencionadas como la secuencia directa se asociaron a cepas que circularon en nuestro país durante todo el año 2003, no asociándose a ninguna otra cepa que haya circulado durante el año 2004, a pesar de que esta muestra clínica fue tomada en junio de 2004 (recordar el análisis de partición realizado con las secuencias directas en la sección de HRSV subtipo A). Éste podría ser el caso de un virus que circuló un año (2003) y permaneció infectando a un individuo durante el período entre brotes, tal vez replicando a baja tasa hasta el siguiente año (2004) produciéndole un cuadro subclínico que no requirió diagnóstico durante ese lapso de tiempo. Por otro lado, diferente fue lo observado para el conjunto de clones de la segunda muestra clínica (ARG2525/04). Debido a que la secuenciación directa de la misma permitió determinar que pertenecía al genotipo GA5, pero cuando se analizaron las poblaciones virales intramuestra, se encontró, como fue mencionado previamente, que las distintas variantes se hallaron distribuidas entre los dos genotipos descritos. En el primer proceso de clonado, sólo una variante se asoció a su secuencia directa y al genotipo GA5, mientras que sorprendentemente 8/10 variantes se hallaron asociadas en un clado en el genotipo GA2. Por esta causa y para confirmar los hallazgos, cuando se realizó nuevamente la extracción del ARN, amplificación y clonado de esta muestra, esta vez 8/12 clones analizados se asociaron al genotipo GA5, confirmando lo antes encontrado, mientras que el resto de los clones se asocio al genotipo GA2. De esta manera, el análisis de la secuencia consenso no arrojó el resultado de la población viral que infectaba a ese paciente (determinando que el mismo había sido infectado primeramente con una cepa del genotipo GA2, mientras que en su segundo episodio, se había reinfectado con una

cepa del genotipo GA5), y al menos en este caso, este tipo de análisis habría llevado a perder información acerca de poblaciones minoritarias que residen dentro de un huésped individual, y que podrían tener alguna relevancia en la epidemiología de este virus. Precisamente, la consecuencia más importante de este análisis se obtuvo con respecto a ciertas variantes encontradas entre las dos muestras. En el análisis filogenético dos clones de la muestra ARG1160/04 y uno de la muestra ARG2525/04 se asociaron entre sí en un clado individual (variantes RSVARG1160/04C4, RSVARG1160/04C7 y RSVARG2525/04C7). Ese clado no se asoció con ningún otro genotipo previamente descrito entre las cepas argentinas, ni entre las circulantes a nivel global. El análisis de las tres variantes por el programa RDP3 que analiza la probabilidad de recombinación por diferentes métodos, permitió determinar que eran posibles variantes recombinantes, así como también permitió determinar las probables secuencias parentales y los puntos de corte para los eventos de recombinación. El análisis filogenético en función de estos últimos para cada una de las variantes mostró incongruencias filogenéticas, en cuanto a que diferentes porciones de las secuencias, a ambos lados de los puntos de corte obtenidos, se movían a través de ambos genotipos en los distintos árboles mostrados en la Figura 34 y la Figura 35. Es importante destacar que sólo se obtuvieron estos movimientos en el árbol para el caso de las variantes en cuestión, no obteniéndose con ninguna otra secuencia presentada en este trabajo de Tesis. Este tipo de incongruencias filogenéticas se han descrito en numerosos trabajos que analizan la recombinación homóloga de virus con genoma ARN (Aaskov *et al.*, 2007). En el marco de la teoría de las cuasiespecies, la recombinación es otro mecanismo que puede generar diversidad genética (Arias *et al.*, 2001). La misma se produce por intercambio de ácidos nucleicos entre cepas o variantes genotípicamente diferentes durante la coinfección de ambas en la misma célula huésped. Para los virus con genoma ARN la mayoría de estos eventos, se producen durante la replicación del mismo, cuando la polimerasa cambia de un templado (el donante) a otro (el aceptor). A pesar de la creciente evidencia de recombinación en virus ARN, es aparente que las tasas de recombinación entre éstos varían ampliamente. La recombinación es frecuente en retrovirus (Jung *et al.*, 2002), y en virus con genoma segmentado como influenza y rotavirus (Mitnaul *et al.*, 2000). En éstos el intercambio de material genético ocurre más comúnmente por reasociación, la cual involucra intercambio de segmentos genéticos enteros (McCullers *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 2001). Otro tipo de recombinación es la formación de moléculas

quiméricas, las cuales contienen segmentos derivados de más de una molécula parental. También lo es para los virus con genoma ARN de polaridad positiva como los togavirus (Hahn *et al.*, 1988), flavivirus (Aaskov *et al.*, 2007), coronavirus (Woo *et al.*, 2009), etc. En contraste hay pocos trabajos que demuestren la recombinación en virus con genoma ARN de polaridad negativa, lo que ha llevado a varios autores a sugerir que estos virus están caracterizados por bajas tasas de recombinación. No obstante, se ha documentado evidencia de recombinación en algunos arenavirus, virus ambisense, hantavirus e influenza A virus, aunque para este último el caso de recombinación es controvertido (Boni *et al.*, 2008). Para el caso del HRSV, en el año 2003 se publicó un trabajo en el cual Spann y col lograron producir un evento de recombinación *in vitro*, mostrando que un evento de estas características podría ser posible para el HRSV *in vivo* si se encontraran las condiciones ecológicas (Spann *et al.*, 2003). Existen numerosos argumentos a favor de la baja tasa de recombinación para el HRSV. Sin embargo, el más adecuado tendría que ver con cuestiones puramente mecánicas y/o ecológicas del virus. La tasa de recombinación no es un rasgo determinado en sí mismo sino el resultado natural de la estructura de un genoma particular o de la ecología viral. Por ejemplo: hay varios pasos en el proceso de replicación que influyen la tasa de recombinación. El más evidente y relacionado con la ecología del virus consistiría en que múltiples cepas virales deben infectar la misma célula huésped. Para que esto ocurra, distintos genotipos y/o linajes virales deben cocircular ecológicamente y geográficamente. Como así también, el tiempo de infección debe permitir que ocurran estos eventos. Por otro lado, si se genera una potente respuesta inmune, la misma podría limitar la superinfección o podrían existir factores específicos del huésped que bloqueen la entrada de múltiples virus a una misma célula (Worobey and Holmes, 1999). Para el caso de HRSV si bien la cocirculación se ha demostrado, la tasa de superinfección seguramente es baja debido a que estos virus producen infecciones agudas con períodos relativamente cortos de recuperación. En el caso que se describe en este trabajo, las características del paciente con una infección prolongada, así como la demostración previa que durante el año 2004 cocircularon ambos genotipos GA2 y GA5, sumado a la posibilidad de que este paciente haya estado infectado en su primera muestra clínica con una cepa que circuló el año previo, llevan a concluir que las condiciones bioecológicas para el virus en ese paciente hicieron propicio el marco para que pudiera haber existido un evento de recombinación.

La posibilidad de que este hallazgo sea un error de laboratorio como consecuencia de un cambio de templado de la polimerasa durante la amplificación en una muestra mixta o contaminada no está excluida. Sin embargo, el hecho de haber encontrado tres clones con características semejantes (dos en la primera muestra, y una en la segunda), hacen pensar que serían verdaderos recombinantes. Sumado a que se seleccionaron condiciones apropiadas para la amplificación de los ácidos nucleicos (número de ciclos inferior a 35), debido a se ha informado que estos errores suceden cuando se aumenta en forma excesiva el número de ciclos de la amplificación (Kanagawa, 2003). Por otro lado, se ha sugerido, que los saltos de la polimerasa entre dos templados diferentes ocurren con más frecuencia cerca de la secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación (Kanagawa, 2003). En este caso los puntos de corte se hallaron alejados de los mismos. Por otro lado, es importante remarcar que tanto la secuencia probable parental, como la recombinante se encontraron en la misma muestra.

Además se deben tomar en cuenta las características de este paciente, ya que como consecuencia de su síndrome de base (Síndrome de Down) es un paciente que había concurrido numerosas veces al hospital por diferentes motivos, algunos no asociados a cuadros respiratorios, pero convirtiéndolo en un individuo polihospitalizado, sujeto a estar en contacto directo con distintos agentes infecciosos, no sólo en su ambiente cotidiano, sino también en el Hospital, lugar en el que durante el período invernal presenta una fuente de infecciones, sobre todo con virus respiratorios.

Ésta es la primera vez que se describen las cuasiespecies para el HRSV, y como consecuencia se ha logrado describir un probable evento de recombinación homóloga intergenotípica nunca antes descrito para este virus. Si bien se han descrito las reinfecciones con diferentes genotipos virales cocirculantes en la población durante un mismo brote estacional, estos estudios se han hecho siempre sobre secuencias directas (Scout *et al.*, 2006). La práctica de obtener sólo secuencias consenso, limita enormemente las chances de la detección de estos eventos, a menos que la variante recombinante representare la variante dominante en la población intramuestra.

El continuo monitoreo de la epidemiología molecular de este virus a escala de cuasiespecies, si bien en numerosas oportunidades brindará escasa información, como se demostró en el caso de las muestras clínicas provenientes de IRAB con cortos períodos de evolución, logrará posiblemente determinar si este tipo de eventos de

recombinación descritos en este trabajo de Tesis ha sido único o es una característica evolutiva de este virus no descrita hasta el momento. Es posible que la recombinación homóloga no sea el evento que guíe la evolución del HRSV, pero sí que contribuya a la generación de variabilidad. Asimismo, determinar si le confiere algún beneficio a nivel de la adaptación (del inglés *fitness*) al HRSV, a pesar de que muy probablemente la mayoría de los recombinantes sean deletéreos y sean removidos por selección purificadora, y de esta manera se explique su baja frecuencia. Un punto particular que demostraría la viabilidad de la recombinación en este virus sería la posibilidad de demostrar la existencia del virus recombinante en sucesivas generaciones, o en la circulación en la población general, en este caso, durante el año 2004 no se encontraron cepas con estas características, y el estudio de este trabajo de Tesis terminó en ese año, de manera que no se ha analizado la epidemiología molecular del HRSV en los años sucesivos todavía. Sin embargo, no debe dejar de tomarse en cuenta un evento genético de estas características a la hora de diseñar vacunas. Dada la importancia potencial de la recombinación en la evolución de los virus ARN, como el HRSV, es importante determinar la frecuencia en que esto ocurre y los factores que controlan su tasa.

6-CONCLUSIONES-RESUMEN

1. Del total de casos de IRAB analizados durante el periodo 1999-2004, se encontró un 39,45% de los mismos con etiología viral positiva, siendo la bronquiolitis la presentación clínica más frecuente en niños menores de cinco años.
2. De los casos con etiología viral positiva, el HRSV fue el virus más frecuentemente encontrado en niños menores de un año (80,2%). Presentando su máxima incidencia en los meses de otoño e invierno, mostrando una correlación negativa con la temperatura media mensual y el índice UV medio, mientras que una correlación positiva con la HR media mensual.
3. El análisis molecular de los subtipos A y B del HRSV mostró que ambos subtipos cocircularon durante el período analizado, encontrándose que en forma global el subtipo A prevaleció sobre el B.
4. El tamizaje previo por RFLP del gen de la glucoproteína G en las muestras positivas para HRSV subtipo A, mostró dos patrones de restricción más frecuentes que dieron cuenta del 80% de todas las muestras analizadas (PA1 y PA2), no encontrándose distribución alternante entre ellos durante los años analizados.
5. Como consecuencia de la escasa información que brindaron los resultados de la técnica de RFLP, se determinó que no es un método útil para seleccionar cepas para realizar estudios posteriores de secuenciación y análisis filogenéticos.
6. La secuenciación y análisis filogenético del gen de la glucoproteína G de 62 cepas de HRSV subtipo A argentinas seleccionadas al azar, permitió demostrar que durante el período analizado cocircularon sólo dos genotipos previamente definidos: GA2 y GA5, excepto durante el año 2002 en el que sólo el GA5 fue encontrado. Resultados hallados en concordancia con los publicados por otros autores correspondientes a otras partes del mundo.
7. El análisis de la distribución y circulación de las cepas argentinas correspondientes a cada uno de los genotipos por separado permitió determinar que dentro de cada genotipo, hay variantes o clados que circulan continuamente en una población, mientras que otras pueden permanecer indetectables durante algunos años y reemerger luego en la población.

8. El análisis en forma global de la relación entre las cepas argentinas y el total de las cepas incluidas en los análisis filogenéticos permitió trazar un mapa filodinámico que demostró que aquellas cepas que circularon en forma esporádica en la Argentina fueron encontradas en otros países los años que no fueron encontradas aquí, mientras que otras cepas cocircularon en todas partes del mundo.
9. El análisis de la variabilidad molecular de las secuencias de nt y aa del HRSV subtipo A, permitió demostrar que la mayoría de los cambios nucleotídicos localizados en las dos regiones variables de la glucoproteína G se traducen en cambios aminoacídicos. Asimismo permitió ver que el genotipo GA2 es más diverso que el GA5 tanto a nivel de nt como de aa.
10. El análisis del valor global de ω para las secuencias del subtipo A, mostró que la glucoproteína G estaría bajo una fuerte selección purificadora, mientras que el análisis para ambos genotipos por separado mostró que para GA2 el valor de ω fue superior al obtenido para GA5. Este resultado se correspondió con el hallado en los perfiles antigénicos, en los cuales el genotipo GA2 presentó dos regiones antigénicas más que el GA5. Surge como consecuencia que cuando se realizan análisis moleculares, ya sea desde el punto de vista epidemiológico molecular, evolutivo, antigénico, etc., sería conveniente hacerlo sobre los genotipos en forma separada.
11. El análisis molecular del gen de la glucoproteína G del HRSV subtipo B, permitió describir en forma detallada un evento genético inusual, como la duplicación de un segmento de 60 nt desde el punto de vista de su evolución molecular en el tiempo y su patrón filodinámico.
12. El análisis filogenético de las cepas con la duplicación junto con cepas de HRSV subtipo B pertenecientes a otros genotipos, mostró que todas las secuencias con el segmento duplicado de 60 nt se asociaron en el mismo clado denominado genotipo BA, excluyendo a las otras secuencias del subtipo B sin la duplicación. De esta manera, existe una fuerte evidencia de que todas poseen un ancestro en común y así ofrece un extraordinario escenario para reevaluar las características epidemiológicas del HRSV.
13. El análisis de la circulación local y global del HRSV subtipo B permitió demostrar que estos virus con una característica genética inusual circularon durante seis años

- consecutivos en todo el mundo e inclusive reemplazaron a otros genotipos predominantes.
14. El análisis de la variabilidad nucleotídica y aminoacídica de estos virus, mostró que un limitado número de sustituciones nucleotídicas se fueron acumulando en las dos copias del segmento duplicado y que en general las variaciones observadas a nivel aminoacídico reflejaron los cambios a nivel nucleotídico. Asimismo la primera copia del segmento duplicado mostró variaciones nucleotídicas y aminoacídicas significativamente mayores que otras partes del gen, inclusive la segunda copia del segmento duplicado. Este hallazgo asociado a que el cálculo de la tasa de evolución para las secuencias BA fue mayor que la reportada para otras secuencias de la glucoproteína G del HRSV de ambos subtipos, sugiere que ciertas fuerzas de selección podrían estar favoreciendo la generación de sustituciones nucleotídicas en esa región.
 15. El análisis del tiempo del MRCA determinó por distintos métodos que las cepas con la duplicación probablemente hayan sido generadas en un evento único entre los años 1997 y 1999. Y debido a que las mismas fueron descritas en otras partes del mundo posteriores a la fecha de la que fuera descrita en nuestro país por primera vez, es muy probable que el evento genético descrito en los virus del genotipo BA se haya producido en Argentina, siendo estos virus realmente nuevos para la población humana.
 16. El análisis molecular intramuestras permitió describir subpoblaciones virales presentes en un huésped denominadas cuasiespecies, que no habían sido detectadas por análisis de secuencias consenso.
 17. Del análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las diferentes variantes encontradas en cada muestra clínica se concluye que dependiendo del tiempo de evolución de la IRAB, se observa mayor o menor variabilidad en cada conjunto de variantes analizadas.
 18. Las sustituciones encontradas en todas las variantes analizadas fueron únicas, sugiriendo que a pesar de que este espectro de mutantes se generaría a altas tasas, cada variante específica se mantiene a baja frecuencia.
 19. El análisis de la dinámica de las distintas variantes halladas para cada muestra clínica, mostró que para cada caso en particular, dependiendo de las características

- clínicas de los pacientes de quienes habían sido tomadas las muestras, las relaciones filogenéticas fueron diferentes.
20. En general para los casos agudos, las variantes se mantuvieron asociadas entre sí en un clado junto con la secuencia directa de las mismas.
 21. El análisis filogenético de las variantes encontradas en el par de muestras ARG1160/04 y ARG2525/04 provenientes del paciente con infección prolongada, permitió mostrar que el mismo estaba coinfectado con más de un genotipo viral (GA2 y GA5) a la vez, esta observación fue posible debido a que ambos genotipos habían sido descritos como cocirculantes durante el año en el que fueron obtenidas las muestras clínicas.
 22. En forma global, la primera muestra (ARG1160/04) presentó menor variabilidad que la segunda, observado en el árbol como asociación de las distintas variantes en un clado independiente junto con la secuencia directa. En cambio para el conjunto de clones de la segunda muestra clínica (ARG2525/04) se encontraron dos poblaciones de variantes mayoritarias (distribuidas entre los dos genotipos descritos).
 23. El análisis de la dinámica de las variantes encontradas en el par de muestras ARG1160/04 y ARG2525/04, mostró que dos clones de la primera muestra (variantes RSVARG1160/04C4 y RSVARG1160/04C7) y uno de la segunda muestra (variante RSVARG2525/04C7) se asociaron entre sí en un clado individual, el cual no se asoció con ningún otro genotipo previamente descrito entre las cepas argentinas, ni entre las circulantes a nivel global.
 24. El análisis de las tres variantes por el programa RDP3 que analiza la probabilidad de recombinación por diferentes métodos, permitió determinar que eran probables variantes recombinantes, así como también determinar a la posición nucleotídica 472 para los eventos de recombinación uno y dos; y la posición 573 para el evento de recombinación tres como los probables puntos de corte de la recombinación.
 25. El análisis filogenético de las variantes mencionadas mostró incongruencias filogenéticas, en cuanto a que diferentes porciones de las secuencias, a ambos lados de los puntos de corte se movían a través de ambos genotipos en los distintos árboles.
 26. Las condiciones bioecológicas para el virus en el paciente hicieron propicio el marco para que pudiera haber existido un evento de recombinación.

27. Ésta es la primera vez que se describen las cuasiespecies para el HRSV, y como consecuencia se ha logrado describir un probable evento de recombinación homóloga intergenotípica inédito para este virus.

Tomando en cuenta lo expuesto en los puntos anteriores principalmente analizando los patrones de circulación local y global del virus, asimismo como la demostración de que el HRSV puede infectar individuos por períodos prolongados, inclusive generando variantes virales nuevas, las dos hipótesis planteadas podrían aceptarse como válidas, debido a que el HRSV no sólo circula en la población siguiendo los distintos brotes invernales alrededor del mundo, sino que además puede quedar alojado en ciertos individuos susceptibles persistiendo hasta el próximo brote invernal en el cual al aparecer nuevos huéspedes con su inmunidad virgen (niños menores de seis meses) puede iniciar un nuevo brote.

Finalmente esta Tesis abarca aspectos epidemiológicos, ecológicos y evolutivos del HRSV que contribuyen a un mejor conocimiento de la biología, diversidad y filogeografía del virus, dándole un rol fundamental al laboratorio virología en la vigilancia molecular. Estos datos resultan indispensables a la hora de evaluar cepas para futuras vacunas, como así la frecuencia y edad de vacunación de la población susceptible.

7-BIBLIOGRAFÍA

- Aaskov J, Buzacott K, Field E, Lowry K, Berlioz-Arthaud A, Holmes EC. 2007. Multiple recombinant dengue type 1 viruses in an isolate from a dengue patient. *J Gen Virol*; 88: 3334-3340.
- Aaskov J, Buzacott K, Thu HM, Lowry K, Holmes EC. 2006. Long-term transmission of defective RNA viruses in humans and Aedes mosquitoes. *Science*; 311: 236-238.
- Aherne W, Bird T, Court SDM, Gardner PS, McQuillin J. 1970. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J Clin Pathol*; 23:7-18.
- Ahmadian G, Randhawa JS, Easton AJ. 2000. Expression of the ORF-2 protein of the human respiratory syncytial virus M2 gene is initiated by a ribosomal termination-dependent reinitiation mechanism. *EMBO J*; 19:2681-2689.
- Anderson K, Stott EJ, Wertz GW. 1992. Intracellular processing of the human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein: Amino acid substitutions affecting folding, transport and cleavage. *J Gen Virol*; 73:1177-1188.
- Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF, Stone Y, McIntosh K. 1985. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis*; 151:626-633
- Anderson LJ, Parker RA, Strikas RL. 1990. Association between respiratory syncytial virus outbreaks and lower respiratory tract deaths of infants and young children. *J Infect Dis*; 161:640-646.
- Araújo Moura FE, Blanc A, Frabasile S, Delfraro A, de Sierra MJ, Tome L, Gonçalves Ramos EA, Siqueira MM, Arbiza J. 2004. Genetic diversity of respiratory syncytial virus isolated during an epidemic period from children of North-Eastern Brazil. *J Med Virol*; 74: 156-160.
- Arbiza J, Berois M, Delfraro A, Frabasile S, Díaz Mitoma F, Milk R, Russi JC. 2006. Genetic characterization of respiratory syncytial viruses isolated from consecutive acute respiratory infections in a HIV infected child. *J Clin Virol*; 35: 41-45.
- Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. 2006. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J Med Virol*; 78:1232-1240.
- Arias A, Lázaro E, Escarmís C, Domingo E. 2001. Molecular intermediates of fitness gain of an RNA virus: characterization of a mutant spectrum by biological and molecular cloning. *J Gen Virol*; 82: 1049-1060.
- Arnold S, Monto MD. 2002. Epidemiology of viral respiratory infections. *Am J Med*; 112:6S-12S.

- Arslañagic E, Matsumoto M, Suzuki K, Nerome K, Tsutsumi H, Hung T. 1996. Maturation of respiratory syncytial virus within HEp-2 cell cytoplasm. *Acta Virol*; 40:209-214.
- Avendaño LF, Palomino MA, Larrañaga C. 2003. Surveillance for Respiratory Syncytial Virus in Infants Hospitalized for Acute Lower Respiratory Infection in Chile (1989 to 2000). *J Clin Microbiol*; 41: 4879-4882.
- Awomoyi AA, Rallabhandi P, Pollin TI, Lorenz E, Sztejn MB, Boukhvalova MS, Hemming VG, Blanco JC, Vogel SN. 2007. Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children. *J Immunol*; 179:3171-3177.
- Baccam P, Thompson RJ, Fedrigo O, Carpenter S, Cornette JL. 2001. PAQ: Partition Analysis of Quasispecies. *Bioinformatics*; 17:16-22.
- Bachi T. 1998. Direct observation of the budding and fusion of an enveloped virus by video microscopy of viable cells. *J Cell Biol*; 107:1689-1695.
- Barik S. 1993. The structure of the 5' terminal cap of the respiratory syncytial virus mRNA. *J Gen Virol*; 74:485-490.
- Barrero PR, Zandomeni RO, Mistchenko AS. 2001. Measles virus circulation in Argentina: 1991-1999. *Arch Virol*; 146: 815-823.
- Benguigui Y, López Antumaño FJ, Schmunis G, Yunes J, eds. Organización Panamericana de la Salud, Washington D.C., 1997.
- Bermingham A, Collins PL. 1999. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *PNAS*; 96:11259-11264.
- Bharaj P, Sullender W, Kabra SK, Mani K, Cherian J, Tyagi V, Chahar HS, Kaushik S, Dar L, Broor S. 2009. Respiratory viral infections detected by multiplex PCR among pediatric patients with lower respiratory tract infections seen at an urban hospital in Delhi from 2005 to 2007. *Virology J*; 6: 89.
- Bilkis MD, Barrero PR, Mistchenko AS. 2000. Measles resurgence in Argentina: 1997-98 outbreak. *Epidemiol Inf*; 124: 289-293.
- Bitko V, Musiyenko A, Barik S. 2007. Viral infection of the lungs through the eye. *J Virol*; 81:783-790.
- Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, Musiyenko A, Ramaswamy M, Look DC, Barik S. 2007. Nonstructural Proteins of Respiratory Syncytial Virus Suppress Premature Apoptosis by an NF- κ B-Dependent, Interferon-Independent Mechanism and Facilitate Virus Growth. *J Virol*; 81:1786-1795.
- Blanc A, Delfraro A, Frabasile S, Arbiza J. 2005. Genotypes of respiratory syncytial virus group B identified in Uruguay. *Arch Virol*; 150:603-609.

- Blount RE Jr, Morris JA, Savage RE. 1956. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coriza. *Proc Soc Exp Biol Med*; 92:544-549.
- Boni MF, Zhou Y, Taubenberger JK, Holmes EC. 2008. Homologous Recombination Is Very Rare or Absent in Human Influenza A Virus. *J Virol*; 82: 4807-4811.
- Bont L. 2009. Nosocomial RSV infection control and outbreak management. *Paediatr Respir Rev*; 10 Suppl 1:16-7. Review.
- Botosso VF, Zanotto PM, Ueda M, Arruda E, Gilio AE, Vieira SE, Stewien KE, Peret TC, Jamal LF, Pardini MI, Pinho JR, Massad E, Sant'anna OA, Holmes EC, Durigon EL; VGDN Consortium. 2008 Positive Selection Results in Frequent Reversible Amino Acid Replacements in the G Protein Gene of Human Respiratory Syncytial Virus. *PLoS Pathog* 5(1): e1000254. doi:10.1371.
- Brandenburg AH, Neijens HJ, Osterhaus A. 2001. Pathogenesis of RSV lower respiratory tract infection: implications for vaccine development. *Vaccine*; 19:2769-2782.
- Brock SC, Goldenring JR, Crowe JE Jr. 2003. Apical recycling systems regulate directional budding of RSV from polarized epithelial cells. *PNAS*; 100: 15143-15148.
- Brown G, Aitken J, Rixon HW, Sugrue RJ. 2002. Caveolin-1 is incorporated into mature respiratory syncytial virus particles during virus assembly on the surface of virus-infected cells. *J Gen Virol*; 83:611-621.
- Brown G, Rixon HW, Sugrue RJ. 2002. Respiratory syncytial virus assembly occurs in GM1-rich regions of the host-cell membrane and alters the cellular distribution of tyrosine phosphorylated caveolin-1. *J Gen Virol*; 83:1841-1850.
- Bukreyev A, Camargo E, Collins PL. 1996. Recovery of infectious respiratory syncytial virus expressing an additional, foreign gene. *J Virol*; 70:6634-6641.
- Bukreyev A, Whitehead SS, Murphy BR, Collins PL. 1997. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *J Virol*; 71:8973-8982.
- Burke E, Dupuy L, Wall C, Barik S. 1998. Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. *Virology*; 252:137-148).
- Cane P. 2001. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol*; 11: 103-116.
- Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. 1991. Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. *J Gen Virol*; 72:2091-2096.
- Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. 1994. Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city. *J Clin Microbiol*; 32:1-4.

- Cane PA, Pringle CR. 1995. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. *J Virol*; 69: 2918-2925.
- Carballal G, Siminovich M, Murtagh P, Cerqueiro C, Avila M, Salomon H, Catalano M, Weissenbacher MC. 1990. Etiological, clinical and histopathological analysis of 32 fatal cases of acute respiratory infections in children under 5 years old. *Rev Infect Dis*; 12:S1074-1080.
- Carballal G, Videla CM, Espinosa MA, Savy V, Uez O, Sequeira MD, Knez V, Requeijo PV, Posse CR, Miceli I. 2001. Multicentered study of viral acute lower respiratory infections in children from four cities of Argentina, 1993-1994. *J Med Virol*; 64:167-174.
- Chan PW, Chew FT, Tan TN, Chua KB, Hooi PS. 2002. Seasonal variation in respiratory syncytial virus chest infection in the tropics. *Pediatr Pulmonol*; 34:47-51.
- Chanock R, Finberg L. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection of infants and young children. *Am J Hyg*; 66:291-300.
- Chanock R, Roizman B, Myers R. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg*; 66:281-290.
- Chen CH, Lin YT, Yang YH, Wang LC, Lee JH, Kao CL, Chiang BL. 2008. Ribavirin for respiratory syncytial virus bronchiolitis reduced the risk of asthma and allergen sensitization. *Pediatr Allergy Immunol*; 19:166-172.
- Chen R, Holmes EC. 2008. The evolutionary dynamics of human influenza B virus. *J Mol Evol*; 66:655-663.
- Cheng X, Park H, Zhou H, Jin H. 2005. Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication. *J Virol*; 79:13943-13952.
- Cherrie AH, Anderson K, Wertz GW, Openshaw PJ. 1992. Human Cytotoxic T Cells Stimulated by Antigen on Dendritic Cells Recognize the N, Sh, F, M, 22k, and 1b Proteins of Respiratory Syncytial Virus. *J Virol*; 66:2102-2110.
- Choi E, Lee HJ. 2000. Genetic diversity and molecular epidemiology of the G protein of subgroups A and B of respiratory syncytial viruses isolated over 9 consecutive epidemics in Korea. *J Infect Dis*; 181:1547-1556.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*; 162:156-159.
- Chomczynski P, Sacchi N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*; 1:581-585.

- Claesson BA, Trollfors B, Brodin I, Granström M, Henrichsen J, Jodal U, Juto P, Kallings I, Kanclerski K, Lagergård T, et al. 1989. Etiology of community-acquired pneumonia in children based on antibody responses to bacterial and viral antigens. *Pediatr Infect Dis J*; 8:856-862.
- Clarke SKR, Gardner PS, Poole PM, et al. 1978. Respiratory syncytial virus infection: admissions to hospital in industrial, urban, and rural areas: Research Council subcommittee on respiratory syncytial virus vaccines. *Br Med J*; 2:796-798.
- Coates HV, Alling DW, Chanock RM. 1966. An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization assay. *Am J Epidemiol*; 83:299-313.
- Coggins WB, Lefkowitz EJ, Sullender WM. 1998. Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. *J Clin Microbiol*; 36:3552-3557.
- Collier L, Oxford J. 2000. Human virology. Oxford: Oxford University Press: 231-232.
- Collins PL, Chanock RM, Murphy BR. 2001. Respiratory syncytial virus. En: Fields Virology (Knipe DM, Howley PM, ed.) Lippincott-Williams and Wilkins, Philadelphia. pp. 1443-1486.
- Collins PL, Hill MG, Camargo E, Grosfeld H, Chanock RM, Murphy BR. 1995. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *PNAS*; 92:11563-11567.
- Collins PL, Hill MG, Johnson PR. 1990. The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: Sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. *J Gen Virol*; 71:3015-3020.
- Collins PL, Mink MA, Stec DS. 1991. Rescue of synthetic analogs of respiratory syncytial virus genomic RNA and effect of truncations and mutations on the expression of a foreign reporter gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 88:9663-9667.
- Collins PL, Mottet G. 1991. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*; 72:3095-3101.
- Collins PL, Mottet G. 1993. Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*; 74:1445-1450.
- Collins PL, Wertz GW. 1983. cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *PNAS*; 80:3208-3212.

- Connors M, Collins PL, Firestone CY, Murphy BR. 1991. Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived. *J Virol*; 65:1634-1637.
- Cooper DL, Smith GE, Edmunds WJ, Joseph C, Gerard E, George RC. 2007. The contribution of respiratory pathogens to the seasonality of NHS Direct calls. *J Infect*; 55:240-248.
- Cowton VM, McGivern DR, Fearn R. 2006. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol*; 87: 1805-1821
- Cristina J, López JA, Albo C, García-Barreno B, García J, Melero JA, Portela A. 1990. Analysis of genetic variability in human respiratory syncytial virus by the RNase A mismatch cleavage method: subtype divergence and heterogeneity. *Virology*; 174:126-134.
- Curwen M. 1997. Excess winter mortality in England and Wales with special reference to the effects of temperatures and Influenza. In: Charlton J, Murphy M (eds). *The health of adult Britain 1841-1994*. London: The Stationery Office: 205-216.
- da Silva LH, Spilki FR, Riccetto AG, de Almeida RS, Baracat EC, Arns CW. 2008. Genetic variability in the G protein gene of human respiratory syncytial virus isolated from the Campinas metropolitan region, Brazil. *J Med Virol*; 80: 1653-1660.
- de Waal L, Power UF, Yuksel S, van Amerongen G, Nguyen TN, Niesters HG, de Swart RL, Osterhaus AD. 2004. Evaluation of BBG2Na in infant macaques: specific immune responses after vaccination and RSV challenge. *Vaccine*; 22:915-922.
- Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, Melendi GA, Hernandez JZ, Bataille JP, Diaz L, Trento A, Chang HY, Mitzner W, Ravetch J, Melero JA, Irusta PM, Polack FP. 2009. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat Med.*; 15:34-41.
- Deplanche M, Lemaire M, Mirandette C, Bonnet M, Schelcher F, Meyer G. 2007. In vivo evidence for quasispecies distributions in the bovine respiratory syncytial virus genome. *J Gen Virol*; 88:1260-1265.
- Dickens LE, Collins PL, Wertz GW. 1984. Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J Virol*; 52: 364-369.
- Domingo E, Holland JJ. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*; 51:151-178.
- Domingo E, Martin V, Perales C, Grande-Pérez A, García-Arriaza J, Arias A. 2006. Viruses as quasispecies: biological implications. Review. *Curr Top Microbiol Immunol*; 299:51-82.
- Dowell SF, Anderson LJ, Gary HE Jr, Erdman DD, Plouffe JF, File TM Jr, Marston BJ, Breiman RF. 1996. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. *J Infect Dis*; 174:456-462.
- Drake JW, Holland JJ. 1999. Mutation rates among RNA viruses. *PNAS*; 96:13910-13913.

- Drummond AJ, Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol*; 7:214-222.
- Duffy S, Shackelton LA and Holmes EC. 2008. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet*; 9: 267-276.
- Dupuy LC, Dobson S, Bitko V, Barik S. 1999. Casein kinase 2-mediated phosphorylation of respiratory syncytial virus phosphoprotein P is essential for the transcription elongation activity of the viral polymerase; Phosphorylation by casein kinase 1 occurs mainly at Ser (215) and is without effect. *J Virol*; 73:8384-8392.
- Eccles R. 2002. An explanation for the seasonality of acute upper respiratory tract viral infections. *Acta Otolaryngol*; 122:183-191.
- Eigen M, Biebricher CK. 1988. Sequence space and quasispecies distribution. In *RNA Genetics*; 3:211-245. Edited by Domingo E, Ahlquist P; Holland JJ. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Englund JA. 1999. Prophylaxis and therapy of RSV and other community respiratory virus infections in immunocompromised hosts. *Cancer Res Ther Control*; 9:141-145.
- Falsey A, Walsh E. 2000. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clinical Microbiology Reviews*; 13:371-384.
- Falsey AR, Criddle MC, Walsh EE. 2006. Detection of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus by reverse transcription polymerase chain reaction in adults with and without respiratory illness. *J Clin Virol*; 35:46-50.
- Falsey AR, McCann RM, Hall WJ, Criddle MM. 1996. Evaluation of four methods for the diagnosis of respiratory syncytial virus infection in older adults. *J Am Geriatr Soc*; 44:71-73.
- Falsey AR, Walsh EE, Betts RF. 1990. Serologic evidence of respiratory syncytial virus infection in nursing home patients. *J Infect Dis*; 162:568-569.
- Falsey AR. 1998. Respiratory syncytial virus infection in older persons. Review. *Vaccine*; 16:1775-8.
- Fan J, Henrickson KJ, Savatski LL. 1998. Rapid simultaneous diagnosis of infections with respiratory syncytial viruses A and B, influenza A and B, and human parainfluenza virus types 1, 2, and 3 by multiplex quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction-enzyme hybridization assay (Hexaplex). *Clin Infect Dis*; 26:1397-1402.
- Farci P, Strazzeri R, Alter HJ, Farci S, Degioannis D, Coiana A, Peddis G, Usai F, Serra G, Chessa L, Diaz G, Balestrieri A, Purcell RH. 2002. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *PNAS*; 99:3081-3086.
- Fearn R, Collins PL. 1999. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol*; 73:5852-5864.

- Fearn R, Peeples ME, Collins PL. 1997. Increased expression of the N protein of respiratory syncytial virus stimulates minigenome replication but does not alter the balance between the synthesis of mRNA and antigenome. *Virology*; 236:188-201.
- Feldman SA, Hendry RM, Beeler JA. 1999. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J Virol*; 73:6610-6617.
- Fleming DM, Pannell RS, Cross KW. 2005. Mortality in children from influenza and respiratory syncytial virus. *J Epidemiol Community Health*; 59:586-590.
- Frabasile S, Delfraro A, Facal L, Videla C, Galiano M, de Sierra MJ, Ruchansky D, Viturera N, Berois M, Carballal G, Russi J, Arbiza J. 2003. Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993-2001. *J Med Virol*; 71:305-312.
- Freytmuth F, Vabret A, Galateau-Salle F, Ferey J, Eugene G, Petitjean J, Gennetay E, Brouard J, Jokik M, Duhamel JF, Guillois B. 1997. Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenzavirus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization. *Clin Diagn Virol*; 8:31-40.
- Fuentes S, Tran KC, Luthra P, Teng MN, He B. 2007. Function of the Respiratory Syncytial Virus Small Hydrophobic Protein. *J Virol*; 81: 8361-8366.
- Galiano MC, Luchsinger V, Videla CM, De Souza L, Puch SS, Palomo C, Ricarte C, Ebekian B, Avendaño L, Carballal G. 2005a. Intragroup antigenic diversity of human respiratory syncytial virus (group A) isolated in Argentina and Chile. *J Med Virol*; 77: 311-316.
- Galiano MC, Palomo C, Videla CM, Arbiza J, Melero JA, Carballal G. 2005b. Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups a and b) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 to 2001). *J Clin Microbiol*; 43:2266-2273.
- Gallagher JT, Lyon M, Steward WP. 1986. Structure and function of heparan sulfate proteoglycans. *Biochem J*; 236:313-325.
- Garcia O, Martin M, Dopazo J, Arbiza J, Frabasile S, Russi J, Hortal M, Perez-Breña P, Martinez I, Garcia-Barreno B, Melero JA. 1994. Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *J Virol*; 68:5448-5459.
- Garcia-Barreno B, Delgado T, Melero JA. 1996. Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: Significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. *J Virol*; 70:801-808.
- García-Barreno B, Palomo C, Peñas C, Delgado T, Perez-Breña P, Melero JA. 1989. Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J Virol*; 63:925-932.

- Gardner PS, McQuilin J. 1968. Viral diagnosis by immunofluorescence. *Lancet*; 1:597-598.
- Gardner PS. 1973. Respiratory syncytial virus infections. *Postgrad Med J*; 49:788-791.
- Gardner, PS, McQuillin J, Court SDM. 1970. Speculation on pathogenesis in death from respiratory syncytial virus infection. *Br Med J*; 1:327-330.
- Ghildyal R, Li D, Peroulis I, Shields B, Bardin PG, Teng MN, Collins PL, Meanger J, Mills J. 2005. Interaction between the respiratory syncytial virus G glycoprotein cytoplasmic domain and the matrix protein *J Gen Virol*; 86:1879-1884.
- Ghildyal R, Mills J, Murray M, Vardaxis N, Meanger J. 2002. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *J Gen Virol*; 83:753-757.
- Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ. 2000. Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics*; 16:573-582.
- Gilca R, De Serres G, Tremblay M, Vachon ML, Leblanc E, Bergeron MG, Dery P, Boivin G. 2006. Distribution and clinical impact of human respiratory syncytial virus genotypes in hospitalized children over 2 winter seasons. *J Infect Dis*; 193:54-58.
- Glezen WP, Paredes A, Allison JE, Taber LH, Frank AL. 1981. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. *J Pediatr*; 98:708-715.
- Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. 1986. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child*; 140: 543-546.
- Gorman JJ, Ferguson BL, Speelman D, Mills J. 1997. Determination of the disulfide bond arrangement of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Protein Sci*; 6:1308-1315.
- Graman PS, Hall CB. 1989. Epidemiology and control of nosocomial viral infections. *Infect Dis Clin North Am*; 3:815-841.
- Griffin MR, Coffey CS, Neuzil KM, Mitchel EF, Wright PF, Edward KM. 2002. Winter viruses: influenza- and respiratory syncytial virus-related morbidity in chronic lung disease. *Arch Intern Med*; 162:1229-1236.
- Grupo colaborativo de vigilancia epidemiológica de gripe y otras virosis respiratorias en Argentina. 2000. Boletín GROG. Aventis Pasteur 4 (2).
- Grupo colaborativo de vigilancia epidemiológica de gripe y otras virosis respiratorias en Argentina. 2001. Boletín GROG. Aventis Pasteur 5 (2).
- Hahn CS, Lustig S, Strauss EG, Strauss JH. 1988. Western equine encephalitis virus is a recombinant virus. *PNAS*; 85:5997-6001.
- Hall CB, Douglas RG Jr, Geiman JM, Messner MK. 1975. Nosocomial respiratory syncytial virus infections. *N Engl J Med*; 293:1343-1346.

- Hall CB, Douglas RG Jr, Geiman JM. 1980. Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*; 141:98-102.
- Hall CB, Douglas RG Jr. 1981. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr*; 99:100-103.
- Hall CB, Douglas RG, Geiman JM. 1975. Respiratory syncytial virus infection in infants: quantitation and duration shedding. *J Pediatr*; 89:1-15.
- Hall CB, Geiman JM, Biggar R, Kotok DI, Hogan PM, Douglas GR Jr. 1976. Respiratory syncytial virus infections within families. *N Engl J Med*; 294:414-419.
- Hall CB. 2001. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med*; 344:1917-1928.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*; 41: 95-98.
- Hambling MH. 1964. Survival of the respiratory syncytial virus during the storage under various conditions. *Br J Exp Pathol*; 45:647-655.
- Hammond GW, Raddatz RL, Gelskey DE. 1989. Impact of atmospheric dispersion and transport of viral aerosols on the epidemiology of influenza. *Rev Infect Dis*; 11:494-497.
- Hardy RW, Harmon SB, Wertz GW. 1999. Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. *J Virol*; 73:170-176.
- Hardy RW, Wertz GW. 1998. The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J Virol*; 72:520-526.
- Haynes LM, Jones LP, Barskey A, Anderson LJ, Tripp RA. 2003. Enhanced disease and pulmonary eosinophilia associated with formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccination are linked to G glycoprotein CX3C-CX3CR1 interaction and expression of substance P. *J Virol*; 77:9831-9844.
- Heikkinen T, Osterback R, Peltola V, Jartti T, Vainionpää R. 2008. Human metapneumovirus infections in children. *Emerg Infect Dis*; 14:101-106.
- Heminway BR, Yu Y, Tanaka Y, Perrine KG, Gustafson E, Bernstein JM, Galinski MS. 1994. Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology*; 200:801-805.
- Henderson FW, Collier AM, Clyde WA Jr, Denny FW. 1979. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity: A prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med*; 300:530-534.
- Henderson G, Murray J, Yeo RP. 2002. Sorting of the respiratory syncytial virus matrix protein into detergent-resistant structures is dependent on cell-surface expression of the glycoproteins. *Virology*; 300:244-254.

- Henrickson KJ, Hall CB. 2007. Diagnostic Assays for Respiratory Syncytial Virus Disease. *Pediatr Infect Dis J*; 26: S36-S40.
- Henrickson KJ, Kraft A, Shaw J, Canter D. 2007. Comparison of electronic microarray (NGEN RVA) to enzyme hybridization assay (Hexaplex) for multiplex RT-PCR detection of common respiratory viruses in children. *Clin Microbiol NewsL*; 29:113-119.
- Henrickson KJ. 2004. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *Pediatr Infect Dis J*; 23:S6-S10.
- Henrickson KJ. 2005. Cost-effective use of rapid diagnostic techniques in the treatment and prevention of viral respiratory Infections. *Pediatr Ann*; 34:24-31.
- Hersh BS, Tambini G, Nogueira AC, Carrasco P, de Quadros C. 2000. Review of regional measles surveillance data in the Americas, 1996-99. *Lancet*; 355:1943-1948.
- Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0.5. *Bioinformatics*; 23: 2947-2948.
- Hoffman SJ, Laham FR, FP Polack. 2004. Mechanisms of illness during respiratory syncytial virus infection: the lungs, the virus and the immune response. *Microbes Infect*; 6:767-772.
- Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Ray CG, Taussig LM, Lebowitz MD. 1991. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol*; 133:1135-1151.
- Holland JJ, De La Torre JC, Steinhauer DA. 1992. RNA virus populations as quasispecies. Review. *Curr Top Microbiol Immunol*; 176:1-20.
- Holmes EC, Worobey M, Rambaut A. 1999. Phylogenetic evidence for recombination in Dengue virus. *Mol Biol Evol*; 16: 405-409.
- Holmes EC. 2008. Evolutionary history and phylogeography of human viruses. Review. *Annu Rev Microbiol*; 62:307-328.
- Holmes, EC. 2009. RNA virus genomics: a world of possibilities. *J Clin Invest*; 119: 2488-2495.
- Horikami SM, Curran J, Kolakofsky D, Moyer SA. 1992. Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. *J Virol*; 66:4901-4908.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*; 17:754-755.
- Hull J, Rowlands K, Lockhart E, Moore C, Sharland M, Kwiatkowski D. 2003. Variants of the chemokine receptor CCR5 are associated with severe bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*; 188:904-907.
- Jameson BA, Wolf H. 1988. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *CABIOS*; 4:181-186.

- Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG, Holmes EC. 2002. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J Mol Evol*; 54: 156-165.
- Johnson PR Jr, Olmsted RA, Prince GA, Murphy BR, Alling DW, Walsh EE, Collins PL. 1987. Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: Evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. *J Virol*; 61:3163-3166.
- Johnson PR, Collins PL. 1988. The fusion glycoproteins of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B: Sequence conservation provides a structural basis for antigenic relatedness. *J Gen Virol*; 69:2623-2628.
- Johnson PR, Collins PL. 1989. The 1B (NS2), 1C (NS1) and N proteins of human respiratory syncytial virus (RSV) of antigenic subgroups A and B: sequence conservation and divergence within RSV genomic RNA. *J Gen Virol*; 70:1539-1547.
- Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: Extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *PNAS*; 84:5625-5629.
- Johnston SL, Siegel CS. 1990. Evaluation of direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, centrifugation culture, and conventional culture for the detection of respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol*; 28:2394-2397.
- Julenius K, Mølgaard A, Gupta R, Brunak S. 2005. Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*; 15:153-164.
- Jung A, Maier R, Vartanian JP, Bocharov G, Jung V, Fischer U, Meese E, Wain-Hobson S, Meyerhans A. 2002. Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature*; 418(6894):144.
- Kahn JS, Schnell MJ, Buonocore L, Rose JK. 1999. Recombinant vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins: RSV fusion protein can mediate infection and cell fusion. *Virology*; 254:81-91.
- Kalina WV, Wollums AR, Berghaus RD, Gershwin LJ. 2004. Formalin-inactivated bovine RSV vaccine enhances a Th2 mediated immune response in infected cattle. *Vaccine*; 22:1465-1474.
- Kanagawa T. 2003. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J Biosci Bioeng*; 96: 317-323.
- Kapikian AZ, Bell RJA, Mastrota FM, Jonson KM, Huncher RJ, Chanock RM. 1961. An outbreak of febrile illness and pneumonia associated with respiratory syncytial virus infection. *Am J Hyg*; 74:234-248.
- Kaplan NM, Dove W, Abd-Eldayem SA, Abu-Zeid AF, Shamooh HE, Hart CA. 2008. Molecular epidemiology and disease severity of respiratory syncytial virus in relation to

- other potential pathogens in children hospitalized with acute respiratory infection in Jordan. *J Med Virol*; 80:168-174.
- Karron RA, Buonagurio DA, Georgiu AF, Whitehead SS, Adamus JE, Clements-Mann ML, Harris DO, Randolph VB, Udem SA, Murphy BR, Sidhu MS. 1997. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: Clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *PNAS*; 94:13961-13966.
- Karron RA, Wright PF, Belshe RB, Thumar B, Casey R, Newman F, Polack FP, Randolph VB, Deatly A, Hackell J, Gruber W, Murphy BR, Collins PL. 2005. Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *J Infect Dis*; 191:1093-10104.
- Karron RA, Wright PF, Crowe JE Jr, Clements-Mann ML, Thompson J, Makhene M, Casey R, Murphy BR. 1997. Evaluation of two live, cold-passaged, temperature-sensitive respiratory syncytial virus vaccines in chimpanzees and in human adults, infants, and children. *J Infect Dis*; 176:1428-1436.
- Kim MR, Lee HR, Lee GM. 2000. Epidemiology of acute viral respiratory tract infections in Korean children. *J Infect*; 41:152-158.
- Kim YJ, Boeckh M, Englund JA. 2007. Community respiratory virus infections in immunocompromised patients: hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients, and individuals with human immunodeficiency virus infection. *Semin Respir Crit Care Med*; 28:222-242.
- Kim YK, Choi EH, Lee HJ. 2007. Genetic Variability of the Fusion Protein and Circulation Patterns of Genotypes of the Respiratory Syncytial Virus. *J Med Virol*; 79:820-828.
- Kimpen JL. 2002. Prevention and treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis and postbronchiolitic wheezing. *Respir Res*; 3:S40-S45.
- Kling JE, Chen L. 2003. Lower respiratory infections in children. *Curr Opin Pediatr*; 15:121-126.
- Kosakovsky Pond SL, Frost SDW. 2005a. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments *Bioinformatics*; 21:2531-2533.
- Kosakovsky Pond SL, Frost SDW. 2005b. Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. *Mol Biol Evol*, 22:1208-1222.
- Kosakovsky Pond SL, Posada D, Gravenor MB, Woelk CH, Frost SD. 2006. Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. *Mol Biol Evol*; 23:1891-1901.
- Krempl C, Murphy BR, Collins PL. 2002. Recombinant respiratory syncytial virus with the G and F genes shifted to the promoter-proximal positions. *J Virol*; 76:11931-11942.

- Kuo L, Fearn R, Collins PL. 1996. The structurally diverse intergenic regions of respiratory syncytial virus do not modulate sequential transcription by a dicistronic minigenome. *J Virol*; 70:6143-6150.
- Kuo L, Fearn R, Collins PL. 1997. Analysis of the gene start and gene end signals of human respiratory syncytial virus: Quasi-templated initiation at position 1 of the encoded mRNA. *J Virol*; 71:4944-4953.
- Kuo L, Grosfeld H, Cristina J, Hill MG, Collins PL. 1996. Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *J Virol*; 70:6892-6901.
- Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Tsutsumi H. 2004. Genetic Variability and Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus Subgroup A Strains in Japan Determined by Heteroduplex Mobility Assay. *J Clin Microbiol*; 42:2048-2053.
- Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Yui I, Kase T, Nakayama T, Tsutsumi H. 2005. A Phylogenetic Study of Human Respiratory Syncytial Viruses Group A and B Strains Isolated in Two Cities in Japan from 1980–2002. *J Med Virol*; 76:241-247.
- La Montagne JR. 1997. RSV pneumonia, a community-acquired infection in adults. *Lancet*; 349:149-50.
- Langedijk JP, de Groot BL, Berendsen HJ, van Oirschot JT. 1998. Structural homology of the central conserved region of the attachment protein G of respiratory syncytial virus with the fourth subdomain of 55-kDa tumor necrosis factor receptor. *Virology*; 243:293-302.
- Larsen LE, Tjørnehøj K, Viuff B. 2000. Extensive sequence divergence among bovine respiratory syncytial viruses isolated during recurrent outbreaks in closed herds. *J Clin Microbiol*; 38: 4222-4227.
- Lazar I, Canaan A, Weibel C, Kahn JS. 2006. Novel mutations in the respiratory syncytial virus G gene identified in viral isolates from a girl with severe combined immune deficiency treated with intravenous immune globulin. *J Clin Virol*; 37:168-173.
- Le Mercier P, Garcin D, Hausmann S, Kolakofsky D. 2002. Ambisense Sendai viruses are inherently unstable but are useful to study viral RNA synthesis. *J Virol*; 76:5492-5502.
- Leader S, Kohlhase K. 2002. Respiratory syncytial virus-coded pediatric hospitalizations, 1997 to 1999. *Pediatr Infect Dis J*; 21:629-632.
- Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. 2003. Type 1 and type 2 cytokine imbalances in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*; 168:633-639.
- Lessler J, Reich NG, Brookmeyer R, Perl TM, Nelson KE, Cummings DA. 2009. Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis*; 9:291-300.

- Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR. 1987. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*; 68:2521-2524.
- Levine S, Peeples M, Hamilton R. 1977. Effect of respiratory syncytial virus infection of HeLa-cell macromolecular synthesis. *J Gen Virol*; 37:53-63.
- Lieberman D, Lieberman D, Friger MD. 1999. Seasonal variation in hospital admissions from community-acquired pneumonia: a 5-year study. *J Infect*; 39: 134-140.
- Lina B, Valette M, Foray S, Luciani J, Stagnara J, See DM, Aymard M. 1996. Surveillance of community acquired viral infections due to respiratory viruses in Rhone- Alpes (France) during winter 1994 to 1995. *J Clin Microbiol*; 34:3007-3011.
- Lindblom A, Bhadri V, Söderhäll S, Ohrmalm L, Wong M, Norbeck O, Lindau C, Rotzén-Ostlund M, Allander T, Catchpoole D, Dalla-Pozza L, Broliden K, Tolfvenstam T. 2010. Respiratory viruses, a common microbiological finding in neutropenic children with fever. *J Clin Virol*; 47:234-237.
- Lo MS, Brazas RM, Holtzman MJ. 2005. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *J Virol*; 79:9315-9319.
- López Guinea J, Casado Flores M, Sobrino M, Espínola Docio B, de la Calle Cabrera T, Serrano A, García TM. 2007. Bronquiolitis grave. Epidemiología y evolución de 284 pacientes. *An Pediatr (Barc)*; 67:116-122.
- López JA, Bustos R, Orvell C, Berois M, Arbiza J, García-Barreno B, Melero JA. 1998. Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J Virol*; 72:6922-6928.
- Maggon K, Barik S. 2004. New drugs and treatment for respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol*; 14:149-168.
- Mahony JB. 2008. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev*; 21:716-747
- Marguet C, Lubrano M, Gueudin M, Le Roux P, Deschildre A, Forget C, Couderc L, Siret D, Donnou MD, Bubenheim M, Vabret A, Freymuth F. 2009. In Very Young Infants Severity of Acute Bronchiolitis Depends On Carried Viruses. *PLoS ONE*; 4: e4596.
- Martin DP, Williamson C, Posada D. 2005. Recombination Detection Program version 3, rdp2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics*; 21: 260-262.
- Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. 1995. Asthma and wheezing in the first six years of life. *N Engl J Med*; 332:133-138.

- Martínez I, Dopazo J, Melero JA. 1997. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *J Gen Virol*; 78:2419-2429.
- Martínez I, Melero JA. 2002. A model for the generation of multiple A to G transitions in the human respiratory syncytial virus genome: predicted RNA secondary structures as substrates for adenosine deaminases that act on RNA. *J Gen Virol*; 83: 1445-55.
- Martínez I, Valdés O, Delfraro A, Arbiza J, Russi J, Melero JA. 1999. Evolutionary pattern of the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses from antigenic group B, the use of alternative termination codons and lineage diversification. *J Gen Virol*; 80:125-130.
- Matheson JW, Rich FJ, Cohet C, Grimwood K, Huang QS, Penny D, Hendy MD, Kirman JR. 2006. Distinct patterns of evolution between respiratory syncytial virus subgroups A and B from New Zealand isolates collected over thirty-seven years. *J Med Virol*; 78:1354-1364.
- Maynard Smith J. 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol*; 34:126-129.
- McBride JT. 1999. Pulmonary function changes in children after respiratory syncytial virus infection in infancy. *J Pediatr*; 135: S28-S32.
- McCarthy CA, Hall CB. 1998. Recent approaches to the management and prevention of respiratory syncytial virus infection. *Curr Clin Top Infect Dis*; 18:1-18.
- McCullers JA, Saito T, Iverson AR. 2004. Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003. *J Virol*; 78:12817-12828.
- McCullers JA, Wang GC, He S, Webster RG. 1999. Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature. *J Virol*; 73: 7343-7348.
- McCurdy LH, Graham BS. 2003. Role of Plasma Membrane Lipid Microdomains in Respiratory Syncytial Virus Filament Formation. *J Virol*; 77:1747-1756.
- McIntosh K, Masters HB, Orr I, Chao RK, Barkin RM. 1978. The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants. *J Infect Dis*; 138:24-32.
- Meert K, Heidemann S, Lieh-Lai M, Sarnaik AP. 1989. Clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections in healthy versus previously compromised host. *Pediatr Pulmonol*; 7:167-170.
- Mejías A, Chávez-Bueno S, Gómez AM, Somers C, Estripeaut D, Torres JP, Jafri HS, Ramilo O. 2008. Respiratory syncytial virus persistence: evidence in the mouse model. *Pediatr Infect Dis J*; 27(10 Suppl):S60-62.
- Melero JA, García-Barreno B, Martínez I, Pringle CR, Cane PA. 1997. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J Gen Virol*; 78:2411-2418.
- Mink MA, Stec DS, Collins PL. 1991. Nucleotide sequences of the 39 leader and 59 trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology*; 185:615-624.

- Mitnaul LJ, Matrosovich MN, Castrucci MR, Tuzikov AB, Bovin NV, Kobasa D, Kawaoka Y. 2000. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *J Virol*; 74:6015–6020.
- Mlinaric-Galinovic G, Vilibic-Cavlek T, Ljubin-Sternak S, Drazenovic V, Galinovic I, Tomic V, Welliver RC. 2009. Eleven consecutive years of respiratory syncytial virus outbreaks in Croatia. *Pediatr Int*; 51: 237-240.
- Moler FW, Khan AS, Meliones JN, Custer JR, Palmisano J, Shope TC. 1992. Respiratory syncytial virus morbidity and mortality estimates in congenital heart disease patients: A recent experience. *Crit Care Med*; 20:1406-1413.
- Monick MM, Cameron K, Staber J, Powers LS, Yarovinsky TO, Koland JG, Hunninghake GW. 2005. Activation of the epidermal growth factor receptor by respiratory syncytial virus results in increased inflammation and delayed apoptosis. *J Biol Chem*; 280:2147-2158.
- Montieri S, Puzelli S, Ciccozzi M, Calzoletti L, Di Martino A, Milia MG, Rossi A, Piro F, Rezza G, Donatelli I. 2007. Amino acid changes in the attachment G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses (subgroup A) isolated in Italy over several epidemics (1997-2006). *J Med Virol*; 79:1935-1942.
- Moore AE, Sabachewsky L, Toolan HW. 1955. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res*; 15: 598-602.
- Moura FE, Blanc A, Frabasile S, Delfraro A, de Sierra MJ, Tome L, Ramos EA, Siquiera MM, Rabiza J. 2004. Genetic diversity of respiratory syncytial virus isolated during an epidemic period from children of northeastern Brazil. *J Med Virol*; 74: 156-160.
- Mufson MA, Belshe RB, Orvell C, Norrby E. 1987. Subgroup characteristics of respiratory syncytial virus strains recovered from children with two consecutive infections. *J Clin Microbiol*; 25: 1535-1539.
- Mufson MA, Örvell C, Rafnar B, Norrby E. 1985. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*; 66:2111-2124.
- Murata Y, Falsey AR. 2007. Respiratory syncytial virus infection in adults. Review *Antivir Ther*;12:659-670.
- Murphy BR, Alling DW, Snyder MH, Walsh EE, Prince GA, Chanock RM, Hemming VG, Rodriguez WJ, Kim HW, Graham BS, et al. 1986. Effect of age and preexisting antibody on serum antibody response of infants and children to the F and G glycoproteins during respiratory syncytial virus infection. *J Clin Microbiol*; 24:894-898.
- Murphy BR, Olmsted RA, Collins PL, Chanock RM, Prince GA. 1988. Passive transfer of respiratory syncytial virus (RSV) antiserum suppresses the immune response to the RSV fusion (F) and large (G) glycoproteins expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol*; 62:3907-3910.

- Murphy D, Todd JK, Chao RK, Orr I, McIntosh K. 1981. The use of gowns and masks to control respiratory illness in pediatric hospital personnel. *J Pediatr*; 99:746-750.
- Murry AR, Dowell SF. 1997. Respiratory syncytial virus: Not just for kids. *Hosp Pract*; 32:87-88, 91-84, 98 passim.
- Nagai K, Kamasaki H, Kuroiwa Y, Okita L, Tsutsumi H. 2004. Nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus subgroup B variants with the 60 nucleotides-duplicated G protein gene. *J Med Virol*; 74: 161-165.
- Navas L, Wang E, de Carvalho V, Robinson J. 1992. Improved outcome of respiratory syncytial virus infection in a high-risk hospitalized population of Canadian children: Pediatric Investigative Collaborative Network on Infections in Canada. *J Pediatr*; 121:348-354.
- Nei and Kumar. 2000. Population Trees from Genetics Markers in Nei and Kumar editors. *Molecular Evolution and phylogenetics*. Oxford University Press; 265-289.
- Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki TM. 2009. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*; 360:2605-2615.
- Nowak P, Karlsson AC, Naver L, Bohlin AB, Piasek A, Sönnerborg A. 2002. The selection and evolution of viral quasispecies in HIV-1 infected children. *HIV Med*; 3:1-11.
- Olmsted RA, Elango N, Prince G, Murphy BR, Johnson PR, Moss B, Chanock RM, Collins PL. 1986. Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contribution of the F and G glycoproteins to host immunity. *PNAS*; 83:7462-7466.
- Openshaw PJ, Culley FJ, Olszewska W. 2001. Immunopathogenesis of vaccine-enhanced RSV disease. *Vaccine*; 20:S27-S31.
- Openshaw PJM, Tregoning JS. 2005. Immune Responses and Disease Enhancement during Respiratory Syncytial Virus Infection. *Clin Microbiol Rev*; 18: 541-555.
- Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*; 265:218-225.
- Palomo C, Cane PA, Melero JA. 2000. Evaluation of the antibody specificities of human convalescent-phase sera against the attachment (G) protein of human respiratory syncytial virus: influence of strain variation and carbohydrate side chains. *J Med Virol*; 60:468-474.
- Palomo C, García-Barreno B, Peñas C, Melero JA. 1991. The G protein of human respiratory syncytial virus: significance of carbohydrate side-chains and the C-terminal end to its antigenicity. *J Gen Virol*; 72:669-675.

- Parveen S, Broor S, Kapoor SK, Fowler K, Sullender WM. 2006. Genetic diversity among respiratory syncytial viruses that have caused repeated infections in children from rural India. *J Med Virol*; 78:659-665.
- Peret TC, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, Tsou C, Anderson LJ. 2000. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect Dis*; 181:1891-1896.
- Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. 1998. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol*; 79:2221-2229.
- Perez M, Garcia-Barreno B, Melero JA, Carrasco L, Guinea R. 1997. Membrane permeability changes induced in *Escherichia coli* by the SH protein of human respiratory syncytial virus. *Virology*; 235:342-351.
- Plotnicky H, Siegrist CA, Aubry JP, Bonnefroy JY, Corvaia N, Nguyen TN, Power UF. 2003. Enhanced pulmonary immunopathology following neonatal priming with formalin-inactivated respiratory syncytial virus but not with the BBG2NA vaccine candidate. *Vaccine*; 21:2651-2660.
- Posada D, Crandall KA. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*; 14: 817-818.
- Posada D, Crandall KA. 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *PNAS*; 98:13757-13762.
- Posada D. 2006. ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Res*; 34: W700-W703.
- Proctor DF. 1982. The mucocilliary system. In: Proctor DF, Andersen I, eds. *The nose. Upper airways physiology and the atmospheric environment*. Amsterdam: Elsevier; 245-278.
- Rajala MS, Sullender WM, Prasad AK, Dar L, Broor S. 2003. Genetic variability among Group A and B respiratory syncytial virus isolates from a large referral hospital in New Delhi, India. *J Clin Microbiol*; 41: 2311-2316.
- Ramaswamy M, Shi L, Varga SM, Barik S, Behlke MA, Look DC. 2006. Respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 specifically inhibits type I interferon signal transduction. *Virology*; 344:328-339.
- Rechsteiner J, Winkler KC. 1969. Inactivation of respiratory syncytial virus in aerosol. *J Gen Virol*; 5:405-410.
- Reese PE, Marchette NJ. 1991. Respiratory Syncytial Virus infection and prevalence of subgroup A and B in Hawaii. *J Clin Microbiol*; 29:2614-2615.
- Reiche J, Schweiger B. 2009. Genetic variability of group A human respiratory syncytial virus strains circulating in Germany from 1998 to 2007. *J Clin Microbiol*; 47:1800-1810.

- Roberts ShR, Compans RW, Wertz GW. 1995. Respiratory Syncytial Virus Matures at the Apical Surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol*; 69:2667-2673.
- Roberts SR, Lichtenstein D, Ball LA, Wertz GW. 1994. The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J Virol*; 68:4538-4546.
- Roca A, Loscertales MP, Quintó L, Pérez-Breña P, Vaz N, Alonso PL, Saiz JC. 2001. Genetic variability among group A and B respiratory syncytial viruses in Mozambique: identification of a new cluster of group B isolates. *J Gen Virol*; 82:103-111.
- Rodriguez WJ. 1999. Management strategies for respiratory syncytial virus infections in infants. *J Pediatr*; 135:45-50.
- Román M, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendaño LF, Simon V, Escobar AM, Gaggero A, Díaz PV. 1997. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. *Am J Respir Crit Care Med*; 156:190-195.
- Rota PA, Hemphill ML, Whistler T, Regnery HL, Kendal AP. 1992. Antigenic and genetic characterization of the haemagglutinins of recent cocirculating strains of influenza B virus. *J Gen Virol*; 73:2737-2742.
- Rozas J, Sanchez-Del Barrio JC, Messegger X, Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*; 19:2496-2497.
- Rueda P, Delgado T, Portela A, Melero JA, Garcia-Barreno B. 1991. Premature stop codons in the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses resistant to neutralization by monoclonal antibodies. *J Virol*; 65: 3374-3378.
- Rueda P, Palomo C, Garcia-Barreno B, Melero JA. 1995. The three C-terminal residues of human respiratory syncytial virus G glycoprotein (Long strain) are essential for integrity of multiple epitopes distinguishable by antiidiotypic antibodies. *Viral Immunol*; 8: 37-46.
- Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE. 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by Bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 11:1423-1425.
- Salud en las Américas 2007: Vol II - Argentina. Autor: Organización Panamericana de la Salud. Washington, US; 2007.
- Sambrook J, Russell D. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual 3er ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Satakem M, Coligan JE, Elango N, Norrby E, Venkatesan S. 1985. Respiratory syncytial virus envelope glycoprotein (G) has a novel structure. *Nucleic Acids Research*; 13: 7795-7812.
- Sato M, Saito R, Sakai T, Sano Y, Nishikawa M, Sasaki A, Shobugawa Y, Gejyo F, Suzuki H. 2005. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *J Clin Microbiol*; 43:36-40.

- Schlender J, Zimmer G, Herrler G, Conzelmann KK. 2003. Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Protein Subunit F2, Not Attachment Protein G, Determines the Specificity of RSV Infection. *J Virol*; 77:4609-4616.
- Schmidt AC, Johnson TR, Openshaw PJ, Braciale TJ, Falsey AR, Anderson LJ, Wertz GW, Groothuis JR, Prince GA, Melero JA, Graham BS. 2004. Respiratory syncytial virus and other pneumoviruses: a review of the international symposium-RSV 2003. *Virus Res*; 106:1-13.
- Schmidt AC, Wenzke DR, McAuliffe JM, St Claire M, Elkins WR, Murphy BR, Collins PL. 2002. Mucosal immunization of rhesus monkeys against respiratory syncytial virus subgroups A and B and human parainfluenza virus type 3 by using a live cDNA-derived vaccine based on a host range-attenuated bovine parainfluenza virus type 3 vector backbone. *J Virol*; 76:1089-1099.
- Scott PD, Ochola R, Ngama M, Okiro EA, Nokes DJ, Medley GF, Cane PA. 2004. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. *J Med Virol*; 74:344-354.
- Scott PD, Ochola R, Ngama M, Okiro EA, James Nokes D, Medley GF, Cane PA. 2006. Molecular analysis of respiratory syncytial virus reinfections in infants from coastal Kenya. *J Infect Dis*; 193:59-67.
- Shek LP, Lee BW. 2003. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. Review. *Paediatr Respir Rev*; 4:105-11.
- Simard C, Nadon F, Seguin C, Trudel M. 1995. Evidence that the amino acid region 124–203 of glycoprotein G from the respiratory syncytial virus (RSV) constitutes a major part of the polypeptide domain that is involved in the protection against RSV infection. *Antivir Res*; 28: 303-315.
- Slack MS, Easton AJ. 1998. Characterization of the interaction of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleocapsid protein using the two-hybrid system. *Virus Res*; 55:167-176.
- Spann KM, Collins PL, Teng MN. 2003. Genetic Recombination during Coinfection of Two Mutants of Human Respiratory Syncytial Virus. *J Virol*; 77: 11201-11211.
- Spann KM, Tran KC, Collins PL. 2005. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF- κ B, and proinflammatory cytokines. *J Virol*; 79: 5353-5362.
- Srinivasakumar N, Ogra PL, Flanagan TD. 1991. Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. *J Virol*; 65:4063-4069.

- Stark JM, Khan AM, Chiappetta CL, Xue H, Alcorn JL, Colasurdo GN. 2005. Immune and functional role of nitric oxide in a mouse model of respiratory syncytial virus infection. *J Infect Dis*; 191:387-395.
- Stec DS, Hill MG, Collins PL. 1991. Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology*; 183:273-287.
- Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, Wright AL, Martinez FD. 1999. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet*; 354: 541-545.
- Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. 1998. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol*; 36:2990-2995.
- Straliotto SM, Nestor SM, Siqueira MM. 2001. Respiratory Syncytial Virus Groups A and B in Porto Alegre, Brazil, from 1990 to 1995 and 1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*; 96: 155-158.
- Straliotto SM, Siqueira MM, Muller RL, Fischer GB, Cunha ML, Nestor SM. 2002. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*; 35:283-291.
- Sullender WM, Mufson MA, Prince GA, Anderson LJ, Wertz GW. 1998. Antigenic and genetic diversity among the attachment proteins of group A respiratory syncytial viruses that have caused repeat infections in children. *J Infect Dis*; 178:925-932.
- Sullender WM, Sun L, Anderson LJ. 1993. Analysis of respiratory syncytial virus genetic variability with amplified cDNAs. *J Clin Microbiol*; 31:1224-1231.
- Sullender WM. 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev*; 13: 1-15.
- Swofford DL. PAUP*. 2003. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sunderland, MA: Sinauer Associates; (Version 4.0b10).
- Tal G, Mandelberg A, Dalal I, Cesar K, Somekh E, Tal A, Oron A, Itskovich S, Ballin A, Hourii S, Beigelman A, Lider O, Rechavi G, Amariglio N. 2004. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis*; 189:2057-2063.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*; 24:1596-1599.
- Tang LF, Wang TL, Tang HF, Chen ZM. 2008. Viral pathogens of acute lower respiratory tract infection in China. *Indian Pediatr*; 45: 971-975.

- Tavaré S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. In: Some mathematical questions in biology - DNA sequence analysis (ed. Miura RM), pp. 57-86. Amer. Math.Soc., Providence, RI.
- Techaarpornkul S, Barretto N, Peeples ME. 2001. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J Virol*; 75:6825- 6834.
- Teng MN, Collins PL. 1998. Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J Virol*; 72:5707-5716.
- Teng MN, Collins PL. 1999. Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein. *J Virol*; 73:466.
- Teng MN, Collins PL. 2002. The central conserved cystine noose of the attachment G protein of human respiratory syncytial virus is not required for efficient viral infection in vitro or in vivo. *J Virol*; 76:6164-6171.
- Teng MN, Whitehead SS, Bermingham A, St Claire M, Elkins WR, Murphy BR, Collins PL. 2000. Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. *J Virol*; 74:9317-9321.
- Torres HA, Aguilera EA, Mattiuzzi GN, Cabanillas ME, Rohatgi N, Sepulveda CA, Kantarjian HM, Jiang Y, Safdar A, Raad II, Chemaly RF. 2007. Characteristics and outcome of respiratory syncytial virus infection in patients with leukemia. *Haematologica*; 92:1216-1223.
- Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, García-Barreno B, Melero JA, Palomo C. 2003. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J Gen Virol*; 84:3115-3120.
- Tripp RA. 2004. The brume surrounding respiratory syncytial virus persistence. *Am J Respir Crit Care Med*; 169:778-779.
- van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*; 7:719-724.
- Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. 2001. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *J Gen Virol*; 82:2117-2124.
- Videla C, Carballal G, Misirlian A, Aguilar M. 1998. Acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus and adenovirus among hospitalised children from Argentina. *Clin Diagn Virol*; 10:17-23.

- Viegas M, Barrero PR, Maffey AF, Mistchenko AS. 2004. Respiratory virus seasonality in children under five years of age in Buenos Aires, Argentina: a five-year analysis. *J Infect*; 49:222-228.
- Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature*; 439:344-348.
- Waris M, Meurman O, Mufson MA, Ruuskanen O, Halonen P. 1992. Shedding of infectious virus and virus antigen during acute infection with respiratory syncytial virus. *J Med Virol*; 38:111-116.
- Watanabe M, Nakagomi T, Koshimura Y, Nakagomi O. 2001. Direct evidence for genome segment reassortment between concurrently-circulating human rotavirus strains. *Arch Virol*; 146: 557-570.
- Wathen MW, Aeed PA, Elhammer AP. 1991. Characterization of oligosaccharide structures on a chimeric respiratory syncytial virus protein expressed in insect cell line Sf9. *Biochemistry*; 30:2863-2868.
- Weissenbacher M, Carballal G, Avila M, Salomón H, Harisiadi J, Catalano M, Cerqueiro MC, Murtagh P. 1990. Etiologic and clinical evaluation of acute lower respiratory tract infections in young Argentinean children: an overview. *Rev Infect Dis*; 12:S889-S898.
- Welliver R. 2000. Immune response. In: Weisman LE, Groothuis JR, editors. Contemporary diagnosis and management of respiratory syncytial virus. *Handbooks in Health Care*. Newtown, PA. 94-121.
- Wertz GW, Collins PL, Huang Y, Gruber C, Levine S, Ball AL. 1985. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *PNAS*; 82: 4075-4079.
- Wertz GW, Krieger M, Ball LA. 1989. Structure and cell surface maturation of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O glycosylation. *J Virol*; 63:4767-4776.
- Wertz GW, Moudy RM. 2004. Antigenic and genetic variation in human respiratory syncytial virus. Review. *Pediatr Infect Dis J*; 23(Suppl 1):S19-24.
- Woelk CH, Holmes EC. 2001. Variable immune-drive natural selection in the attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus (RSV). *J Mol Evol*; 52: 182-192.
- Wolf DG, Greenberg D, Kalkstein D, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Saleh N, Goldberg MD, Dagan R. 2006. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children. *Pediatr Infect Dis J*; 25:320-324.

- Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY. 2009. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med*; 234: 1117-1127.
- World Health Organization. 2000. Weekly Epidemiological Record, 75 (41).
- World Health Organization. 2001. Weekly Epidemiological Record, 76 (40).
- Worobey M, Holmes EC. 1999. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol*; 80: 2535-2543.
- Wright PF, Karron RA, Belshe RB, Thompson J, Crowe JE Jr, Boyce TG, Halburnt LL, Reed GW, Whitehead SS, Anderson EL, Wittek AE, Casey R, Eichelberger M, Thumar B, Randolph VB, Udem SA, Chanock RM, Murphy BR. 2000. Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy. *J Infect Dis*; 182:1331-1342.
- Wu H, Pfarr DS, Tang Y, An LL, Patel NK, Watkins JD, Huse WD, Kiener PA, Young JF. 2005. Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: Effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization. *J Mol Biol*; 350:126-144.
- Yamashita M, Cristal M, Fitch WM, Palese P. 1988. Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology*; 163:112-122.
- Zhang L, Peeples ME, Boucher RC, Collins PL, Pickles RJ. 2002. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J Virol*; 76:5654-5666.
- Zhang M, Gaschen B, Blay W, Foley B, Haigwood N, Kuiken C, Korber B. 2004. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology*; 14:1229-1246.
- Zhang Y, Xu W, Shen K, Xie Z, Sun L, Lu Q, Liu C, Liang G, Beeler JA, Anderson LJ. 2007. Genetic variability of group A and B human respiratory syncytial viruses isolated from 3 provinces in China. *Arch Virol*; 152:1425-1434.
- Zhao X, Chen FP, Sullender WM. 2004. Respiratory syncytial virus escape mutant derived in vitro resists palivizumab prophylaxis in cotton rats. *Virology*; 318:608-612.
- Zhao X, Singh M, Malashkevich VN, Kim PS. 2000. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *PNAS*; 97: 14172-14177.
- Zhao X, Sullender WM. 2005. In vivo selection of respiratory syncytial viruses resistant to palivizumab. *J Virol*; 79:3962-3968.
- Zlateva KT, Lemey P, Moës E, Vandamme AM, Van Ranst M. 2005. Genetic Variability and Molecular Evolution of the Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup B Attachment G Protein. *J Virol*; 79:9157-9167.

- Zlateva KT, Lemey P, Vandamme AM, Van Ranst M. 2004. Molecular evolution and circulation patterns of human respiratory syncytial virus subgroup a: positively selected sites in the attachment g glycoprotein. *J Virol*; 78:4675-4683.
- Zlateva KT, Vijgen L, Dekeersmaeker N, Naranjo C, Van Ranst M. 2007. Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. *J Clin Microbiol*; 45:3022-3030.

8- APÉNDICES

Apéndice 1

A continuación se listan los cebadores utilizados en este trabajo de Tesis. Los mismos se encuentran representados en sentido 5' → 3'.

Subtipificación de HRSV (Stockton et al, 1998):

RSVAB F GTCTTACAGCCGTGATTAGG	}	1° ronda
RSVAB F GTCTTACAGCCGTGATTAGG		
RSVA F GATGTTACGGTGGGGAGTCT	}	2° ronda
RSVA R GTACACTGTAGTTAATCACA		
RSVB F AATGCTAAGATGGGGAGTTC		
RSVB R GAAATTGAGTTAATGACAGC		

Condiciones de RT-PCR seleccionadas luego de la puesta a punto descrita en el punto 3.3.2 de Materiales y Métodos:

Concentración de MgCl₂ seleccionada: 3,5 mM

Temperaturas de hibridación de los cebadores seleccionadas para ambas rondas de PCR:

1° ronda: 63,8 °C

2° ronda: 65 °C

Amplificación y secuenciación de la glucoproteína G (Sullender et al, 1993; Peret et al, 1998; Melero et al, 1997):

HRSV subtipo A:

G10 GCAAACATGTCCAAAAACAA

F1 CAACTCCATTGTTATTTGCC

G267 GATGCAACAAGCCAGATCAAG

HRSV subtipo B:

F164 GTTATGACACTGGTATACCAACC

OG₁₋₂₁ GGGGCAAATGCAACCATGTCC

OGCH₄₉₆₊ GATGATTACCATTTTGAAGTGTTCA

CH253 GGTTTTTTATTGTTTGAAC

Secuenciación de clones:

M13*Forward* (-20) GTAAAACGACGGCCAGTG

M13*Reverse* (-27) GGAAACAGCTATGACCATG

Apéndice 2

Secuencias de la glucoproteína G del HRSV subtipo A determinadas en este trabajo de Tesis, las mismas se encuentran listadas en formato fasta:

```
>RSVARG2251497
ATCAGCTTCTCCAATCTGTCCGAAACTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTCAACAACACCAAGTGTGAGTCAACCCCAAT
CCACAACAGTCAAGACCAAAAACACAACAACCAACCAATACAACCTAGCAAGCCACCACAAAACAACGCCAAAACAAACCACAAA
CAAACCCAATAATGATTTTCACTTTGAAAGTGTTCACCTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACAATCCAACCTTGTGGGCTATCTGC
AAAAGAATACCAAAACAAAAACCTGGAAAGAAAACCACCACCAAGCCCAAGAAAACCAACCATCAAGACAACCAAAAAAGATCTCA
AACCTCAAACCACAAAACCAAGGAAGTACTTACCACCAGGCCACAGAAAAGCCAAACCATCAACACCACAAAACAACATCAGAAC
TACACTGCTCACCTCCAACACCACAGGAAATCCAGAACACACAAGTCAAAGGAAACTCTCCACTCAACCACCTCCGAAGGCAATCCA
AGCCCTTCACAAGTCTATACAACATCCGAGTACCTATCACAATCTCTATCTCCATCCAACACAACA
>RSVARG2251897
ATCAGCTTCTCCAATCTGTCCAAAACCTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTCAACAACACCAAGTGTGAGTCAACCCCAAT
CCACAACAGTCAAGACCAAAAACACAACAACCAACCAATACAACCTAGCAAGCCACCACAAAACAACGCCAAAACAAACCACAAA
CAAACCCAATAATGATTTTCACTTTGAAAGTGTTCACCTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACAATCCAACCTTGTGGGCTATCTGC
AAAAGAATACCAAAACAAAAACCTGGAAAGAAAACCACCACCAAGCCCAAGAAAACCAACCATCAAGACAACCAAAAAAGATCTCA
AACCTCAAACCACAAAACCAAGGAAGTACTTACCACCAGGCCACAGAAAAGCCAAACCATCAACACCACAAAACAACATCAGAAC
TACACTGCTCACCTCCAACACCACAGGAAATCCAGAACACACAAGTCAAAGGAAACTCTCCACTCAACCACCTCCGAAGGCAATCCA
AGCCCTTCACAAGTCTATACAACATCCGAGTACCTATCACAATCTCTATCTCCATCCAACACAACA
>RSVARG2284397
ATCAGCTTCTCCAATCTGTCCGAAACTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTCAACAACACCAAGTGTGAGTCAACCCCAAT
CCACAACAGTCAAGACCAAAAACACAACAACCAACCAATACAACCTAGCAAGCCACCACAAAACAACGCCAAAACAAACCACAAA
CAAACCCAATAATGATTTTCACTTTGAAAGTGTTCACCTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACAATCCAACCTTGTGGGCTATCTGC
AAAAGAATACCAAAACAAAAACCTGGAAAGAAAACCACCACCAAGCCCAAGAAAACCAACCATCAAGACAACCAAAAAAGATCTCA
AACCTCAAACCACAAAACCAAGGAAGTACTTACCACCAGGCCACAGAAAAGCCAAACCATCAACACCACAAAACAACATCAGAAC
TACACTGCTCACCTCCAACACCACAGGAAATCCAGAACACACAAGTCAAAGGAAACTCTCCACTCAACCACCTCCGAAGGCAATCCA
AGCCCTTCACAAGTCTATACAACATCCGAGTACCTATCACAATCTCTATCTCCATCCAACACAACA
>RSVARG2251697
ATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGGAACCTATATCACAAACCACCGCCATACTAGCTTTAACAACACCAAGTGTGAGTCAATCTGCAAT
CTACAACAGTCAAGACCAAAAACACAACAACCAACCAATACAACCTAGCAAGCCACCACAAAACAACGCCAAAACAAACCACAAA
CAAACCCAATGATGATTTTCACTTTGAAAGTGTTCACCTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACAATCCAACCTTGTGGGCTATCTGC
AAAAGAATACCAAAACAAAAACCTGGAAAGAAAACCACCACCAAGCCCAAGAAAACCAACCATCAAGACAACCAAAAAAGATCTCA
AACCTCAAACCACAAAACCAAGGAAGTACTTACCACCAGGCCACAGAAAAGCCAAACCATCAACACCACAAAACAACATCAGAAC
TACACTGCTCACCTCCAACACCACAGGAAATCCAGAACACACAAGTCAAAGGAAACTCTCCACTCAACCACCTCCGAAGGCAATACA
AGCCCTTCACAAGTCTATACAACATCTGAGTACCTATCACAACCTCCATCTCCATCCAACATAACA
>RSVARG34799
ATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGGAACCTATATCACAAACCACCGCCATACTAGCTTTAACAACACCAAGTGTGAGTCAATCTGCAAT
CTACAACAGTCAAGACCAAAAACACAACAACCAACCAATACAACCTAGCAAGCCACCACAAAACAACGCCAAAACAAACCACAAA
CAAACCCAATGATGATTTTCACTTTGAAAGTGTTCACCTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACAATCCAACCTTGTGGGCTATCTGC
AAAAGAATACCAAGCAAAAACCTGGAAAGAAAACCACCACCAAGCCCAAGAAAACCAACCATCAAGACAACCAAAAAAGATCTCA
AACCTCAAACCACAAAACCAAGGAAGTACTTACCACCAGGCCACAGATAAGCCAAACCATCAACATCACCAACCAAAACATCAGAAC
TACACTGCTCACCAACAGTACCACAGGAAATCCAGAACACACAAGTCAAAGGAAACTCTCCACTCAACCCTCTCTGAAGGCAATACA
AGCCCTTCACAAGTCTATACAACATCTGAGTACCTATCACAACCTCCATCTCCATCCAACATAACA
>RSVARG50599
ATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGGAACCTATATCACAAACCACCGCCATACTAGCTTTAACAACACCAAGTGTGAGTCAACCCCAAT
CCACAACAGTCAAGATCAAAAACACAACAACCAACCAATACAACCTAGCAACCCACCACAAAACAACGCCAAAACAAACCACAAA
CAAACCCAATAATGATTTTCACTTTGAAAGTGTTCACCTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACAATCCAACCTTGTGGGCTATCTGC
AAAAGAATACCAAAACAAAAACCTGGAAAGAAAACCACCACCAAGCCCAAGAAAACCAACCATCAAGACAACCAAAAAAGATCTCA
AACCTCAAACCACAAAACCAAGGAAGTACTTACCACCAGGCCACAGATAAGCCAAACCATCAACATCACCAACCAAAACATCAGAAC
TACACTGCTCACCAACATTAACCACAGGAAATCCAGAACACACAAGTCAAAGGAAACTCTCCACTCAACCCTCTCCGAAGGCAATACA
AGCCCTTCACAAGTCTATACAACATCCGAGTACCTATCACAACCTCCATCTCCATCCAACATAACA
>RSVARG132499
ATCAGCTTCTCCAATCTGACCGAAACTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTCAACAACACCAAGTGTGAGTCAACCCCAAT
CCACAACAGTCAAGACCAAAAATACAACAACCAACCAATACAACCTAGCAAGCCACCACAAAACAACGCCAAAATAACCACAAA
CAAACCTAATAATGATTTTCACTTTGAAAGTGTTCACCTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACAATCCAACCTTGTGGGCTATCTGC
AAAAGAATACCAAAACAAAAACCTGGAAAGAAAACCACCACCAAGCCCAAGAAAACCAACCATCAAGACAACCAAAAAAGATCTCA
AACCTCAAACCACAAAACCAAGGAAGTACTTACCACCAGGCCACAGATAAGCCAAACCATCAACATCACCAACCAAAACATCAGAAC
TACACTGCTCACCTCCAACACCACAGGAAATCCAGAACACACAAGTCAAAGGAAACTCTCCACTCAACCCTCTCCGAAGGCAATCTA
AGCCCTTCACAAGTCTATACAACATCCGAGTACCTATCACAATCTCTATCTCCATCCAACATAACA
>RSVARG143299
ATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGGAACCTATATCACAAACCACCGCCATACTAGCTTTAACAACACCAAGTGTGAGTCAATCTGCAAT
CTACAACAGTCAAGACCAAAAACACAACAACCAACCAATACAACCTAGCAAGCCACCACAAAACAACGCCAAAACAAACCACAAA
CAAACCCAATGATGATTTTCACTTTGAAAGTGTTCACCTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACAATCCAACCTTGTGGGCTATCTGC
AAAAGAATACCAAGCAAAAACCTGGAAAGAAAACCACCACCAAGCCCAAGAAAACCAACCATCAAGACAACCAAAAAAGATCTCA
AACCTCAAACCACAAAACCAAGGAAGTACTTACCACCAGGCCACAGATAAGCCAAACCATCAACATCACCAACCAAAACATCAGAAC
TACACTGCTCACCTCCAACACCACAGGAAATCCAGAACACACAAGTCAAAGGAAACTCTCCACTCAACCCTCTCCGAAGGCAATCTA
AGCCCTTCACAAGTCTATACAACATCCGAGTACCTATCACAATCTCTATCTCCATCCAACATAACA
>RSVARG145299
ATCAGCTTCTCCAATCTGTCCGAAACAATATCACAAACCACCACCATACTAGCTTCAACAACACCAAGTGTGAGTCAACCCCAAT
CCACAACAGTCAAGACCAAAAATACAACAACCAACCAATACAACCTAGCAAGCCACCACAAAACAACGCCAAAATAACCACAAA
CAAACCCAATAATGATTTTCACTTTGAAAGTGTTCACCTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACAATCCAACCTTGTGGGCTATCTGC
AAAAGAATACCAAAACAAAAACCTGGAAAGAAAACCACCACCAAGCCCAAGAAAACCAACCATCAAGACAACCAAAAAAGATCTCA
AACCTCAAACCACAAAACCAAGGAAGTACTTACCACCAGGCCACAGATAAGCCAAACCATCAACATCACCAACCAAAACATCAGAAC
TACACTGCTCACCAACAGTACCACAGGAAATCCAGAACACACAAGTCAAAGGAAACTCTCCACTCAACCCTCTCCGAAGGCAACACA
AGCCCTTCACAAGTCTATACAACATCCGAGTACCTATCACAATCTCTATCTCCATCCAACATAACA
```


ATCAGCTTCTCAATCTGTCCGAAACTACATCACAAACCACCACCATACTAGCCTCAACAACACCAAGTGTGAGTCAACCCACAAT
CCACAACAGTCAAGACCAAAAAACAACAACCAACCCAAATACAACCTAGCAAGTCCACCACAAAAACAACGCAAAAAACAACCCAAAA
CAAACCCAATAATGATTTTCACTTTGAAAGTGTTCAAATTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACCAATCCAACCTGCTGGGCATCTGC
AAAAGAATACCAAAACAAAAACCTGGAAAGAAAACCACCACCAAGCCCACAAAAAAACCAACCACCAAGACAACCAAAAAAGATCTCA
AACCTCAAACCAAAAACTAAAGGAAGTACCTACCACCAAGCCCACAGAAAAGCAAAACCAATCAACACCACCAAAAAACAACATCAGAAC
TACTGCTCACCTCCAACACCACAGAAAATCCAGAACACACAAGTCAAAGGAAAACCTCCACTCAACCACCTCCGAAGGCAATCCA
AGCCCTTCACAAGTCTATACAACATCCGAGTACCTATCACAATCTCTATCCATCCAACACAACA
>RSVARG10404
ATCAGCCTTCTCAATCTGTCCGAAACTACATCACAAACCATCACTATACTAGCTTCAACAACACCAAGTGTGAGTTAACCCACAAT
CCACAACAGTCAAGATCAAAAAACAACAACCAACCCAAATGCAACCTAGCAAAATCAACCACAAAAACAACGCAAAAAACAACCCAAAA
CAAACCCAATAATGATTTTCACTTTGAAAGTGTTCAAATTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACCAATCCAACCTGCTGGGCATCTGC
AAAAGAATACCAACAAAAACCTGGAAAGAAAACCACCACCAAGCCCACAAAAAAACCAACCATCAAGACAACCAAAAAAGATCCCA
AACCTCAAACCTACAAAACCAAGGAAGTACTACCACCAAGCCCACAGAAAAGCCAACCATCAACACCACCAAAAAACAACATCAGAAC
CACACTGCTCACCTCCAACACCACAGAAAATCCAGAACACACAAGTCAAAGGAAAACCTCCACTCAACCACCTCCGAAGGCAATCCT
AGCCCTTCACAAGTCTACACAACATCCGAGTACCTATCACAATCTCTATCTCCATCCAACACAACA
>RSVARG14504
ATCAGCTTCTCAATCTGTCTGGAACTATATCACAAACCACCGCCATACTAGCTCCAACAACACCAAGTGTGAGCCAATCCTGCAAT
CTACAACAGTCAAGACCAAAAAACAACAACCAACCCAAATACAACCCAGCAAGTCCACCACAAAAACAACGCAAAAAACAACCCAAAA
CAAACCCAATGATGATTTTCACTTTGAAAGTGTTCAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACCAATCCAACCTGCTGGGCATCTGC
AAAAGAATACCAAGCAAAAAACCTGGAAAGAAAACCACCACCAAGCCCACGAAAAACAACCAATCAAGACAACCAAAAAAGATCTCA
AACCTCTAACTACAAAACCAAGGAAGCCTACCACCAAGCCCACAGAAAAGCCAACCATCAACATCACCAAACCAACATCAGAAC
TACTGCTCACAACAGCACACAGGAAATCCAGAACACACAAGTCAAAGGAAAACCTCCACTCAACCTCCCGAAGGCAATACA
AGCCCTTCACAATCTACACAACATCCGAGTACCTATCACAACCTCCATCTCCATCCAACATAGCA
>RSVARG116004
ATCAGCTTCTCAATCTGTCCGAAACTACATCACAAACCATTACCATACTAGCTTCAACAACACCAAGTGTGAGTCGACCCACAAT
CCACAACAGTCAAGATCAAAAAACAACAACCAACCCAAACGCAACCTAGCAACCCACCACAAAAACAACGCAAAAAACAACCCAAAA
CAAACCCAATAATGATTTTCACTTTGAAAGTGTTCAAATTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACCAATCCAACCTGCTGGGCATCTGC
AAAAGAATACCAAAACAAAAACCTGGAAAGAAAACCACCACCAAGCCCACAAAAAAACCAACCATCAAGACAACCAAAAAAGATCCCA
AACCCCAACCAAAAAACCAAGGAAGTACACACCACCAAGCCCACAGAAAAGCCAACCATCAACACCACCAAAAAACAACATCAAAAC
TACTGCTCACCTCCAACACCACAGGAAATCCAGAAAACAAGTCAAAGGAAAACCTCCACTCAACTACTCCCGAAGGCAATCCA
AGCCCTTCACAAGTCTATACAACATCCGAGTACCTATCACAATCTCTATCTCCATCCAACACAACA
>RSVARG203504
ATCAGCTTCTCAATCTGTCTGGAACTATATTACAAACCACCGCCATACTAGCTCCAACAACACCAAGTGTGAGCCAATCCTGCAAT
CTACAACAGTCAAGACCAAAAAACAACAACCAACCCAAATACAACCCAGCAAGTCCACCACAAAAACAACGCAAAAAACAACCCAAAA
CAAACCCAATGATGATTTTCACTTTGAAAGTGTTCAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACCAATCCAACCTGCTGGGCATCTGC
AAAAGAATACCAAGCAAAAAACCTGGAAAGAAAACCACCACCAAGCCCACGAAAAACAACCAATTAAGACAACCAAAAAAGATCTCA
AACCTCAAACCTACAAAACCAAGGAAGCCTACCACCAAGCCCACAGAAAAGCCAACCATCAACATCACCAAACCAACATCAGAAC
TACTGCTCACAACAGTACCACAGGAAATCTAGAACACACAAGTCAAAGGAAAACCTCCACTCAACCTCCCGAAGGCAATACT
AGCCCTTCACAATCTATACAACATCCGAGTACCTATCACAACCTCCATCTCCATCCAACATAACA
>RSVARG252504
GTCAGCTTCTCAATCTGTCTGGAACTATATCACAAACCACCGCCATACTAGCTCCAACAACACCAAGTGTGAGCCAATCCTGCAAT
CTACAACAGTCAAGACCAAAAAACAACAACCAACCCAAATACAACCCAGCAAGTCCACCACAAAAACAACGCAAAAAACAACCCAAAA
CAAACCCAATGATGATTTTCACTTTGAAAGTGTTCAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAGCAACCAATCCAACCTGCTGGGCATCTGC
AAAAGAATACCAAGCAAAAAACCTGGAAAGAAAACCACCACCAAGCCCACGAAAAACAACCAATTAAGACAACCAAAAAAGATCTCA
AACCTCAAACCTACAAAACCAAGGAAGCCTACCACCAAGCCCACAGAAAAGCCAACCATCAACATCACCAAACCAACATCAGAAC
TACTGCTCACAACAGTACCACAGGAAATCTAGAACACACAAGTCAAAGGAAAACCTCCACTCAACCTCCCGAAGGCAATACT
AGCCCTTCACAATCTATACAACATCCGAGTACCTATCACAACCTCCATCTCCATCCAACATAACA

Secuencias de la glucoproteína G del HRSV subtipo B determinadas en este trabajo de Tesis, las mismas se encuentran listadas en formato fasta:

```
>RSVBA80299
ATGTCCAAAAACAAGAAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTATAATTGCAGCCAT
AATATTCATCATCTCTGCCAACCACAAAGTTACTACTAACTGTGCAGTTCAAACAATAAAAAACCACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGTTAGCCCATCCAAACAACCCCAACCAACCACACCACCAATCCACAAAACCTCAGCCCAA
TATCACCCTAATACAAAATCAGAAAACACACCATAACAAGCACAACCAAAGGCAGAACCCACCCTCCAACACAGAACAAACAGCCAA
CACAAAACCACGTCCAAAAATCCACCAAAAAAACAAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAGAAAAAACCAACCATAAAACCCACAAAACAA
CACCCCAAAAAACCAAAAAGAGACCCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCACCATCAACCCAAACAAAAAAC
AACCCCAAGACCAGAAAAGAGACACCAGCACCTCACAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAGAAAAGAGACACC
AGCACCTCAAAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCCACCCCGAAAAA
CACCAACTCCACAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAAATCCACCCAAAAACTCTAG
>RSVBA132699
TGTGGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAGAAAAAACCAACCATAAAACCCACAAA
AACCCACCCCAAAAAACCAAAAAGAGACCCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCACCATCAACCCAAACAACACC
TCACAAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAGAAAAGAGACACCAGCACCTCACAATCCACTGTGCTCGACACAAC
CATCAAAAACACAAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCCACCCCGAAAAACACCCCAACTCCACACAACCCACAGCATCCGA
GCCCTCCACATCAAAATCCACCCAAAAACTCTAGTCAATATGCTTAGTTATT
>RSVBA137099
ATGTCCAAAAACAAGAAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTATAATTGCAGCCAT
AATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTACTACTAACTGTGCAGTTCAAACAATAAAAAACCACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGTTAGCCCATCCAAACAACCCCAACCAACCACACCACCAATCCACAAAACCTCAGCCCAA
TATCACCCTAATACAAAATCAGAAAACACACCATAACAAGCACAACCAAAGGCAGAACCCACCCTCCAACACAGAACAAACAGCCAA
CACAAAACCACGTCCAAAAATCCACCAAAAAAACAAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAGAAAAAACCAACCATAAAACCCACAAAACAA
CACCCCAAAAAACCAAAAAGAGACCCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCACCATCAACCCAAACAAAAAAC
AACCCCAAGACCAGAAAAGAGACACCAGCACCTCACAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAGAAAAGAGACACC
AGCACCTCAAAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCCACCCCGAAAAA
CACCAACTCCACAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAAATCCACCCAAAAACTCTAG
>RSVBA144099
ATGTCCAAAAACAAGAAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTATAATTGCAGCCAT
AATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTACTACTAACTGTGCAGTTCAAACAATAAAAAACCACTGAAAAAACATCACA
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGTTAGCCCATCCAAACAACCCCAACCAACCACATCACAATCCACAAAACCTCAGCCCAA
TATCACCCTAATACAAAATCAGAAAACACACCATAACAAGCACAACCAAAGGCAGAACCCACCCTCCAACACAGAACAAACAGCCAA
CACAAAACCACGTCCAAAAATCCACCAAAAAAACAAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAGAAAAAACCAACCATAAAACCCACAAAACAA
CACCCCAAAAAACCAAAAAGAGACCCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCACCATCAACCCAAACAAAAAAC
AACCCCAAGACCAGAAAAGAGACACCAGCACCTCACAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAGAAAAGAGACACC
AGCACCTCAAAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCCACCCCGAAAAA
CACCAACTCCACAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAAATCCACCCAAAAACTCTAG
>RSVBA121402
ATGTCCAAAAACAAGAAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTATAATTGCAGCCAT
AATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTACTACTAACTGTGCAGTTCAAACAATAAAAAACCACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGTTAGCCCATCCAAACAACCCCAACCAACCACACCACCAATCCACAAAACCTCAGCCCAA
TATCACCCTAATACAAAATCAGAAAACACACCATAACAAGCACAACCAAAGGCAGAACCCACCCTCCAACACAGAACAAACAGCCAA
CACAAAACCACGTCCAAAAATCCACCAAAAAAACAAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAGAAAAAACCAACCATAAAACCCACAAAACAA
CACCCCAAAAAACCAAAAAGAGACCCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCACCATCAACCCAAACAAAAAAC
AACCCCAAGACCAGAAAAGAGACACCAGCACCTCACAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAGAAAAGAGACACC
AGCACCTCAAAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCCACCCCGAAAAA
CACCAACTCCACAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAAATCCACCCAAAAACTCTAG
>RSVBA127102
ATGTCCAAAAACAAGAAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTATAATTGCAGCCAT
AATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTACTACTAACTGTGCAGTTCAAACAATAAAAAACCACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGTTAGCCCATCCAAACAACCCCAACCAACCACACCACCAATCCACAAAACCTCAGCCCAA
TATCACCCTAATACAAAATCAGAAAACACACCATAACAAGCACAACCAAAGGCAGAACCCACCCTCCAACACAGAACAAACAGCCAA
CACAAAACCACGTCCAAAAATCCACCAAAAAAACAAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAGAAAAAACCAACCATAAAACCCACAAAACAA
CACCCCAAAAAACCAAAAAGAGACCCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCACCATCAACCCAAACAAAAAAC
AACCCCAAGACCAGAAAAGAGACACCAGCACCTCACAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAGAAAAGAGACACC
AGCACCTCAAAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCCACCCCGAAAAA
CACCAACTCCACAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAAATCCACCCAAAAACTCTAG
>RSVBA16402
ATGTCCAAAAACAAGAAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTATAATTGCAGCCAT
AATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTACTACTAACTGTGCAGTTCAAACAATAAAAAACCACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGTTAGCCCATCCAAACAACCCCAACCAACCACACCACCAATCCACAAAACCTCAGCCCAA
TATCACCCTAATACAAAATCAGAAAACACACCATAACAAGCACAACCAAAGGCAGAACCCACCCTCCAACACAGAACAAACAGCCAA
CACAAAACCACGTCCAAAAATCCACCAAAAAAACAAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
```


AGCACTTCAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACAAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAAACA
CACCCAACCTCCACAAAAACCCACAGAATCCGAGCCCTCCACATCAAATTCACCCAAAAAACTCTAG

>RSVBA120802

ATGTCCAAAAACAAGAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTATAATTGCAGCCAT
AATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTTACTACTAACAATGTCACAGTTCAAACAATAAAAAACCCACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGCTAGCCCATCCAACAACCCACAACCACACCACCAATCCACACTAATCTAGCCACAA
TATCACCCAAACAAAAATCAGAAAACACACCATAACAACAGCACAACCAAGGAGAACCCACTCCAACACAGAACAAACAGCCAAAG
CACAAAACCCAGTCCAAAAAATCCACCAAAAAAACAAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAGAAAAAACCAACCATAAAAACCCACAACAAAC
CACCCACCAAAACCAAAAAAGAGACCCAAAAACACTAGCCAAAAACACTGAAAAAAGAACCCACCATCAACCCAAACAAAAAAC
AACCCCAAGACACAGAAAGAGAGCTCAGCACCTCACAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACACAGAAAGAGACACC
AGCACTTCAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAAACA
CACCCAACCTCCACAAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAATTCACCCAAAAAACTCTAG

>RSVBA144502

TGTGGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAGAAAAAACCAACCATAAAAACCCACAACA
AACCCACCCAAAAACCAAAAAAGAGACTCAAAAACACTAGCCAAAAACACTGAAAAAAGAACCCACCATCAACCCAAACAAAAA
ACCAACCCCAAGACCAAAAAAGAGACACCAGCACCCCAATTCACCTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACACAGAAAGAGAC
ACCAGCACCTCACAATCCATTGTGCTAGACACAACCACATCAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAA
ACACACCAACTCCACAAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAATTCACCCAAAAAACTCTAGTATATGCTTAGTTATT
C

>RSVBA160602

ATGTCCAAAAACAAGAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTATAATTGCAGCCAT
AATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTTACTACTAACAATGTCACAGTTCAAACAATAAAAAACCCACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGCTAGCCCATCCAACAACCCACAACCACACCACCAATCCACACTAATCTAGCCACAA
TATCACCCAAACAAAAATCAGAAAACACACCATAACAACAGCACAACCAAGGAGAACCCACTCCAACACAGAACAAACAGCCAAAG
CACAAAACCCAGTCCAAAAAATCCACCAAAAAAACAAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAGAAAAAACCAACCATAAAAACCCACAACAAAC
CACCCACCAAAACCAAAAAAGAGACCCAAAAACACTAGCCAAAAACACTGAAAAAAGAACCCACCATCAACCCAAACAAAAAAC
AACCCCAAGACACAGAAAGAGAGCTCAGCACCTCACAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAAACA
CACCCAACCTCCACAAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAATTCACCCAAAAAACTCTAG

>RSVBA77002

ATGTCCAAAAACAAGAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTATAATTGCAGCCAT
AATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTTACTACTAACAATGTCACAGTTCAAACAATAAAAAACCCACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGCTAGCCCATCCAACAACCCACAACCACACCACCAATCCACACTAATCTAGCCACAA
TATCACCCAAACAAAAATCAGAAAACACACCATAACAACAGCACAACCAAGGAGAACCCACTCCAACACAGAACAAACAGCCAAAG
CACAAAACCCAGTCCAAAAAATCCACCAAAAAAACAAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAGAAAAAACCAACCATAAAAACCCACAACAAAC
CACCCACCAAAACCAAAAAAGAGACCCAAAAACACTAGCCAAAAACACTGAAAAAAGAACCCACCATCAACCCAAACAAAAAAC
AACCCCAAGACACAGAAAGAGACACCAGCACCTCACAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACACAGAAAGAGACACC
AGCACTTCAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAAACA
CACCCAACCTCCACAAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAATTCACCCAAAAAACTCTAG

>RSVBA116102

ATGTCCAAAAACAAGAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTATAATTGCAGCCAT
AATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTTACTACTAACAATGTCACAGTTCAAACAATAAAAAACCCACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCCAACAACCCACAACCACACCACCAATCCACACTAATCTAGCCACAA
TATCACCTAATCAAAAATCAGAAAACACACCATAACAACAGCACAACCAAGGAGAACCCACTCCAACACAGAACAAACAGCCAAAG
CACAAAACCCAGTCCAAAAAATCCACCAAAAAAACAAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAAACAATAAACCAAGAAAAAACCAACCATAAAAACCCACAACAAAC
CACCCACCAAAACCAAAAAAGAGACCCAAAAACACTAGCCAAAAACACTGAAAAAAGAACCCACCATCAACCCAAACAAAAAAC
ACCAACCCCAAGACCAAGAAAGAGACACCAGCACCTCACAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACACAGAAAGAGAC
ACCAGCACCCCAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAAACA
ACACACCAACTCCACAAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAATTCACCCAAAAAACTCTAG

>RSVBA49502

ATGTCCAAAAACAAGAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTATAATTGCAGCCAT
AATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTTACTACTAACAATGTCACAGTTCAAACAATAAAAAACCCACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCCAACAACCCACAACCACACCACCAATCCACACTAATCTAGCCACAA
TATCACCCAAATCAAAAATCAGAAAACACACCATAACAACAGCACAACCAAGGAGAACCCACTCCAACACAGAACAAACAGCCAAAG
CACAAAACCCATCCAAAAAATCCACCAAAAAAACAAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAGAAAAAACCAACCATAAAAACCCACAACAAAC
CACCCACCAAAACCAAAAAAGAGACCCAAAAACACTAGCCAAAAACACTGAAAAAAGAACCCACCATCAACCCAAACAAAAAAC
AACCCCAAGACACAGAAAGAGACACCAGTACCCCAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACACAGAAAGAGACACC
AGCACTTCAATCCATTGTGCTAGACACAACCACATCAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAAACA
CACCCAACCTCCACAAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAATTCACCCAAAAAACTCTAG

>RSVBA151802

ATGTCCAAAAAATAAGAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTATAATTGCAGCCAT
AATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTTACTACTAACAATGTCACAGTTCAAACAATAAAAAACCCACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCCAACAACCCACAACCACACCACCAATCCACACTAATCTAGCCACAA
TATCACCCAAATCAAAAATCAGAAAACACACCATAACAACAGCAGAACCAAGGAGAACCCACTCCAACACAGAACAAACAGCCAAAG

AGCACTTCAATTCATGTGTAGACACAACCACATCAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAAACA
CACCAACTCCACACAAAACCCACAGCATCCGAGCCTCCACATCAAATCCAACCAAAAACTCTAG
>RSVBA144102
ATGTCCAAAAAAGAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTATAATTGCGCCAT
AATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTACTAACAACGTGCACAGTTCAAACAATAAAAAACCACACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCCAACAACCCCAACCCACACCACCAATCCACACAACTCAGCCACAA
TATCACCAATAACAAATCAGAAACACACCATAACAACAGCAGCAACCAAGGAGAACCCACTCCAACACAGAAACCAAGCCAAAG
CACAAAACCACGTCCAAAAATCCACAAAAAACAAAAGATGATTACATTTTGAAGTGTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAGAAAAAACCAACCATAAAACCCACAAACAAAC
CACCCACAAAACCCACAAAAGAGACTCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCATCAACCAACAAAAAAAC
AACCCCAAGACCAAAAAGAGACACCAGCACCCCAATTCATGTGCTCGACACAACCACATCAAACACACAGAAAGAGACACC
AGCACTTCAATCCATGTGTAGACACAACCACATCAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAAACA
CACCAACTCCACACAAAACCCACAGCATCCGAGCCTCCACATCAAATCCAACCAAAAACTCTAG
>RSVBA482603
ATGTCCAAAAAAGAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCCGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTATAATTGCGCCAT
AATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTACTAACAACGTGCACAGTTCAAACAATAAAAAACCACACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCCAACAACCCCAACCCACACCACCAATCCACACAACTCAGCCACAA
TATCACCTAATAACAAATCAGAAACACACCATAACAACAGCAGCAACCAAGGAGAACCCACTCCAACACAGAAACCAAGCCAAAG
CACAAAACCACGTCCAAAAATCCACAAAATAAACAAAAGATGATTACATTTTGAAGTGTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAGAAAAAACCAACCATAAAACCCACAAACAAAC
CACCCACAAAACCCACAAAAGAGACCCAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCATCAACCAACAAAAAACT
AACCCCAAGACCAAGAGAGACACCAGCATCCCAATTCATGTGCTCGACACAACCACATCAAACACACAGAAAGAGACACC
AGCACTTCAATCCATGTGTAGACACAACCACATCAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAAACA
CACCAACTCCACACAAAACCCACAGCATCCGAGCCTCCACATCAAATCCAACCAAAAACTCTAG
>RSVBA502103
TGTGGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATCCAAGCAATAAACCAAGAAAAAACCAACCATAAAACCCACAAACA
AACCCACCAAAAACCCACAAAAGAGACTCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCATCAACCCCAACAAAAAA
ACCAACCCCAAGACCAAGAGAGACACCAGCACCCCAATTCATGTGCTCGACACAACCACATCAAACACACAGAAAGAGAC
ACACACCTTCAATCCATTTGTGTAGACACAACCACATCAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAA
ACACACCAACTCCACACAAAACCCACAGCATCCGAGCCTCCACATCAAATCCAACCAAAAACTCTAGTCATATGCTTAGTTATT
C
>RSVBA490903
TGTGGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATCCAAGCAATAAACCAAGAAAAAACCAACCATAAAACCCACAAACA
AACCCACCAAAAACCCACAAAAGAGACTCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCATCAACCCCAACAAAAAA
ACCAACCCCAAGACCAAGAGAGACACCAGCACCCCAATTCATGTGCTCGACACAACCACATCAAACACACAGAAAGAGAC
ACACACCTTCAATCCATTTGTGTAGACACAACCACATCAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAA
ACACACCAACTCCACACAAAACCCACAGCATCCGAGCCTCCACATCAAATCCAACCAAAAACTCTAGTCATATGCTTAGTTATT
C
>RSVBA485203
TGTGGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATCCAAGCAATAAACCAAGAAAAAACCAACCATAAAACCCACAAACA
AACCCACCAAAAACCCACAAAAGAGACTCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCATCAACCCCAACAAAAAA
ACCAACCCCAAGACCAAGAGAGACACCAGCACCCCAATTCATGTGCTCGACACAACCACATCAAACACACAGAAAGAGAC
ACACACCTTCAATCCATTTGTGTAGACACAACCACATCAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAA
ACACACCAACTCCACACAAAACCCACAGCATCCGAGCCTCCACATCAAATCCAACCAAAAACTCTAGTCATATGCTTAGTTATT
C
>RSVBA483003
TGTGGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATCCAAGCAATAAACCAAGAAAAAACCAACCATAAAACCCACAAACA
AACCCACCAAAAACCCACAAAAGAGACTCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCATCAACCCCAACAAAAAA
ACCAACCCCAAGACCAAGAGAGACACCAGCACCCCAATTCATGTGCTCGACACAACCACATCAAACACACAGAAAGAGAC
ACACACCTTCAATCCATTTGTGTAGACACAACCACATCAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAA
ACACACCAACTCCACACAAAACCCACAGCATCCGAGCCTCCACATCAAATCCAACCAAAAACTCTAGTCATATGCTTAGTTATT
C
>RSVBA482503
TGTGGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATCCAAGCAATAAACCAAGAAAAAACCAACCATAAAACCCACAAACA
AACCCACCAAAAACCCACAAAAGAGACTCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCATCAACCCCAACAAAAAA
ACCAACCCCAAGACCAAGAGAGACACCAGCACCCCAATTCATGTGCTCGACACAACCACATCAAACACACAGAAAGAGAC
ACACACCTTCAATCCATTTGTGTAGACACAACCACATCAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAA
ACACACCAACTCCACACAAAACCCACAGCATCCGAGCCTCCACATCAAATCCAACCAAAAACTCTAGTCATATGCTTAGTTATT
C
>RSVBA469303
TGTGGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATCCAAGCAATAAACCAAGAAAAAACCAACCATAAAACCCACAAACA
AACCCACCAAAAACCCACAAAAGAGACTCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCATCAACCCCAACAAAAAA
ACCAACCCCAAGACCAAGAGAGACACCAGCACCCCAATTCATGTGCTCGACACAACCACATCAAACACACAGAAAGAGAC
ACACACCTTCAATCCATTTGTGTAGACACAACCACATCAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAA
ACACACCAACTCCACACAAAACCCACAGCATCCGAGCCTCCACATCAAATCCAACCAAAAACTCTAGTCATATGCTTAGTTATT
C
>RSVBA497403
GGGGCAATGCAAAACATGTCCAAAAATAAGAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGACTCTTAATCATCTAATTG
TAATATCCTCTTGTTTATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCT
CATAATTGAGCCATAATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTACTAACAACGTGCACAGTTCAAACAATAAAAAACCACACT
GAGAAAAACATCACCCTTACTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCCAACAACCCCAACCCACCCCAATCCACA
CAAACTCAGCCCAATATCAACCAATACAAAACCGAAACACCATACAACAGCAGCAACCAAGGAGAACCCACTCCAACACA
GAACAACAGCCAGCACAACACCGTCCAAAAATCCACAAAAAACAAAAGATGATTACATTTTGAAGTGTCAACTTCGTT
CCCTGTAGTATATGTGGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATCCAAGCAATAAACCAAGAAAAAACCAACCATAA

AACCCACAAAACACCACCCACAAAACCCACAAAACAAAAGAGACTCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCACCATCAA
CCCAACAAAAAACCAACCCCAAGACCACAGAAAGAGACACCAGCACCCCAATTCAGTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACAC
ACAGAAAGAGACACCAGCACCTCACAATCCATTGTGCTAGACACACCACCTTCAAAAACACAAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAA
CCACCCCGAAAAACACACCCAACTCCACACAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAAATCCAACAAAAAATCTAGTCATA
TGCTTAGTTATTC
>RSVBA486203
GGGGCAATGCAAAACATGTCCAAAAACAAGATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTTG
TAATATCCTCTTGTTTATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCT
CATAATTCAGCCATAATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTCACACTAACCACTGTACAGTTCAAACAATAAAAAACCCACTGAG
GAGAAAAACATCACCCTTACTCTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCATCCAAAACAACCACACCACCCCAATCCACA
CAAATCAGCCACAATATCACCTAATACAAAATCAGAAACACACCATAACAACAGCACAACCAAAGGCAGAACCCACTCCAACACA
GAACAAACAAGCCAAAGCACAACCCACGCTCTAAAAATCCCAAAATAAACCAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTCAACTTCGTT
CCCTGTAGTATATGTGGCAACAATCAACTCTGCAATCCATTTGCAAAAACAATACCAACAATAAACCAAAGAAAAACCAACACAA
AACCCACAAACAAACCCCAACAAAACCAAAACAAAAGAGACCCAAAACACCAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCACTCAA
CCAAACAAACAAAACCTAACCCCAAGACACAGAAAGAGACCCAGCATCCACAAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAA
CACACAGAAAGAGACACCAGCACCTCACAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCC
CAACCACCCCGAAAAACACACCCAACTCCACACAAAACACTACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAAATCCAACAAAAAATCTAGTC
ATATGCTTAGTTATTC
>RSVBA491503
ATGTCCAAAAATAAGAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTCATAATTCAGCCAT
AATATTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTTACACTAACCACTGTACAGTTCAAACAATAAAAAACCCACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCATCCAAAACAACCACACCACCAATCCACACAACCTCAGCCACAA
TATCACCATAACAAAATCAGAAACACACCATAACAACAGCACAACCAAAGGCAGAACCCACTCCAACACAGAAACAACAGCCAA
CACAAAACCACTCCAAAAATCCACAAAAAACAAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAGAAAAAACCAACCAAAAACCCACAAACAAAC
CACCACCAAAAACCCACAACAAAAGAGACTCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCACTCAACCCAAACAAAAAAC
AACCCCAAGACCAGAAAGAGACACCAGCACCCCAATTCAGTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAGAAAGAGACACC
AGCACTCACAATCCATTGTGCTAGACACAACCACATCAAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAAACA
CACCAACTCCACAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAAATCCAACAAAAAATCTAG
>RSVBA514003
ATGTCCAAAAACAAGAATCAACGCCTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTCATAATTCAGCCAT
AATATTTATCATCTCTGCCAATCACAAGTTTACACTAACCACTGTACAGTTCAAACAATAAAAAACCCACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCATCCAAAACAACCACACCACCAATCCACACAACCTCAGCCACAA
TATCACCATAACAAAATCAGAAACACACCATAACAACAGCACAACCAAAGGCAGAACCCACTCCAACACAGAAACAACAGCCAA
CACAAAACCACTCCAAAAATCCACAAAAAACAAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAGAAAAAACCAACCAAAAACCCACAAACAAAC
CACCACCAAAAACCCACAACAAAAGAGACTCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCACTCAACCCAAACAAAAAAC
AACCCCAAGACCAGAAAGAGACACCAGCACCCCAATTCAGTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAGAAAGAGACACC
AGCACTCACAATCCATTGTGCTAGACACAACCACATCAAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAAACA
CACCAACTCCACAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAAATCCAACAAAAAATCTAG
>RSVBA656403
ATGTCCAAAAACAAGAATCAACGCCTGCCAGGACTCTGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTCATAATTCAGCCAT
AATATTTATCATCTCTGCCAATCACAAGTTTACACTAACCACTGTACAGTTCAAACAATAAAAAACCCACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCATCCAAAACAACCACACCACCAATCCACACAACCTCAGCCACAA
TATCACCATAACAAAATCAGAAACACACCATAACAACAGCACAACCAAAGGCAGAACCCACTCCAACACAGAAACAACAGCCAA
CACAAAACCACTCCAAAAATCCACAAAAAACAAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAGAAAAAACCAACCAAAAACCCACAAACAAAC
CACCACCAAAAACCCACAACAAAAGAGACTCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCACTCAACCCAAACAAAAAAC
AACCCCAAGACCAGAAAGAGACACCAGCACCCCAATTCAGTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAGAAAGAGACACC
AGCACTCACAATCCATTGTGCTAGACACAACCACATCAAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAAACA
CACCAACTCCACAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAAATCCAACAAAAAATCTAG
>RSVBA10004
ATGTCCAAAAACAAGAATCAACGCCTGCCAGGACTCTGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTCATAATTCAGCCAT
AATATTTATCATCTCTGCCAATCACAAGTTTACACTAACCACTGTACAGTTCAAACAATAAAAAACCCACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCATCCAAAACAACCACACCACCAATCCACACAACCTCAGCCACAA
TATCACCATAACAAAATCAGAAACACACCATAACAACAGCACAACCAAAGGCAGAACCCACTCCAACACAGAAACAACAGCCAA
CACAAAACCACTCCAAAAATCCACAAAAAACAAAAGATGATTACCATTTTGAAGTGTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGTGGCAAC
AATCAACTCTGCAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAGAAAAAACCAACCAAAAACCCACAAACAAACCCCA
CCAAAACCAAAAACAAAAGAGACCTTAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCACTCAACCCAAACAAAAAACCCACCC
CAAGACCAGAAAGAGACACCAGCACCCCAATTCAGTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAGAAAGAGACCCAGCACC
TTACAAATCCATTGCGCTTGACACAACCACATCAAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCTACTCAACCACCCCGAAAAACACCCCA
ACTTACACAACACCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAAATCCAACAAAAAATCTAG
>RSVBA35404
TGTGGCAACAATCAACTCTGCAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAGAAAAAACCAACCATAAAAACCCACAAACA
AACCCACCAAAAACCCACAACAAAAGAGACCCAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCACTTAAACCCCAAAAACAA
AACCCCAAGACACAGAAAGAGACACCAGCACCCCAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAGAAAGAGACCCAGCACC
ACCAGCACCTACAATCCATTGTGCTAGACACAACCACATCAAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCTACTCAACCACCCCGAAAA
ACACACCAACTCCACAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAAATCCAACAAAAAATCTAGTCATATGCTTAGTTATTC
C
>RSVBA49304
TGTGGCAACAATCAACTCTGCAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAGAAAAAACCAACCATAAAAACCCACAAACA
AACCCACCAAAAACCCACAACAAAAGAGACCCAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCACTTAAACCCCAAAAACAA
AACCCCAAGACACAGAAAGAGACACCAGCACCCCAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAAACACAGAAAGAGACCCAGCACC
ACCAGCACCTACAATCCATTGTGCTAGACACAACCACATCAAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCTACTCAACCACCCCGAAAA
ACACACCAACTCCACAAAACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAAATCCAACAAAAAATCTAGTCATATGCTTAGTTATTC
C
>RSVBA49304
TGTGGCAACAATCAACTCTGCAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAGAAAAAACCAACCATAAAAACCCACAAACA
AACCCACCAAAAACCCACAACAAAAGAGACCCAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCCACTTAAACCCCAAAAACAA

ACTAACCCCAAGACCACAGAAAGAGACACCAGTACCCACAAACCCTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACACAGAAAGAGAC
ACCAGCACCTCACAATCCATTTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCTACTCAACCACCCCGAAA
CCACACCAACTCCACACAAACACCCACAGCAACCGAGCCCTCCACATCAAATCCACCTAAAACTCTAGTCATATGCTTAGTTATT
C
>RSVBA52404
ATGTCCAAAACAGAATCAACGCACTGCTAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGTT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTCATAATTGCAGCCAT
AATATTTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTTACACTAACAACTGTCACAGTTCAAACAATAAAAAACCACACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCCAACAACCCCAACCCACACCACCAATCCACACAACTCAGCCACAA
TATCACCCAATACAAAACCAGAAACACACCATAACAACAGCACAAACCAAGGCAGATCCACCCTCCAACACAGAAACAACAGCCAAG
CACAAAACCACGTCAAAAAATCCACCAAAAAAACCAAAAGATGATTACCATTTGAAAGTGTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAAGAAAAAACCACCATAAAAACCCACAAACAAAC
CACCCACAAAACCACAAACAAAAGAGACCCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCACCATCAACCCACAAAAAACT
AACCCCAAGACCACAGAAAGAGACACCAGTACCCCAAAACCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACACAGAAAGAGACACC
AGCACCTCACAATCCATTTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCTACTCAACCACCCCGAAAAACA
CACCCAACTCCACACAAACACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAATCCACCTAAAACTCTAG
>RSVBA160704
ATGTCCAAAACAGAATCAACGCTACTGCCAGGACTCTAGAAAAGACCTGGGATACTCTTAATCATCTAATTGTAATATCCTCTTGTT
TATACAAATTAATTTAAAAATCTATAGCACAAATAGCACTATCAGTTTTGGCAATGATAATCTCAACCTCTCTCATAATTGCAGCCAT
AATATTTCATCATCTCTGCCAATCACAAGTTTACACTAACAACTGTCACAGTTCAAACAATAAAAAACCACACTGAGAAAAACATCACC
ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCCAACAACCCCAACCCACACCACCAATCCACACAACTCAGCCACAA
TATCACCCAATACAAAATCAGAAACACACCATAACAACAGCACAAACCAAGGCAGAACCCACTCCAACACAGAAACAACAGCCAAG
CACAAAACCACGTCAAAAAATCCACCAAAAAAACCAAAAGATGATTACCATTTGAAAGTGTCAACTTCGTTCCCTGTAGTATATGT
GGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAAGAAAAAACCACCATAAAAACCCACAAACAAAC
CACCCACAAAACCACAAACAAAAGAGACTCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCACCATCAACCCACAAAAAACT
AACCCCAAGACCACAGAAAGAGACACCAGCACCTACAATCCATTTGTGCTTGACACAACCACATCAAAACACACAGAAAGAGACACC
AGCACCTCACAATCCATTTGTGCTAGACACAACCACATCAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACTCAACCACCCCGAAAAACA
CACCCAACTCCACACAAACACCCACAGCATCCGAGCCCTCCACATCAAATCCAACCAAAAACTCTAG
>RSVBA152604
TGTGGCAACAATCAACTCTGCAAAATCCATTTGCAAAAACAATACCAAGCAATAAACCAAAAGAAAAAACCACCATAAAAACCCACAAACA
AACCCCAACCAAAACCACAAACAAAAGAGACCCAAAAACACTAGCCAAAACACTGAAAAAGAAACCACCATCAACCCACAAAAAA
ACTAACCCCAAGACCACAGAAAGAGACACCAGTACCCCACAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACCCACCCCGAAA
ACCAGCACCTCACAATCCATTTGTGCTCGACACAACCACATCAAAACACACAATCCAACAGCAATCCCTCCACCCACCCCGAAA
ACACACCAACTCCACACAAACACCCACAGCATCTGAGCCCTCCACATCAAATCCACCTAAAACTCTAGTCATATGCTTAGTTATT
C

Apéndice 3

Secuencias de la glucoproteína G del HRSV subtipos A y B obtenidas de la base de datos *GenBank* para realizar los análisis filogenéticos.

Subtipo A

Cepa	Lugar de aislamiento	Genotipo definido	Cita bibliográfica
RSVLong56	Baltimore, USA	Indefinido	Chanock et al, 1957
RSVMon187	Montevideo, Uruguay	Indefinido	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMon190	Montevideo, Uruguay	GA5	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMon388	Montevideo, Uruguay	GA2	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMon591	Montevideo, Uruguay	GA1	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMon892	Montevideo, Uruguay	GA5	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMon992	Montevideo, Uruguay	GA1	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMon991	Montevideo, Uruguay	GA1	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMon192	Montevideo, Uruguay	GA5	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMon189	Montevideo, Uruguay	GA2	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMon490	Montevideo, Uruguay	GA3	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMad892	Madrid, España	GA5	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMad692	Madrid, España	GA5	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMad592	Madrid, España	GA7	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMad392	Madrid, España	GA7	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMad389	Madrid, España	GA2	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMad892	Madrid, España	GA5	García <i>et al.</i> , 1994
RSVMad490	Madrid, España	GA3	García <i>et al.</i> , 1994
RSVUK661489	Birmingham, UK	GA7	Cane and Pringle 1995
RSVUK619089	Birmingham, UK	GA5	Cane and Pringle 1995
RSVUK5857	Birmingham, UK	GA7	Cane and Pringle 1995
RSVNYCH0993	Rochester, NY, USA	GA4	Peret <i>et al.</i> , 1998
RSVNYCH34	Rochester, NY, USA	GA1	Peret <i>et al.</i> , 1998
RSVNYCH28	Rochester, NY, USA	GA2	Peret <i>et al.</i> , 1998
RSVNYCH1793	Rochester, NY, USA	GA5	Peret <i>et al.</i> , 1998
RSVNYCH5794	Rochester, NY, USA	GA2	Peret <i>et al.</i> , 1998
RSVBE1145100	Leuven, Bélgica	GA7	Zlateva <i>et al.</i> , 2004
RSVBE1224396	Leuven, Bélgica	GA7	Zlateva <i>et al.</i> , 2004
RSVBE1341299	Leuven, Bélgica	GA7	Zlateva <i>et al.</i> , 2004
RSVBE33202	Leuven, Bélgica	GA2	Zlateva <i>et al.</i> , 2004
RSVBE11987	Leuven, Bélgica	BE/A1	Zlateva <i>et al.</i> , 2004
RSVBE30787	Leuven, Bélgica	BE/A1	Zlateva <i>et al.</i> , 2004
RSVBIR173489	Birmingham, UK	GA1	Cane and Pringle 1995
RSVBIR64289	Birmingham, UK	GA1	Cane and Pringle 1995
RSVSE0192	Seúl, Corea	GA7	Choi and Lee, 2000
RSVSE0298	Seúl, Corea	GA2	Choi and Lee, 2000
RSVSE0391	Seúl, Corea	GA5	Choi and Lee, 2000
RSVSE0596	Seúl, Corea	GA2	Choi and Lee, 2000
RSVSE1195	Seúl, Corea	GA5	Choi and Lee, 2000
RSVSE1294	Seúl, Corea	GA2	Choi and Lee, 2000
RSVSE1297	Seúl, Corea	GA2	Choi and Lee, 2000

RSVWV1998387	West Virginia, USA	GA1	Mufson <i>et al.</i> , 1987
RSVWV2383688	West Virginia, USA	GA7	Mufson <i>et al.</i> , 1987
RSVISTA506	Estambul, Turquía	GA5	No publicado
RSVISTA1006	Estambul, Turquía	GA2	No publicado
RSVISTA906	Estambul, Turquía	GA2	No publicado
RSVBE963505	Leuven, Bélgica	GA5	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE0102	Leuven, Bélgica	GA2	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE0303	Leuven, Bélgica	GA5	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE8105	Leuven, Bélgica	GA2	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE24503	Leuven, Bélgica	GA2	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE75803	Leuven, Bélgica	GA5	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE193704	Leuven, Bélgica	GA5	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE205703	Leuven, Bélgica	GA7	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE312503	Leuven, Bélgica	GA5	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE544502	Leuven, Bélgica	GA2	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE888505	Leuven, Bélgica	GA7	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE956705	Leuven, Bélgica	GA5	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE960005	Leuven, Bélgica	GA2	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE1036505	Leuven, Bélgica	GA5	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE1114004	Leuven, Bélgica	GA4	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE1275202	Leuven, Bélgica	GA5	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE1297104	Leuven, Bélgica	GA2	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE1314504	Leuven, Bélgica	GA5	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBE1364297	Leuven, Bélgica	GA4	Zlateva <i>et al.</i> , 2007
RSVBIR173489	Birmingham, UK	GA1	Cane <i>et al.</i> , 1991
RSVBIR64289	Birmingham, UK	GA1	Cane <i>et al.</i> , 1991
RSVITRMa199798	Italia	GA3	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITRMa200001	Italia	GA2	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITRMc200102	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITRMc200405	Italia	GA2	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITRMd200102	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITRMe200203	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITTOa200102	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITTOa200506	Italia	GA2	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITTOb199900	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITTOb200203	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITTOc200001	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITTOc200203	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITTOe199900	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITTOe200001	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITTOe200102	Italia	GA2	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITTOe200405	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITTOf199900	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITTOf200405	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITTOg199900	Italia	GA3	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITTOh200001	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVITTOi200203	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007

RSVITTOq200405	Italia	GA5	Montieri <i>et al.</i> , 2007
RSVQAT1900	Qatar	GA2	Althani, 2003 (no publicado)
RSVQAT2900	Qatar	GA2	Althani, 2003 (no publicado)
RSVQAT3901	Qatar	GA2	Althani, 2003 (no publicado)
RSVQAT4101	Qatar	GA2	Althani, 2003 (no publicado)
RSVJiangxi48305	Jiangxi, China	GA2	Zhang <i>et al.</i> , 2007
RSVJiangxi15206	Jiangxi, China	GA2	Zhang <i>et al.</i> , 2007
RSVZhejiang00304	Zhejiang, China	GA2	Zhang <i>et al.</i> , 2007
RSVZhejiang00404	Zhejiang, China	GA2	Zhang <i>et al.</i> , 2007
RSVBeij0501	Beijing, China	GA2	Zhang <i>et al.</i> , 2007
RSVBeij4104	Beijing, China	GA2	Zhang <i>et al.</i> , 2007
RSVBeij6204	Beijing, China	GA2	Zhang <i>et al.</i> , 2007
RSVChang9101	Changchun, China	GA2	Zhang <i>et al.</i> , 2007
RSVChang9102	Changchun, China	GA3	Zhang <i>et al.</i> , 2007
RSVChang9104	Changchun, China	GA2	Zhang <i>et al.</i> , 2007
RSVChang9105	Changchun, China	GA2	Zhang <i>et al.</i> , 2007
RSVLanzhou0401	Lanzhou, China	GA5	Zhang <i>et al.</i> , 2007
RSVDEL3W04	Nueva Delhi, India	GA2	Parveen <i>et al.</i> , 2006
RSVDEL18102	Nueva Delhi, India	GA5	Parveen <i>et al.</i> , 2006
RSVDEL21802	Nueva Delhi, India	GA2	Parveen <i>et al.</i> , 2006
RSVDEL29703	Nueva Delhi, India	GA2	Parveen <i>et al.</i> , 2006
RSVDEL37903	Nueva Delhi, India	GA5	Parveen <i>et al.</i> , 2006
RSVDEL60603	Nueva Delhi, India	GA5	Parveen <i>et al.</i> , 2006
RSVDEL71904	Nueva Delhi, India	GA2	Parveen <i>et al.</i> , 2006
RSVDEL72204	Nueva Delhi, India	GA2	Parveen <i>et al.</i> , 2006
RSVDEL99704	Nueva Delhi, India	GA5	Parveen <i>et al.</i> , 2006
RSVJPNG00102	Niigata, Japon	GA5	Sato <i>et al.</i> , 2005
RSVJPNG04202	Niigata, Japon	GA7	Sato <i>et al.</i> , 2005
RSVSA0003	Soweto, South Africa	GA2	Venter <i>et al.</i> , 2001
RSVMoz2499	Manhiça, Mozambique	GA2	Roca <i>et al.</i> , 2001
RSVMoz17099	Manhiça, Mozambique	GA5	Roca <i>et al.</i> , 2001
RSVMoz20199	Manhiça, Mozambique	GA5	Roca <i>et al.</i> , 2001
RSVKen2002	Kilifi, Kenia	GA2	Scott <i>et al.</i> , 2004
RSVKen201	Kilifi, Kenia	GA5	Scott <i>et al.</i> , 2004
RSVKen600	Kilifi, Kenia	GA2	Scott <i>et al.</i> , 2004
RSVKen700	Kilifi, Kenia	GA2	Scott <i>et al.</i> , 2004
RSVKen800	Kilifi, Kenia	GA2	Scott <i>et al.</i> , 2004
RSVKen802	Kilifi, Kenia	GA5	Scott <i>et al.</i> , 2004
RSVKen6902	Kilifi, Kenia	GA2	Scott <i>et al.</i> , 2004
RSVKen15802	Kilifi, Kenia	GA5	Scott <i>et al.</i> , 2004
RSVKen18402	Kilifi, Kenia	GA5	Scott <i>et al.</i> , 2004
RSVKen19902	Kilifi, Kenia	GA5	Scott <i>et al.</i> , 2004
RSVKen23302	Kilifi, Kenia	GA5	Scott <i>et al.</i> , 2004
RSVBRRP04606	Riverao Preto, Brasil	GA2	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBRRP12004	Riverao Preto, Brasil	GA2	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBRSPP175307	Sao Paulo, Brasil	GA2	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBRRP13604	Riverao Preto, Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)

RSVBRRP1934	Riverao Preto, Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR3998	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR5698	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR6500	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR7197	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR7299	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR9599	Brasil	GA2	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR9799	Brasil	GA2	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR20606	Brasil	GA2	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR12004	Brasil	GA2	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR10200	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR12100	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR03904	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR05805	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR08404	Brasil	GA2	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR09905	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR11504	Brasil	GA2	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR13200	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR14100	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR14304	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR3896	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR13805	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)
RSVBR12400	Brasil	GA5	Lima <i>et al.</i> , 2008 (no publicado)

Subtipo B

Cepa	Lugar de aislamiento	Genotipo definido	Cita bibliográfica
RSVCH1853763	Rochester, NY, USA	indefinido	Johnson <i>et al.</i> , 1987
RSVB1		GB-1	Karron <i>et al.</i> , 1997
RSVBA393199	Buenos Aires, ARG	BA	Trento <i>et al.</i> , 2003
RSVBA412899	Buenos Aires, ARG	BA	Trento <i>et al.</i> , 2003
RSVBA383399	Buenos Aires, ARG	BA	Trento <i>et al.</i> , 2003
RSVBA385999	Buenos Aires, ARG	BA	Trento <i>et al.</i> , 2003
RSVBA399799	Buenos Aires, ARG	BA	Trento <i>et al.</i> , 2003
RSVSAP7102	Sapporo, Japón	BA	Kuroiwa <i>et al.</i> , 2005
RSVSAP0400	Sapporo, Japón	BA	Kuroiwa <i>et al.</i> , 2005
RSVNG15303	Niigata, Japon	BA	Sato <i>et al.</i> , 2005
RSVNG00603	Niigata, Japon	BA	Sato <i>et al.</i> , 2005
RSVNG00403	Niigata, Japon	BA	Sato <i>et al.</i> , 2005
RSVKen2903	Kilifi, Kenia	BA	Scott <i>et al.</i> , 2004
RSVBE1341799	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005
RSVBE1153501	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005
RSVBE1234902	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005
RSVBE1252201	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005
RSVBE55303	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005
RSVBE106603	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005

RSVBE4603	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005
RSVBE1150801	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005
RSVBE21003	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005
RSVBE1150001	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005
RSVBE1315902	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005
RSVBE1281703	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005
RSVBE1461003	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005
RSVBE1345703	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005
RSVBE1267001	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005
RSVBE1244599	Leuven, Bélgica	BA	Zlateva <i>et al.</i> , 2005
RSVDEL57503	Nueva Delhi, India	BA	Parveen <i>et al.</i> , 2006
RSVQUE2901	Quebec, Canadá	BA	Gilca <i>et al.</i> , 2006
RSVQUE7001	Quebec, Canadá	BA	Gilca <i>et al.</i> , 2006
RSVQUE1802	Quebec, Canadá	BA	Gilca <i>et al.</i> , 2006
RSVBA373799	Buenos Aires, ARG	SAB-3	Galiano <i>et al.</i> , 2005
RSVBA391099	Buenos Aires, ARG	SAB-3	Galiano <i>et al.</i> , 2005
RSVBA599701	Buenos Aires, ARG	SAB-3	Galiano <i>et al.</i> , 2005
RSVBA376899	Buenos Aires, ARG	SAB-3	Galiano <i>et al.</i> , 2005
RSVSAV19298	Soweto, Sudafrica	SAB-3	Venter <i>et al.</i> , 2001
RSVSAV42999	Soweto, Sudafrica	SAB-3	Venter <i>et al.</i> , 2001
RSVMoz19899	Manhiça, Mozambique	SAB-2	Roca <i>et al.</i> , 2001
RSVSAV80099	Soweto, Sudafrica	SAB-2	Venter <i>et al.</i> , 2001
RSVMon801	Montevideo, URU	URU-1	Blanc <i>et al.</i> , 2005
RSVMon199	Montevideo, URU	URU-1	Blanc <i>et al.</i> , 2005
RSVMon501	Montevideo, URU	URU-2	Blanc <i>et al.</i> , 2005
RSVMon901	Montevideo, URU	URU-2	Blanc <i>et al.</i> , 2005
RSVBA256097	Buenos Aires, ARG	GB-3	Galiano <i>et al.</i> , 2005
RSVBA257497	Buenos Aires, ARG	GB-3	Galiano <i>et al.</i> , 2005
RSVBA296098	Buenos Aires, ARG	GB-3	Galiano <i>et al.</i> , 2005
RSVBA406299	Buenos Aires, ARG	GB-3	Galiano <i>et al.</i> , 2005
RSVBA595401	Buenos Aires, ARG	URU-1	Galiano <i>et al.</i> , 2005
RSVSAD165698	Soweto, Sudafrica	SAB-1	Venter <i>et al.</i> , 2001
RSVSA2500	Soweto, Sudafrica	SAB-1	Venter <i>et al.</i> , 2001
RSVCN3521	Canada	GB-3	Peret <i>et al.</i> , 2000
RSVCH9b93	Rochester, NY, USA	GB-2	Peret <i>et al.</i> , 1998
RSVAL19734-4	Alabama, Birmingham, USA	GB-4	Peret <i>et al.</i> , 2000
RSVBA301898	Buenos Aires, ARG	GB-4	Galiano <i>et al.</i> , 2005
RSVBA397699	Buenos Aires, ARG	GB-4	Galiano <i>et al.</i> , 2005
RSVNY01	Rochester, NY, USA	GB-4	Peret <i>et al.</i> , 2000
RSVCH10b	Rochester, NY, USA	GB-1	Peret <i>et al.</i> , 1998

Apéndice 4

Parámetros correspondientes a los distintos modelos de sustitución nucleotídica obtenidos del análisis por el programa Modeltest entre 56 modelos posibles. Ti/Tv: tasa de transiciones vs transversiones. ND: no determinado. NC: no corresponde.

Parámetros	HRSV subtipo A 1° y 2° RV del ectodominio gen glucoproteína G (595 nt)	HRSV subtipo A 2° RV del ectodominio gen glucoproteína G (231 nt)	HRSV subtipo B Cepas BA Secuencia completa del gen glucoproteína G (951 nt)	HRSV subtipo B Cepas BA 2° RV del ectodominio gen glucoproteína G (270-330 nt)	HRSV subtipo A 1° y 2° RV del ectodominio gen glucoproteína G cepas ARG y todos los clones secuenciados
Modelo de sustitución ^a	GTR+I+G	GTR+G	TrN+G	TrN+G	HKY+G
Frecuencia de A	0,4072	0,3887	0,4368	0,3956	0,4250
Frecuencia de C	0,3469	0,3770	0,3174	0,3704	0,3281
Frecuencia de G	0,1150	0,1145	0,0836	0,1208	0,1001
Frecuencia de T	0,1390	0,1198	0,1622	0,1132	0,1468
Ti/Tv	ND	ND	3,97	ND	ND
nst	6	6	6	6	2
Tasa de sustitución A-C	0,9066	0,5600	1,0000	1,000	NC
Tasa de sustitución A-G	6,8750	5,3409	3,3846	6,6604	NC
Tasa de sustitución A-T	1,9434	1,7709	1,0000	1,000	NC
Tasa de sustitución C-G	0,0625	0,0293	1,0000	1,000	NC
Tasa de sustitución C-T	16,5806	11,8328	16,0574	14,9785	NC
Tasa de sustitución G-T	1,0000	1,0000	1,0000	1,000	NC
Proporción de sitios invariables I	0,1207	0	0	0	0
Parámetro de forma de la distribución Γ	1,7402	1,8660	0,1294	1,7783	0,3508

Apéndice 5

Árboles obtenidos por los criterios de MV, Parsimonia y Distancias correspondientes a las distintas secciones de Resultados.

Sección 4.2.2.2. HRSV Subtipo A:

Figura 1. Árbol filogenético de cepas de HRSV subtipo A (secuencias de 595 nt de la glucoproteína G) construido con el criterio de MV. Las cepas argentinas están resaltadas en color rojo. Sólo los valores de *bootstrap* mayores a 55 son mostrados.

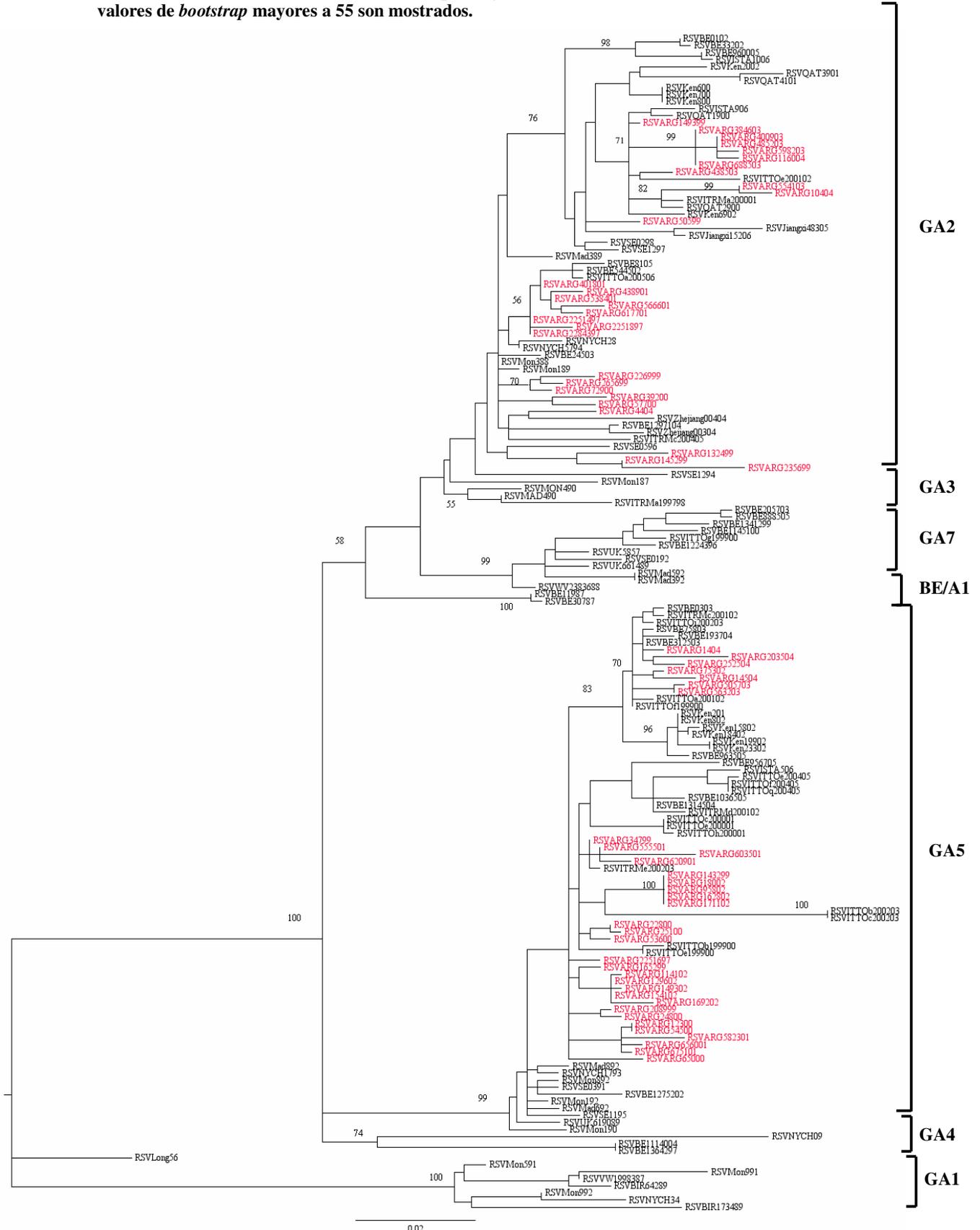


Figura 2. Árbol filogenético de cepas de RSV subtipo A (secuencias de 595 nt de la glucoproteína G) construido con el criterio de parsimonia. Las cepas argentinas están resaltadas en color rojo. Sólo los valores de *bootstrap* mayores a 55 son mostrados. Los genotipos GA2 y GA5 que involucran las cepas argentinas son resaltados.

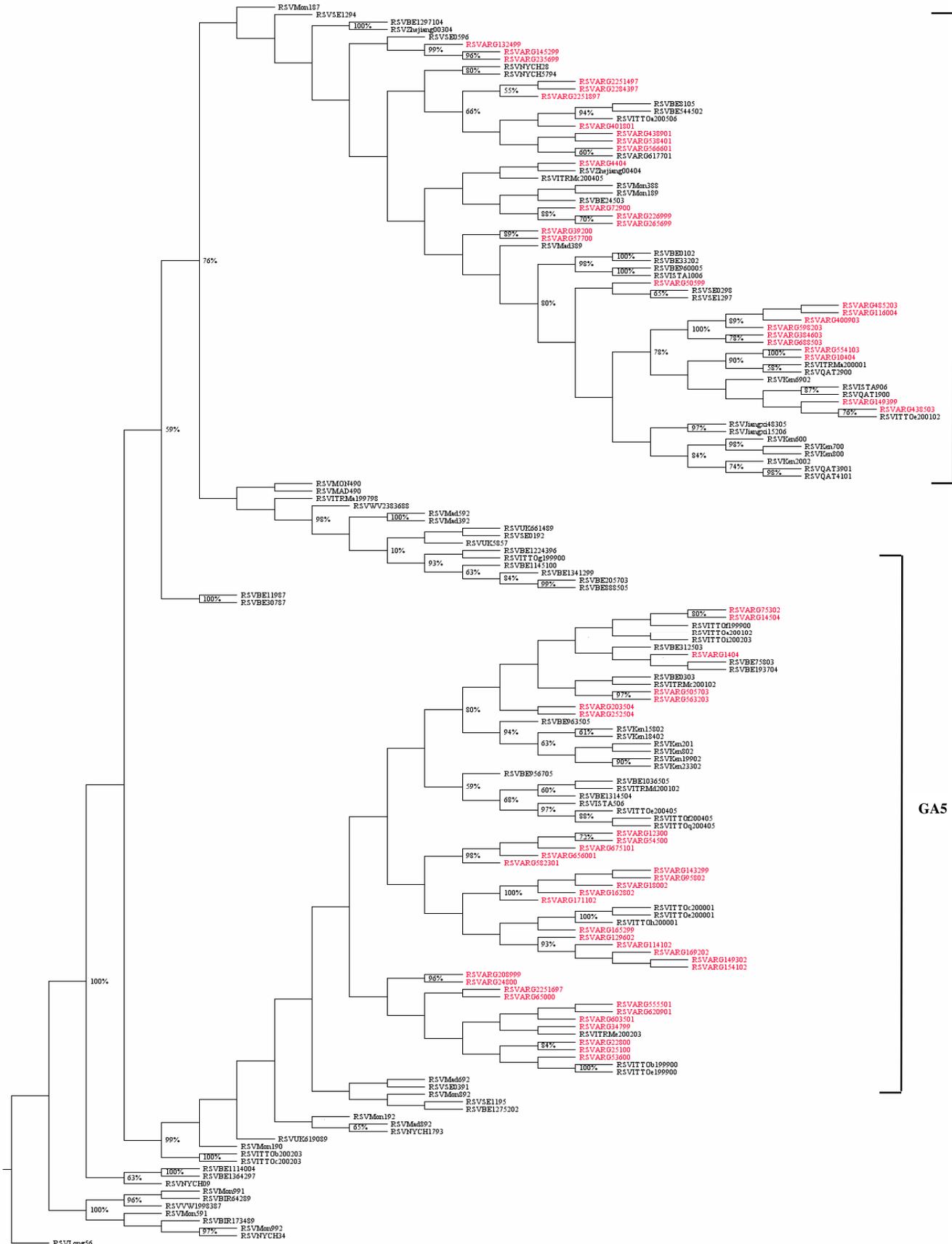


Figura 3. Árbol filogenético de cepas de RSV subtipo A (secuencias de 595 nt de la glucoproteína G) construido con el criterio de distancia (NJ, modelo Kimura 2-parámetros). Las cepas argentinas están resaltadas con un diamante en color rojo. Sólo los valores de *bootstrap* mayores a 55 son mostrados. Los genotipos GA2 y GA5 que involucran las cepas argentinas son resaltados.



Sección 4.2.3.2 HRSV Subtipo B:

Figura 4. Análisis filogenético de secuencias completas del gen de la glucoproteína G de HRSV subtipo B con una duplicación de 60 nt, aisladas en la Argentina en el período 1999-2004. Criterio de análisis utilizado MV. Sólo los valores de *bootstrap* mayores a 60% son mostrados. Las cepas fueron nombradas con la sigla BA que denota la ciudad de aislamiento, que permite la comparación con cepas previamente publicadas con las mismas características de duplicación.

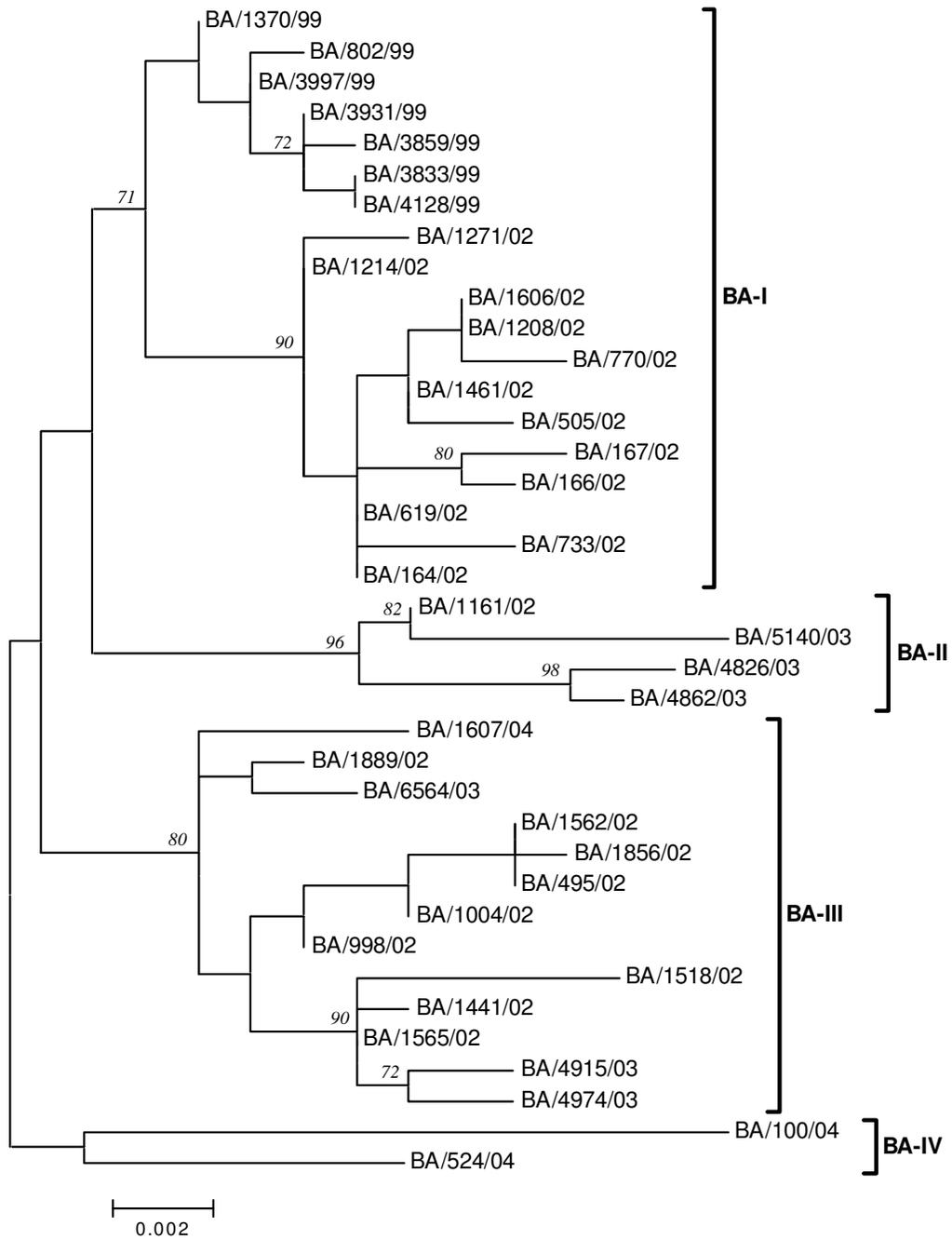


Figura 5. Análisis filogenético de secuencias completas del gen de la glucoproteína G de HRSV subtipo B con una duplicación de 60 nt, aisladas en la Argentina en el período 1999-2004. Criterio de análisis utilizado: parsimonia. Sólo los valores de *bootstrap* mayores a 60% son mostrados. Las cepas fueron nombradas con la sigla BA que denota la ciudad de aislamiento, que permite la comparación con cepas previamente publicadas con las mismas características de duplicación.

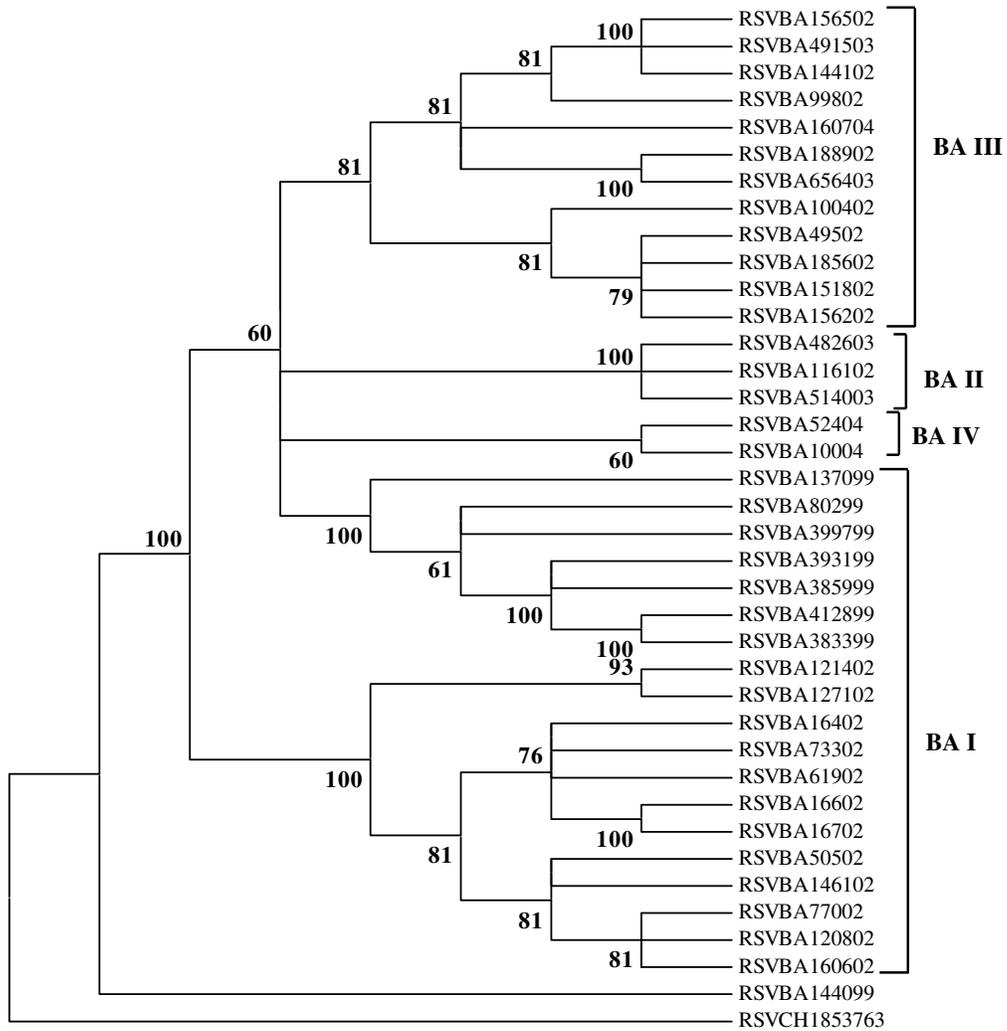


Figura 6. Análisis filogenético de secuencias completas del gen de la glucoproteína G de HRSV subtipo B con una duplicación de 60 nt, aisladas en la Argentina en el período 1999-2004. Criterio de análisis utilizado: distancia (NJ, modelo Kimura 2-parámetros). Sólo los valores de *bootstrap* mayores a 60% son mostrados. Las cepas fueron nombradas con la sigla BA que denota la ciudad de aislamiento, que permite la comparación con cepas previamente publicadas con las mismas características de duplicación.

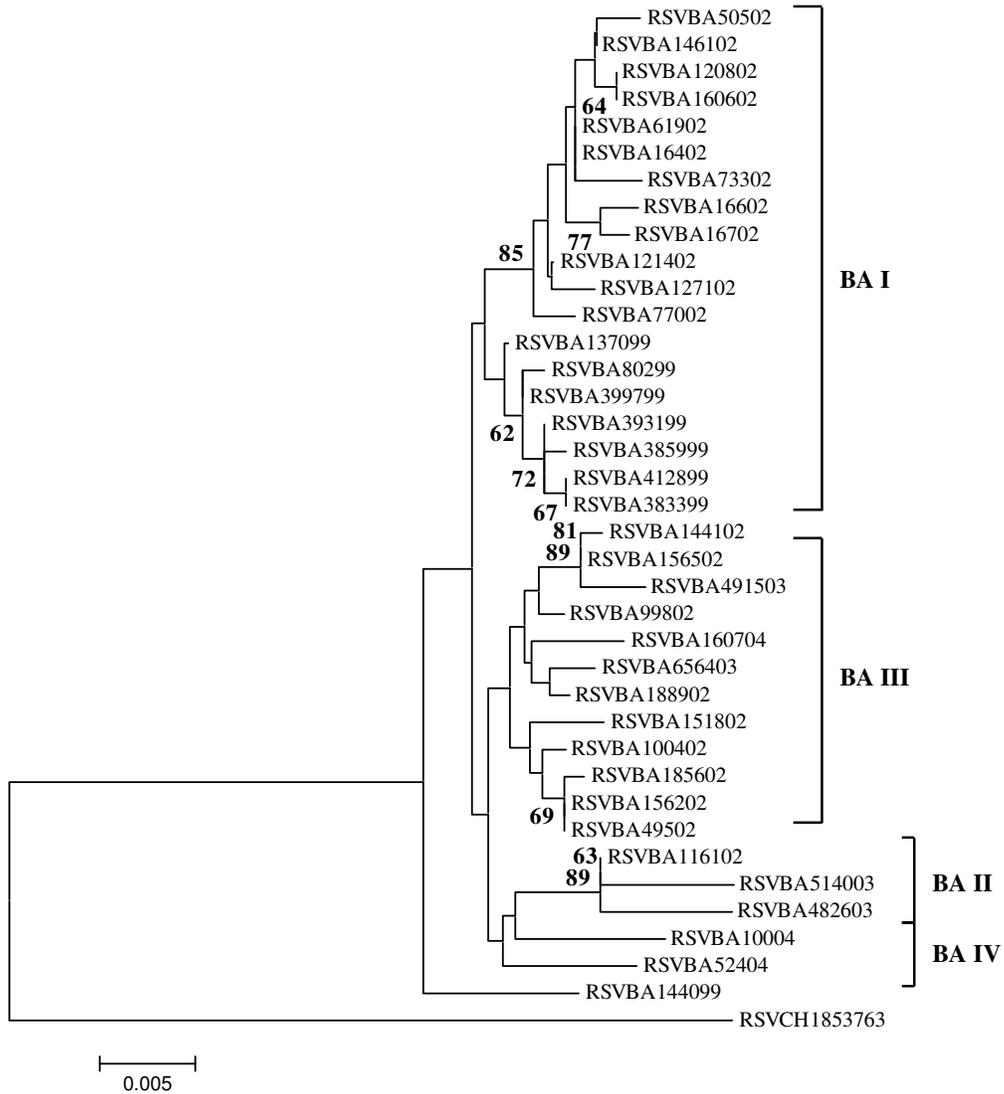


Figura 7. Árbol filogenético correspondiente al extremo C-terminal del gen de la glucoproteína G del HRSV subtipo B construido con el criterio de MV. Las siglas QUE, NG, SAP, Ken y BE, corresponden a Quebec, Niigata, Sapporo, Kenya y Bélgica, respectivamente. Sólo los valores de *bootstrap* mayores a 70% son mostrados. Dentro del genotipo BA marcado en negrita, las ramas BA-I a BA-IV son marcadas también con corchetes. Las secuencias Argentinas se presentan de color rojo.

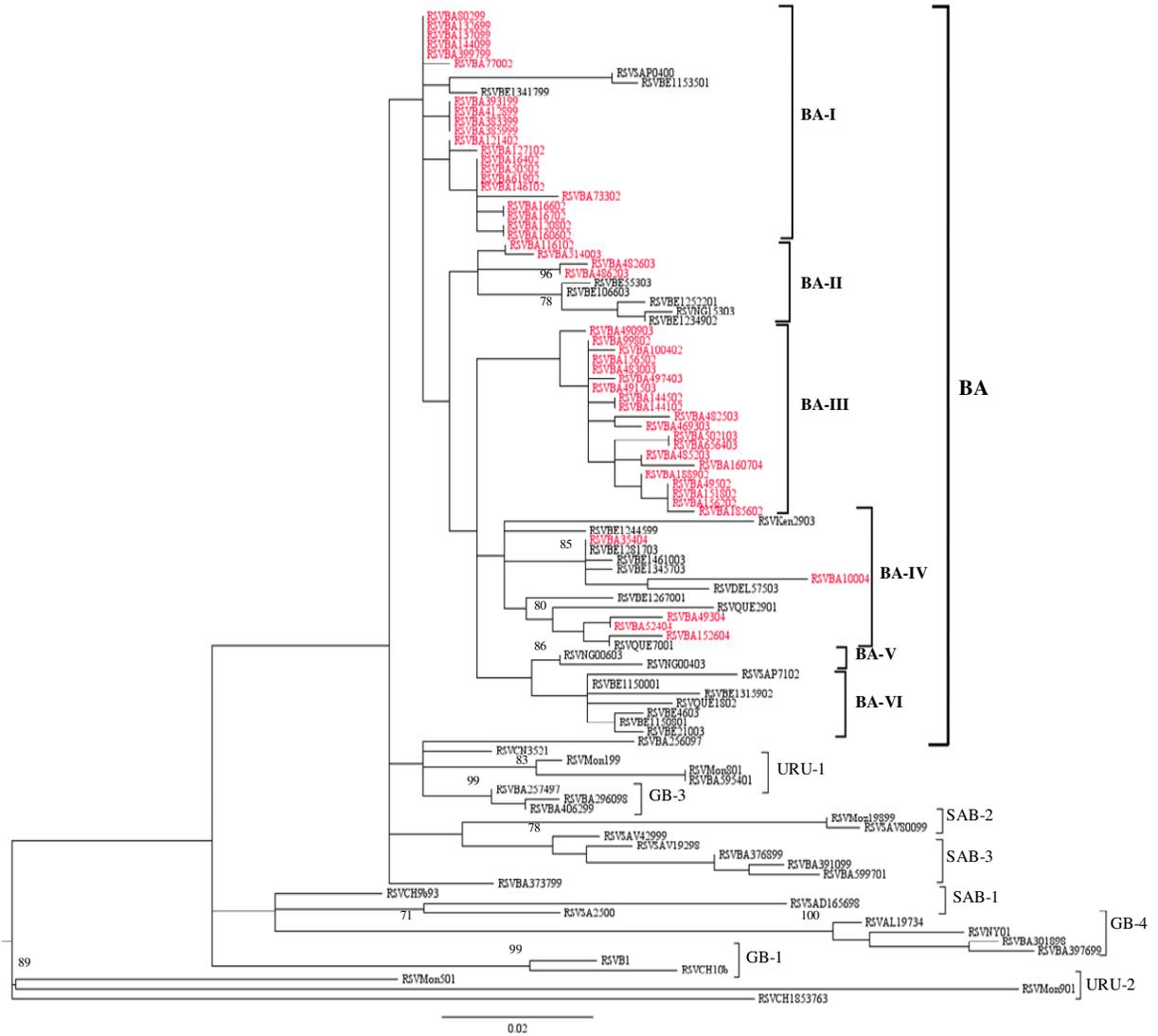


Figura 8. Árbol filogenético correspondiente al extremo C-terminal del gen de la glucoproteína G del HRSV subtipo B construido con el criterio de parsimonia. Las siglas QUE, NG, SAP, Ken y BE, corresponden a Quebec, Niigata, Sapporo, Kenya y Bélgica, respectivamente. Sólo los valores de *bootstrap* mayores a 60% son mostrados. El genotipo BA está marcado en negrita. Las secuencias Argentinas se marcan con un rombo de color rojo.

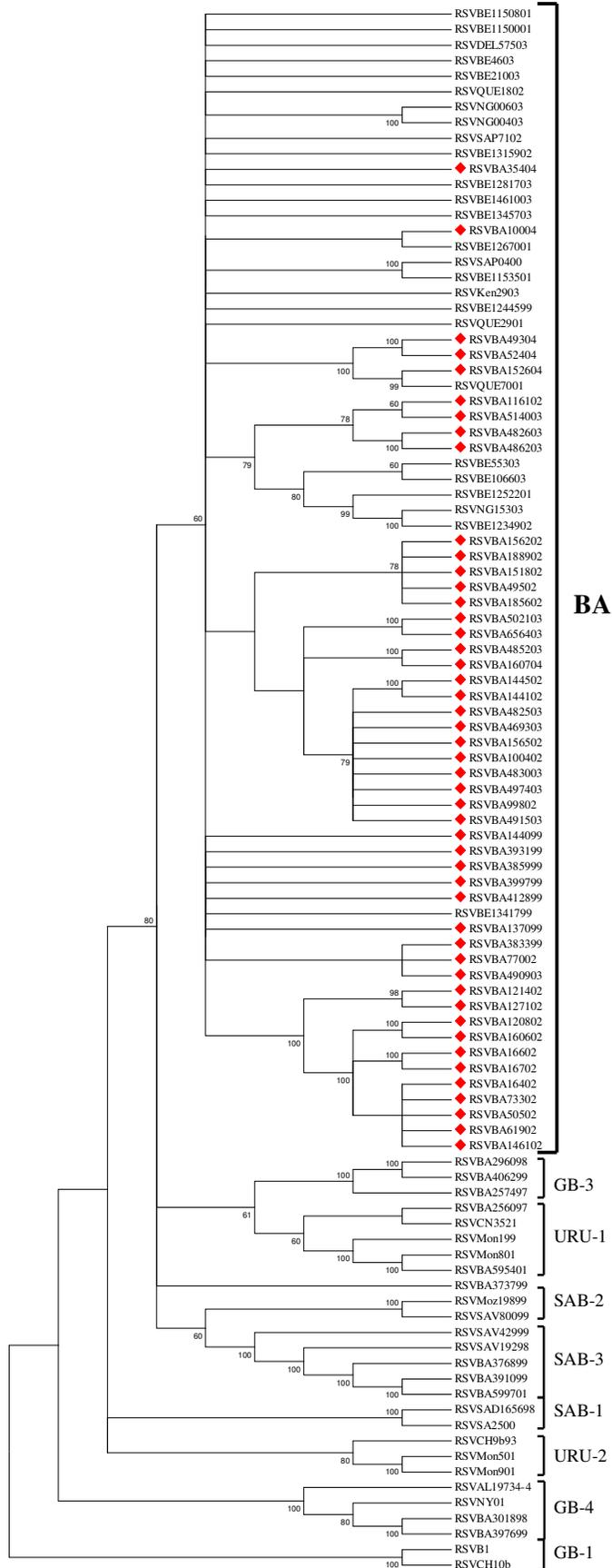


Figura 9. Árbol filogenético correspondiente al extremo C-terminal del gen de la glucoproteína G del HRSV subtipo B construido con el criterio de distancias. Las siglas QUE, NG, SAP, Ken y BE, corresponden a Quebec, Niigata, Sapporo, Kenya y Bélgica, respectivamente. Sólo los valores de *bootstrap* mayores a 60% son mostrados. El genotipo BA está marcado en negrita. Las secuencias Argentinas se marcan con un rombo de color rojo.



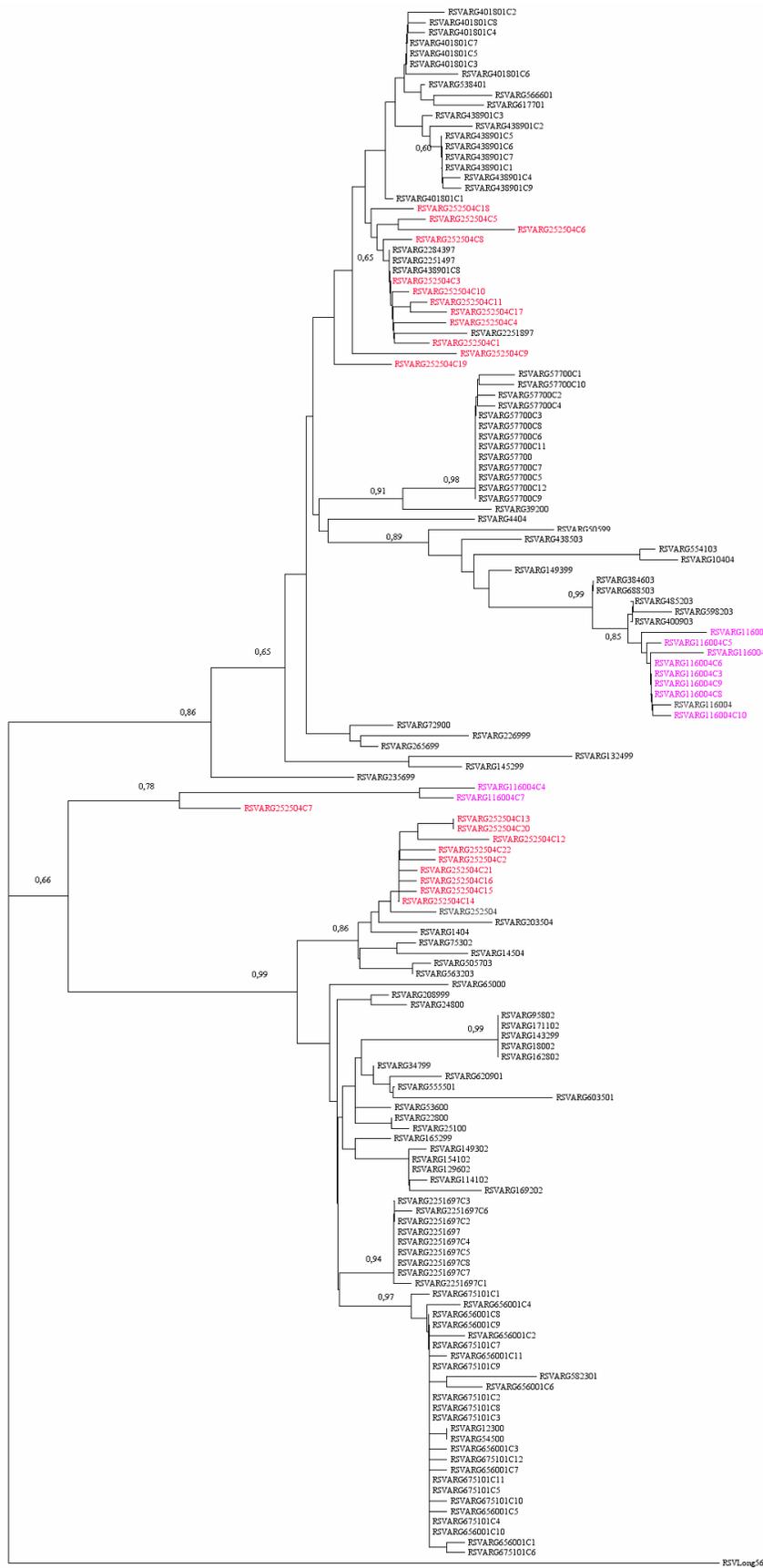
Sección 4.3.3. Análisis Molecular Intramuestras.

Figura 10 (Página 223). Árbol filogenético construido por inferencia bayesiana relacionando a las cepas argentinas de HRSV correspondientes al subtipo A (circulantes durante el período 1999-2004 y año 1997) y la totalidad de las variantes genéticas (clones 1 al 22) encontradas en la muestra clínica ARG2525/04, más las encontradas en las otras muestras clínicas.

Las clones pertenecientes a la muestra ARG2525/04 se indican con color rojo, mientras que las pertenecientes a la 1ª muestra ARG1160/04, se indican con color rosa. Los genotipos son delimitados por corchetes. Las tres variantes ubicadas en un genotipo independiente de los otros conocidos previamente, se marcan con un signo de interrogación. Sólo las probabilidades posteriores mayores a 0,6 son mostradas.

Figura 11 (Página 224). Árbol filogenético construido por inferencia bayesiana relacionando cepas de HRSV subtipo A (circulantes en el mundo durante el período de análisis) y totalidad de las variantes genéticas (clones 1 al 22) encontradas en la muestra clínica ARG2525/04, más las encontradas en las otras muestras clínicas.

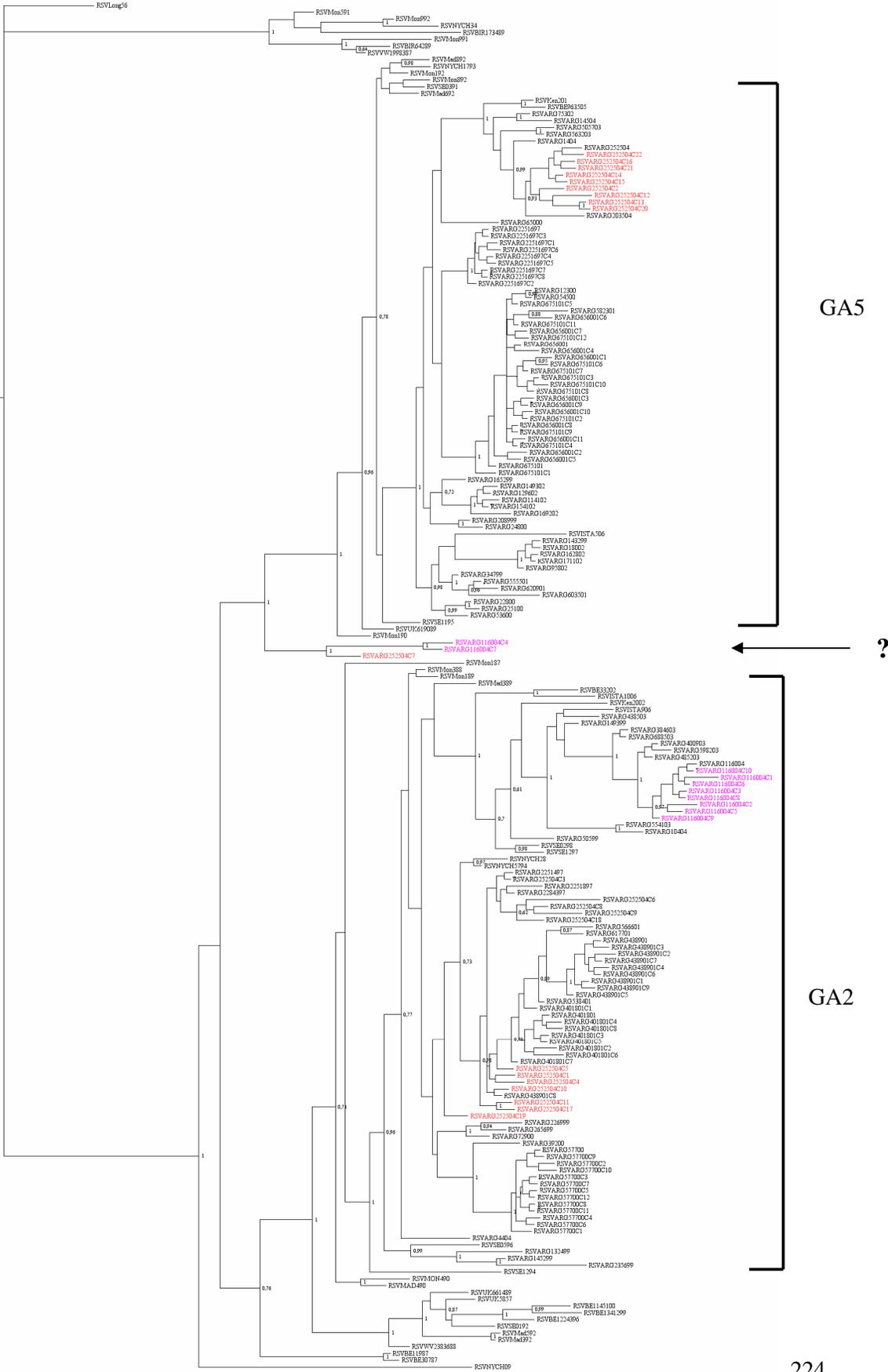
Las clones pertenecientes a la muestra ARG2525/04 se indican con color rojo, mientras que las pertenecientes a la 1ª muestra ARG1160/04, se indican con color rosa. Sólo los genotipos GA2 y GA5 son delimitados por corchetes, para mayor claridad. Las tres variantes ubicadas en un genotipo independiente de los otros conocidos previamente, se marcan con un signo de interrogación. Sólo las probabilidades posteriores mayores a 0,6 son mostradas.



GA2

?

GA5



GA5

?

GA2

Apéndice 6

Alineamiento de nucleótidos del gen de la glucoproteína G de la cepa de referencia Long/56 (M17212) con los 14 clones de la misma, secuenciados para calcular el error del método de clonado y secuenciación utilizado en la sección “Análisis Molecular Intramuestras”. En rojo se marcan las mutaciones que fueron halladas en los clones en relación a la secuencia de la cepa patrón publicada en *GenBank*.

```
CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment
M17212      TGGAATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGAAATTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTC 60
C1          TGGAATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGAAATTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTC 60
C2          TGGAATCACCTTCTCCAATCTGTCTGAAATTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTC 60
C3          TGGAATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGAAATTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTC 60
C4          TGGAATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGAAATTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTC 60
C5          TGGAATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGAAATTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTC 60
C6          TGGAATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGAAATTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTC 60
C7          TGGAATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGAAATTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTC 60
C8          TGGAATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGAAATTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTC 60
C9          TGGAATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGAAATTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTC 60
C10         TGGAATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGAAATTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTC 60
C11         TGGAATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGAAATTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTC 60
C12         TGGAATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGAAATTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTC 60
C13         TGGAATCAGCTTCTCCAATCTGTCTGAAATTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTC 60
C14         TGGAATCAGCTTCTCCAATCTACTGAAATTACATCACAAACCACCACCATACTAGCTTC 60
          *****E*****E*****

M17212      AACAAACCAGGAGTCAAGTCAAACCTGCAACCACAAACAGTCAAGACTAAAAACACAAC 120
C1          AACAAACCAGGAGTCAAGTCAAACCTGCAACCACAAACAGTCAAGACTAAAAACACAAC 120
C2          AACAAACCAGGAGTCAAGTCAAACCTGCAACCACAAACAGTCAAGACTAAAAACACAAC 120
C3          AACAAACCAGGAGTCAAGTCAAACCTGCAACCACAAACAGTCAGACTAAAAACACAAC 120
C4          AACAAACCAGGAGTCAAGTCAAACCTGCAACCACAAACAGTCAAGACTAAAAACACAAC 120
C5          AACAAACCAGGAGTCAAGTCAAACCTGCAACCACAAACAGTCAAGACTAAAAACACAAC 120
C6          AACAAACCAGGAGTCAAGTCAAACCTGCAACCACAAACAGTCAAGACTAAAAACACAAC 120
C7          AACAAACCAGGAGTCAAGTCAAACCTGCAACCACAAACAGTCAAGACTAAAAACACAAC 120
C8          AACAAACCAGGAGTCAAGTCAAACCTGCAACCACAAACAGTCAAGACTAAAAACACAAC 120
C9          AACAAACCAGGAGTCAAGTCAAACCTGCAACCACAAACAGTCAAGACTAAAAACACAAC 120
C10         AACAAACCAGGAGTCAAGTCAAACCTGCAACCACAAACAGTCAAGACTAAAAACACAAC 120
C11         AACAAACCAGGAGTCAAGTCAAACCTGCAACCACAAACAGTCAAGACTAAAAACACAAC 120
C12         AACAAACCAGGAGTCAAGTCAAACCTGCAACCACAAACAGTCAAGACTAAAAACACAAC 120
C13         AACAAACCAGGAGTCAAGTCAAACCTGCAACCACAAACAGTCAAGACTAAAAACACAAC 120
C14         AACAAACCAGGAGTCAAGTCAAACCTGCAACCACAAACAGTCAAGACTAAAAACACAAC 120
          *****E*****

M17212      AACAAACCAAAACAACCCAGCAAGCCCACTACAAAACAACGCCAAAACAACCCACCAA 180
C1          AACAAACCAAAACAACCCAGCAAGCCCACTACAAAACAACGCCAAAACAACCCACCAA 180
C2          AACAAACCAAAACAACCCAGCAAGCCCACTACAAAACAACGCCAAAACAACCCACCAA 180
C3          AACAAACCAAAACAACCCAGCAAGCCCACTACAAAACAACGCCAAAACAACCCACCAA 180
C4          AACAAACCAAAACAACCCAGCAAGCCCACTACAAAACAACGCCAAAACAACCCACCAA 180
C5          AACAAACCAAAACAACCCAGCAAGCCCACTACAAAACAACGCCAAAACAACCCACCAA 180
C6          AACAAACCAAAACAACCCAGCAAGCCCACTACAAAACAACGCCAAAACAACCCACCAA 180
C7          AACAAACCAAAACAACCCAGCAAGCCCACTACAAAACAACGCCAAAACAACCCACCAA 180
C8          AACAAACCAAAACAACCCAGCAAGCCCACTACAAAACAACGCCAAAACAACCCACCAA 180
C9          AACAAACCAAAACAACCCAGCAAGCCCACTACAAAACAACGCCAAAACAACCCACCAA 180
C10         AACAAACCAAAACAACCCAGCAAGCCCACTACAAAACAACGCCAAAACAACCCACCAA 180
C11         AACAAACCAAAACAACCCAGCAAGCCCACTACAAAACAACGCCAAAACAACCCACCAA 180
C12         AACAAACCAAAACAACCCAGCAAGCCCACTACAAAACAACGCCAAAACAACCCACCAA 180
C13         AACAAACCAAAACAACCCAGCAAGCCCACTACAAAACAACGCCAAAACAACCCACCAA 180
C14         AACAAACCAAAACAACCCAGCAAGCCCACTACAAAACAACGCCAAAACAACCCACCAA 180
          *****

M17212      CAAACCCAATAATGATTTTCACTTCGAAGTGTTTAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAG 240
C1          CAAACCCAATAATGATTTTCACTTCGAAGTGTTTAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAG 240
C2          CAAACCCAATAATGATTTTCACTTCGAAGTGTTTAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAG 240
C3          CAAACCCAATAATGATTTTCACTTCGAAGTGTTTAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAG 240
C4          CAAACCCAATAATGATTTTCACTTCGAAGTGTTTAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAG 240
C5          CAAACCCAATAATGATTTTCACTTCGAAGTGTTTAACTTTGTACCTCAGCATATGCAG 240
C6          CAAACCCAATAATGATTTTCACTTCGAAGTGTTTAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAG 240
C7          CAAACCCAATAATGATTTTCACTTCGAAGTGTTTAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAG 240
C8          CAAACCCAATAATGATTTTCACTTCGAAGTGTTTAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAG 240
C9          CAAACCCAATAATGATTTTCACTTCGAAGTGTTTAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAG 240
C10         CAAACCCAATAATGATTTTCACTTCGAAGTGTTTAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAG 240
C11         CAAACCCAATAATGATTTTCACTTCGAAGTGTTTAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAG 240
C12         CAAACCCAATAATGATTTTCACTTCGAAGTGTTTAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAG 240
C13         CAAACCCAATAATGATTTTCACTTCGAAGTGTTTAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAG 240
C14         CAAACCCAATAATGATTTTCACTTCGAAGTGTTTAACTTTGTACCTGCAGCATATGCAG 240
          *****E*****
```



```

M17212      ACTCACAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAACCTCCTCCGAAGGCAATCTAAGCCCTTC 540
C1           ACTCACAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAACCTCCTCCGAAGGCAATCTAAGCCCTTC 540
C2           ACTCACAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAACCTCCTCCGAAGGCAATCTAAGCCCTTC 540
C3           ACTCACAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAACCTCCTCCGAAGGCAATCTAAGCCCTTC 540
C4           ACTCACAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAACCTCCTCCGAAGGCAATCTAAGCCCTTC 540
C5           ACTCACAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAACCTCCTCCGAAGGCAATCTAAGCCCTTC 540
C6           ACTCACAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAACCTCCTCCGAAGGCAATCTAAGCCCTTC 540
C7           ACTCACAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAACCTCCTCCGAAGGCAATCTAAGCCCTTC 540
C8           ACTCACAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAACCTCCTCCGAAGGCAATCTAAGCCCTTC 540
C9           ACTCACAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAACCTCCTCCGAAGGCAATCTAAGCCCTTC 540
C10          ACTCACAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAACCTCCTCCGAAGGCAATCTAAGCCCTTC 540
C11          ACTCACAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAACCTCCTCCGAAGGCAATCTAAGCCCTTC 540
C12          ACTCACAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAACCTCCTCCGAAGGCAATCTAAGCCCTTC 540
C13          ACTCACAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAACCTCCTCCGAAGGCAATCTAAGCCCTTC 540
C14          ACTCACAAGTCAAATGGAAACCTTCCACTCAACCTCCTCCGAAGGCAATCTAAGCCCTTC 540
*****E*****

```

```

M17212      TCAAGTCTCCACAACATCCGAGCACCCATCACAACCCTCATCTCCACCAACACAACACG 600
C1           TCAAGTCTCCACAACATCCGAGCACCCATCACAACCCTCATCTCCACCAACACAACACG 600
C2           TCAAGTCTCCACAACATCCGAGCACCCATCACAACCCTCATCTCCACCAACACAACACG 600
C3           TCAAGTCTCCACAACATCCGAGCACCCATCACAACCCTCATCTCCACCAACACAACACG 600
C4           TCAAGTCTCCACAACATCCGAGCACCCATCACAACCCTCATCTCCACCAACACAACACG 600
C5           TCAAGTCTCCACAACATCCGAGCACCCATCACAACCCTCATCTCCACCAACACAACACG 600
C6           TCAAGTCTCCACAACATCCGAGCACCCATCACAACCCTCATCTCCACCAACACAACACG 600
C7           TCAAGTCTCCACAACATCCGAGCACCCATCACAACCCTCATCTCCACCAACACAACACG 600
C8           TCAAGTCTCCACAACATCCGAGCACCCATCACAACCCTCATCTCCACCAACACAACACG 600
C9           TCAAGTCTCCACAACATCCGAGCACCCATCACAACCCTCATCTCCACCAACACAACACG 600
C10          TCAAGTCTCCACAACATCCGAGCACCCATCACAACCCTCATCTCCACCAACACAACACG 600
C11          TCAAGTCTCCACAACATCCGAGCACCCATCACAACCCTCATCTCCACCAACACAACACG 600
C12          TCAAGTCTCCACAACATCCGAGCACCCATCACAACCCTCATCTCCACCAACACAACACG 600
C13          TCAAGTCTCCACAACATCCGAGCACCCATCACAACCCTCATCTCCACCAACACAACACG 600
C14          TCAAGTCTCCACAACATCCGAGCACCCATCACAACCCTCATCTCCACCAACACAACACG 600
*****

```

```

M17212      CCAGTAGTTATT 612
C1           CCAGTAGTTATT 612
C2           CCAGTAGTTATT 612
C3           CCAGTAGTTATT 612
C4           CCAGTAGTTATT 612
C5           CCAGTAGTTATT 612
C6           CCAGTAGTTATT 612
C7           CCAGTAGTTATT 612
C8           CCAGTAGTTATT 612
C9           CCAGTAGTTATT 612
C10          CCAGTAGTTATT 612
C11          CCAGTAGTTATT 612
C12          CCAGTAGTTATT 612
C13          CCAGTAGTTATT 612
C14          CCAGTAGTTATT 612
*****

```

Cálculo del error:

7 mutaciones en 14 clones de 617 pb

$7/(617 \times 14) = 8,1 \times 10^{-4}$ mutaciones incorporadas/nt secuenciado