

Epidemiología molecular del virus sincicial respiratorio en pacientes pediátricos en un período de seis años*

Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in pediatric patients in a six-year period

► Mariana Viegas¹

¹ PhD Bioquímica

* Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez. Gallo 1330 2º
Tel. 54-11-49643118 (C1425EFD)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Resumen

El virus sincicial respiratorio humano (HRSV) es la principal causa de infección respiratoria aguda baja (IRAB) grave en niños pequeños, no existiendo una vacuna eficaz para prevenirlo. Se analizaron muestras de aspirados nasofaríngeos de pacientes hospitalizados por IRAB en un período de seis años (1999-2004). Por RT-PCR se subtipificaron 353 muestras positivas para HRSV por inmunofluorescencia directa. Entre éstas, 65,7% pertenecieron al subtipo A y 34,3% al subtipo B. Por amplificación, RFLP y secuenciación del gen de la glucoproteína G, principal antígeno neutralizante, se estudiaron las relaciones filogenéticas. Para el subtipo A, se encontraron dos patrones de restricción principales (PA1 y PA2) y dos genotipos, GA2 y GA5, que cocircularon durante el período analizado. El análisis filodinámico determinó alternancia en la circulación de clados genéticos en el tiempo entre Argentina y otros países, mientras que otros cocircularon globalmente. El análisis del subtipo B, permitió describir un evento genético inusual, la duplicación de un segmento de 60 nucleótidos. Filodinámicamente se demostró que estos virus, denominados BA, circularon en Argentina durante todo el período analizado, asociándose con cepas del resto del mundo y mostrando un ancestro en común que probablemente se haya generado en Argentina entre 1997 y 1999. Este trabajo contribuye a un mejor conocimiento evolutivo del virus, dándole un rol fundamental al laboratorio de virología en la vigilancia molecular activa.

Palabras clave: virus sincicial respiratorio humano * Argentina * estacionalidad * epidemiología molecular * filodinámica * duplicación de 60 nucleótidos

Summary

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is the leading cause of acute lower respiratory tract infections (ALRI) in children. Despite considerable efforts there is as yet no satisfactory vaccine available. In this work, nasopharyngeal aspirates taken from hospitalized children with ALRI were analyzed over six consecutive epidemic seasons (1999-2004). By RT-PCR, 353 positive samples for HRSV by direct immunofluorescence were subtyped. Among them,

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

65.7% belonged to subtype A and 34.3% to subtype B. Therefore, a phylogenetic analysis was performed using RFLP and sequence analysis of the G-glycoprotein gene, the main neutralizing antigen. The results for A subtype, showed that there were two main restriction patterns (PA1 and PA2) and two genotypes (GA2 and GA5) cocirculating during the period studied. The phylogenetic analysis showed that there were some genetic clades which along this period of time alternated their circulation between Argentina and other countries and that other clades cocirculated worldwide. The subtype B analysis enabled the description of an unusual genetic event such as a 60 nucleotide duplication. The phylogenetic analysis showed that all of these viruses, designated BA, circulated in our country during the period studied and were associated with strains reported worldwide, showing a common ancestor which had probably been generated in a single genetic event between 1997 and 1999 in Argentina. This work contributes to a better understanding of this virus evolution, giving a fundamental role to the virology laboratory in the active molecular surveillance.

Keywords: human respiratory syncytial virus * Argentina * seasonality * molecular epidemiology * phylogenetic * sixty nucleotide duplication

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, 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 humanos tipos 1, 2 y 3 (HPIV1, HPIV2 y HPIV3 respectivamente), hallados principalmente en recién nacidos y niños menores de cinco años (1)(2). A partir del año 2000, la descripción y/o surgimiento de nuevos virus asociados con procesos respiratorios, entre ellos metaneumovirus humanos (HMPV), nuevos coronavirus SARS-CoV, NL63 y HKU1, influenza H5N1 (Flu H5N1), bocavirus humanos (HBoV), rinovirus (RV) y enterovirus humanos (HEV) 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 México,

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*) (3). 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 (4).

Aunque 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 (5). Entre los síndromes clínicos más frecuentemente asociados con IRAB se encuentran la bronquiolitis, la neumonía, la neumonitis y el síndrome coqueluchoide (6). 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 fre-

cuenta seguida por HAdV, FluA y HPIV o que HPIV predomina por sobre FluA y HAdV (1) (2) (6) (7). A partir del año 2001 se ha descrito un nuevo agente viral productor de IRAB, llamado HMPV, 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 (8-10).

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 (11). 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 (12). Por otro lado, en los países tropicales el aumento se relaciona con la estación lluviosa del año (13).

1.2. IRAB POR HRSV: EPIDEMIOLOGÍA DEL HRSV EN EL MUNDO Y EN LA 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 (14). 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 (15), 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 epi-

demia 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 (16). 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 (17). 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 (18). 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 (19). 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. Esta población tendría un rol importante en la propagación de la infección por HRSV en los hospitales (20) (21), mientras que en las familias el virus se introduce primariamente por los niños pequeños en 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 (22).

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 estimaron que la tasa de mortalidad estaba entre 0,5-2,5% de los niños hospitalizados con infección por HRSV (23). Con el advenimiento de unidades de terapia intensiva pediátricas más modernas y efectivas, se ha disminuido ese porcentaje a 0,3-1,0% de los niños hospitalizados (24). En Argentina en el año 2003, el 10% de las muertes en niños menores de cinco años se debieron a afecciones respiratorias (25). 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 (26) (27).

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 a personas mayores de 65 años (28).

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 (29)(30).

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 (31). 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 entre el 1er y 3er 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 sobrepasarán 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. 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 (32).

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 (33)(34). No obstante, la pregunta fundamental entre causa *versus* asociación continúa sin resolverse (35-37).

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

(38). 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 (39). 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 (40). 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 (41). 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 (42). La respuesta inflamatoria a la infección por HRSV se inicia probablemente en las células del epitelio respiratorio. Estas células producen una serie de citoquinas y quimioquinas en respuesta a las infecciones virales. Los pacientes con bronquiolitis por HRSV producen interleuquina 1, factor de necrosis tumoral α , interleuquina 6, interleuquina 8, proteína inflamatoria de macrófagos 1 α y la proteína RANTES en las vías aéreas (43). En respuesta a las citoquinas, se produce una in-

filtración 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. 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 (43). Legg *et al.* 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 (44). 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 (45). Otros autores han encontrado que la presencia de ciertos polimorfismos de nucleótidos simples en el *TLR4* se asocia significativamente con un mayor riesgo de desarrollar una infección severa por HRSV (46).

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. 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 (47).

Numerosos estudios han demostrado que las glucoproteínas de superficie F y G 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 (47). 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 (48).

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 (43). 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 HPIV1-3, particularmente el virus de HPIV3, 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 nasofaríngeos. 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 ensayo inmunoenzimático (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 (49).

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. El aislamiento viral en cultivo sigue siendo considerado la "técnica de oro" para el diag-

nóstico, 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" (49).

La RT-PCR es muy útil y ha demostrado ser una herramienta diagnóstica muy sensible tanto en los lactantes como en los adultos. 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. 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 hibridación 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. 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 (49).

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 (49). 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 (50). La detección de IgM anti HRSV puede ser utilizada para el diagnóstico en adultos (51).

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. Los corticosteroides son comúnmente usados como terapia antiinflamatoria, aunque también es discutida su utilidad (52).

Actualmente, la única terapia antiviral disponible es la ribavirina (análogo sintético de guanosina). 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. No obstante, el uso de ribavirina ha sido limitado debido a que es muy costoso

y su utilidad continúa siendo controvertida (53). 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.

1.8. PROFILAXIS

1.8.1. Vacunas

No existe aún una vacuna aprobada. 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 (54-56). A excepción de la proteína L (polimerasa), todas las proteínas del HRSV fueron probadas para inmunogenicidad y protección (56) (57). 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 (58-61). 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 (62) (63).

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) (63). 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 (64).

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 (65). Desafortunadamente, la utilización del palivizumab es costosa y existe preocupa-

ción 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 (66) (67). 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 (68). Esto 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 (69). 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 (70) (71).

1.9.1.2. Clasificación y estructura

El HRSV pertenece al género *Pneumovirus*, subfamilia *Pneumovirinae*, familia *Paramyxoviridae*, orden *Mono-negavirales* (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 (8).

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.

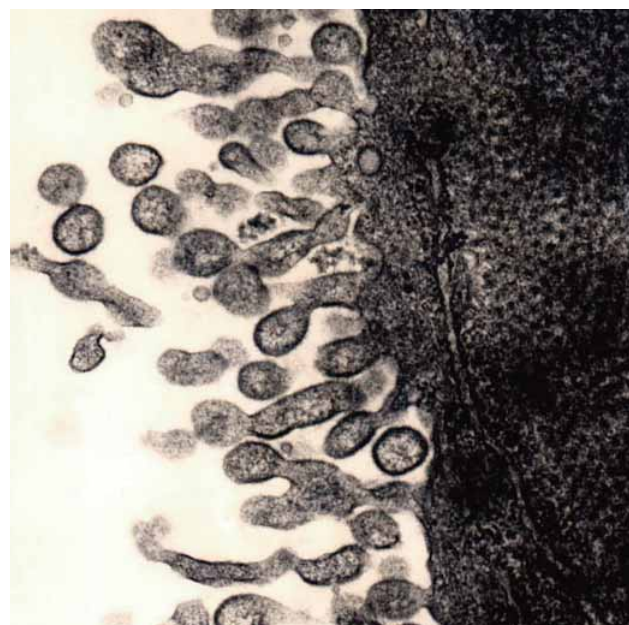


Figura 1. Microscopía electrónica de la liberación de un paramyxovirus de la superficie apical de células infectadas. Se observan viriones con formas esféricas y filamentosas brotando de la superficie celular (72).

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).

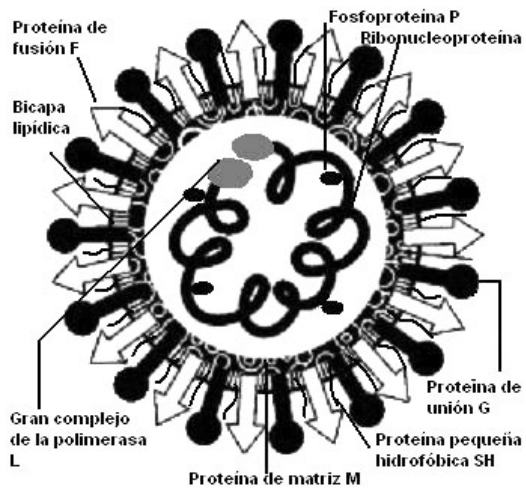


Figura 2. Estructura esquemática del virión del RSV (73).

1.9.2. Genoma del RSV

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 (74). Tanto el ARN genómico (polaridad negativa) como el antígenómico (polaridad positiva) están constante 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. En el extremo 3' y 5' del ARN genómico se encuentran regiones extragénicas: una secuencia líder (Le) y una secuencia tráiler (Tr), respectivamente (75). 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).

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 (77). Estas proteínas subvierten la respuesta celular de IFN, reduciendo la expresión de los genes del mismo (78). Recientemente se demostró que la expresión temprana de estas proteínas aumentaría la replicación viral, mediante el retraso de la muerte celular programada (apoptosis) (79).

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 antígenómico 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 encapsular ARN. La coexpresión intracelular de N y P resulta en la formación del complejo N-P. Esta interac-

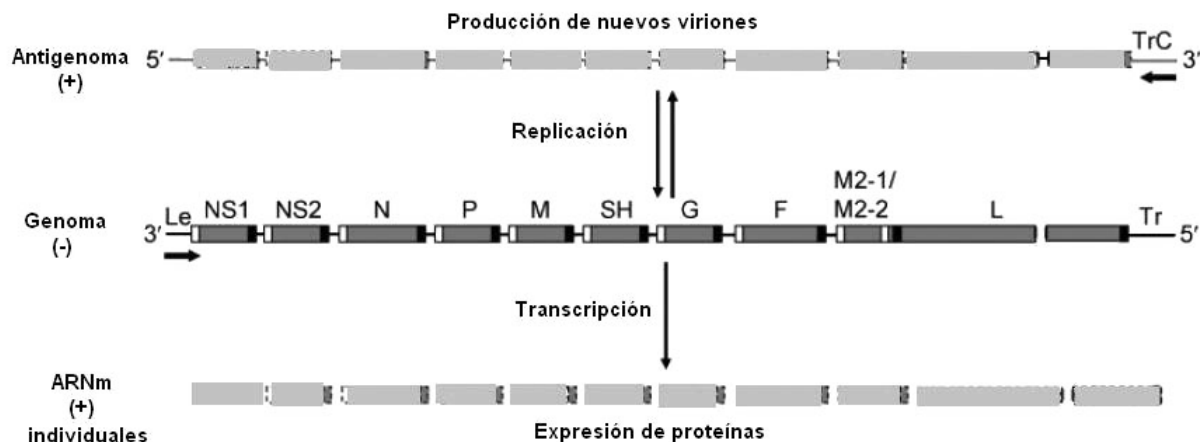


Figura 3. Representación esquemática del genoma, antígenoma y ARNm de RSV (76).

ción promueve el plegamiento correcto de la proteína N y la encapsidación específica del genoma (80). También, se cree que la disponibilidad de la proteína N soluble regularía la replicación del ARN viral (81).

Proteína P

Esta proteína consta de 241 aminoácidos. En las viriones se encuentra principalmente en su forma fosforilada, forma en la que es funcional (82).

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 (83).

Proteína M2

El ARN mensajero de M2 tiene dos marcos de lectura abiertos (84):

- 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. Asimismo, incrementa la frecuencia de la lectura a través de las señales de terminación de la transcripción en los extremos de los diferentes genes (85).

M2-2

El marco de lectura de M2-2 es expresado por un mecanismo inusual de traducción secuencial de terminación-reiniciación. Esta proteína es un factor regulatorio de la síntesis de ARN, disminuyendo la transcripción y favoreciendo la replicación (86).

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 (87).

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 ARNms 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 (88) (89). Además actúa como factor de inhibición de la transcripción viral previo a la encapsidación (90).

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 (91).

No se conoce exactamente la función de esta proteína, pero algunos estudios proponen que podría participar en la fusión viral (92), o en el cambio de la permeabilidad de la membrana (como la proteína M2 de influenza A) (93). 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 (94).

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 generando dos polipéptidos unidos por puentes disulfuro, uno es F2 proveniente del extremo N-terminal y el otro F1 correspondiente al extremo C-terminal (95). De las tres secuencias hidrofóbicas presentes en el polipéptido F, hay una ubicada en el extremo N-terminal de la cadena F1 que se denomina péptido de fusión, el cual se supone que se inserta en la membrana de la célula blanco durante el proceso de fusión.

La proteína F puede mediar la entrada y la formación de sincicios independientemente de las otras proteínas de membrana de RSV (G y SH) (96), aunque se demostró que estas últimas incrementan la eficiencia del proceso (97).

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 (98).

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 (99). 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 (100). 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 (101).

Proteína de unión G:

La proteína G es la principal proteína de unión al receptor del RSV (102). 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).

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 (103). 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-traduccional 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 (104). 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- β -1-3-N-acetilgalactosamina (105). La Figura 4 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 (Figura 4). 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 4). 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 (106). 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 (107). 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 (108). 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.

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

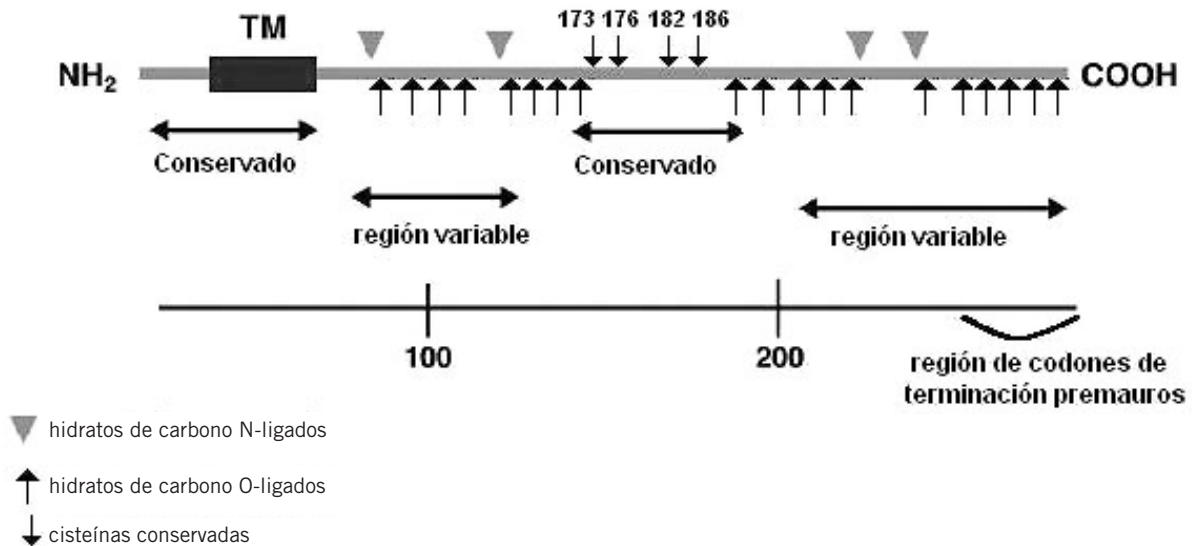


Figura 4. Representación de la estructura primaria de la glucoproteína G.

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 (109).

aminoácidos mencionada se encuentra en dos regiones variables (RV) localizadas a ambos lados del dominio central rico en Cys (Figura 4). 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 (110). 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 (111) (112). 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 epítopos conservados y también cepa específicos). Recientemente se describieron en Argentina tres aislamientos de HRSV subtipo B con una duplicación de 60 nucleótidos en la 2ª región variable (113). 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 (114). 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.

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 (115). 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. Du-

rante 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' (116-118). Éste es el principal mecanismo de control de expresión de genes en RSV (119).

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 (119).

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" (ricos en colesterol, esfingolípidos y proteínas aciladas), en los cuales se asocian las glucoproteínas de transmembrana conformacionalmente maduras G, F y SH (120). Se supone que esta asociación está facilitada por la interacción entre los dominios citoplasmáticos de las glucoproteínas y la proteína M. 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 (121).

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 RSVA2 y RSVCH18537/63, las cuales ahora representan a los dos grupos antigénicos A y B, respectivamente (122). 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 (112). 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 (123), los cuales correlacionaron con dos grupos genéticamente distintos (124). La identidad en nucleótidos del genoma completo entre las cepas A y B es del 81% (112). 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 (RSVA2) y subtipo B (RSVCH18537/63) (125).

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 (125).

La proteína G ha sido exhaustivamente estudiada, principalmente porque esta proteína es el producto del gen con mayor variabilidad genética y antigénica entre aisla-

mientos. 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 (126); análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (127); análisis de movilidad de heterodúplex (128) y determinación de secuencia nucleotídica para la elaboración de árboles filogenéticos (37). 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 (Figura 4), mientras que las mutaciones silentes (sustituciones sinónimas) están uniformemente distribuidas (129). Las epidemias son comúnmente producidas por los dos subtipos antigénicos, clasificados en más de un genotipo. Estos genotipos, definidos sobre la base de la secuencia de G, se pueden clasificar en clados genéticos bien diferenciados. Aunque a nivel local, los genotipos predominantes de una epidemia son frecuentemente reemplazados por otros genotipos en años consecutivos (130), 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 (131). 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 (132). 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 (129).

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 modelo de transmisión y generación de variabilidad estacional, dónde queda alojado el virus entre brotes y por qué se producen reinfecciones en el transcurso de la vida. En este sentido, 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 virales como rinovirus, HAdV o HPiV 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 de lo expuesto y 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, es que se ha planteado este trabajo durante un período de seis años estudiando cómo fue la circulación de este virus a nivel local y global. Pensando que 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 pasaría por los distintos brotes invernales (o estación lluviosa en países tropicales) y así no cortarían su cadena de transmisión. Así es como en la próxima sección se describirán los aportes propios a estos tópicos mencionados, y en el cual se plantea el objetivo general de ampliar el conocimiento sobre la epidemiología general y molecular del HRSV en pacientes pediátricos en la ciudad de Buenos Aires, Argentina profundizando los conocimientos sobre la evolución molecular del HRSV subtipos A y B y su relación con la circulación local y global.

2. Epidemiología molecular del virus sincicial respiratorio en un período de seis años (1999-2004) en Buenos Aires, Argentina

2.1. MARCO EPIDEMIOLÓGICO DE LAS IRAB EN PACIENTES PEDIÁTRICOS EN LA CIUDAD DE BUENOS AIRES EN UN PERIODO DE SEIS AÑOS (133).

Durante los seis períodos epidémicos consecutivos estudiados fueron remitidas al Laboratorio de Virología del Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez (HNRG), un total de 22.416 muestras de aspirados nasofaríngeos (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 (134). Este último es el método de elección para diagnóstico de pacientes pediátricos ya que permite rápidamente procesar a diario un elevado número de muestras clínicas. 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 pe-

ródos 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. 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. En la Tabla II 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); HPIV 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 HPIV 1, 2 y 3 y del 0,12% para FluB (diferencias estadísticamente significativas con respecto a HRSV; $p < 0,0001$). En la bibliografía no existe consenso con respecto a la frecuencia y prevalencia respecto de los virus restantes al HRSV estudiados, principalmente debido a los diversos métodos de detección utilizados, las poblaciones en estudio y los criterios de selección de las mismas.

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 ($N=802$, $p < 0,0001$) (Tabla II). Incluso, como fue mencionado previamente el número total de IRAB con etiología viral positiva para los virus analizados fue significativamente menor ese año. 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 Argentina, 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 (135). 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 (136). 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: HMPV, rinovirus, bocavirus, etc).

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. Esto 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 (137-140). 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 HPIV compensaron parcialmente la ausencia de FluA durante ese año (9,7 y 10,2%, respectivamente).

Cada ANF recibido en el laboratorio estaba acompañado de una ficha clínica en la que se detallaba: el sexo

Tabla II. Distribución anual del número de casos y frecuencias de los virus respiratorios analizados encontrados en niños menores de cinco años con IRAB en un período de 5 años. Los números y porcentajes correspondientes al HRSV están remarcados en negrita. Las frecuencias están calculadas en relación al número total de casos positivos.

AÑO	Número de muestras analizadas	Número de casos con etiología viral (% del total de muestras)	HRSV (%)	HAdV (%)	HPIV	FluA (%) 1, 2 y 3 (%)	FluB (%)
1999	4.008	1.050 (26,2)	802 (76,4)	97 (9,2)	38 (3,6)	112 (10,7)	1 (0,09)
2000	3.788	1.542 (40,7)	1.317 (85,4)	74 (4,8)	71 (4,6)	76 (4,9)	4 (0,3)
2001	3.458	1.326 (38,3)	1.030 (77,7)	54 (4,1)	21 (1,6)	219 (16,5)	2 (0,1)
2002	3.849	1.416 (36,8)	1.129 (79,7)	137 (9,7)	144 (10,2)	0 (0)	6 (0,4)
2003	3.783	1.825 (48,2)	1.361 (74,6)	173 (9,4)	101 (5,5)	188 (10,3)	2 (0,1)
2004	3.530	1.683 (47,7)	1.453 (86,3)	59 (3,5)	44 (2,6)	115 (6,8)	12 (0,7)
TOTAL (%)	22.416	8.842 (39,45)	7.092 (80,2)	594 (6,72)	419 (4,74)	710 (8,2)	27 (0,3)

del paciente, la edad, el diagnóstico clínico y días de internación entre otros datos. En la Figura 5, 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 ($r^2=0,8$). 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 6), mostrando que a medida que nos posicionamos en menores edades, la incidencia de HRSV como productor de bronquiolitis y neumonía fue mayor.

La distribución mensual de la incidencia de los virus respiratorios analizados durante el período en estudio

se grafica en la Figura 7. En la misma se observa que la mayor incidencia del HRSV y FluA fue durante el período invernal, mientras que los restantes HPIV 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. 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. El análisis que correlacionó al HRSV con la humedad relativa promedio arrojó un valor positivo estadísticamente significativo ($0,6$, $p<0,0001$).

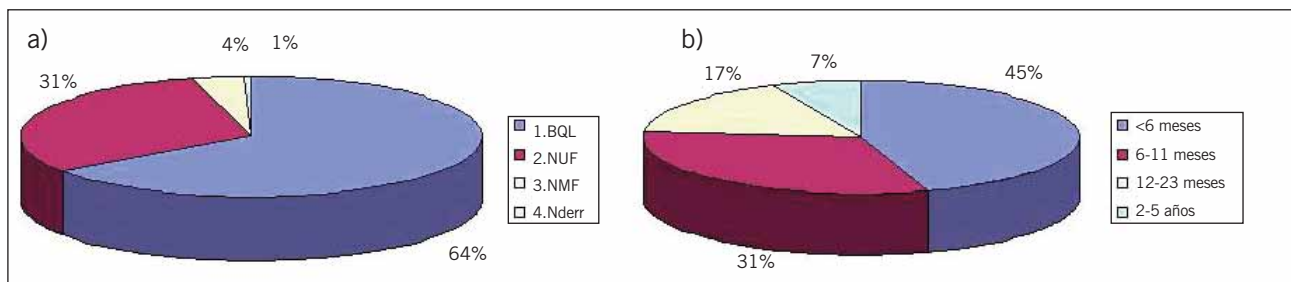


Figura 5. a) Diagnóstico clínico diferencial de las IRAB producidas por HRSV, BQL: bronquiolitis, NUF: neumonía focal; NMF: neumonía multifocal y Nderr: neumonía con derrame; b) Distribución de edades de los pacientes con diagnóstico del HRSV positivo.

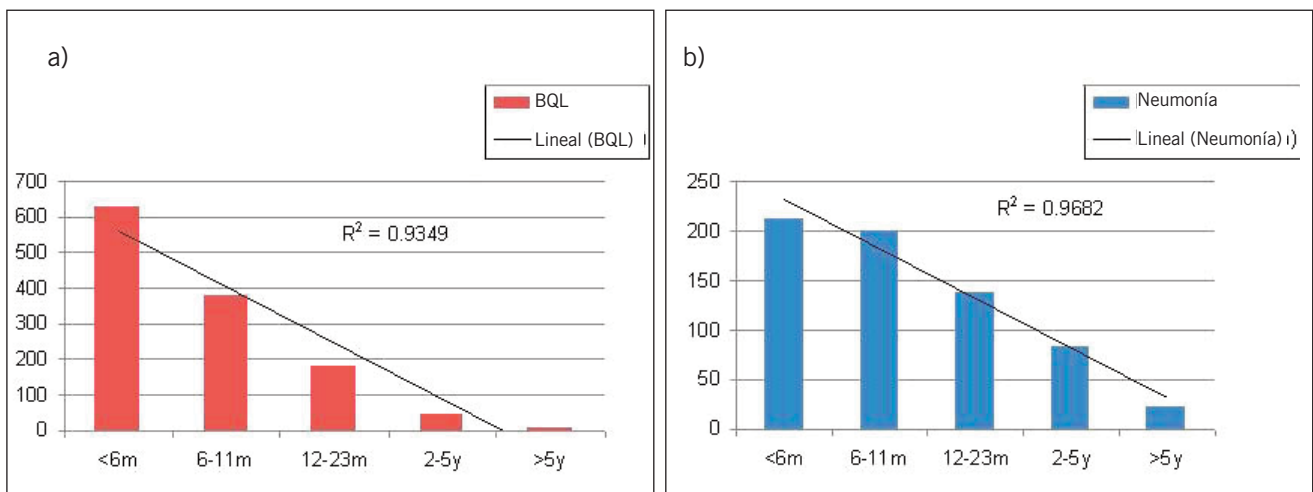


Figura 6. Correlación negativa entre la edad en meses y el número de casos con: a) bronquiolitis (BQL) y b) neumonía (NM). En el eje Y se representa el número de pacientes, mientras que en el eje X la edad en meses (m) y en años (a).

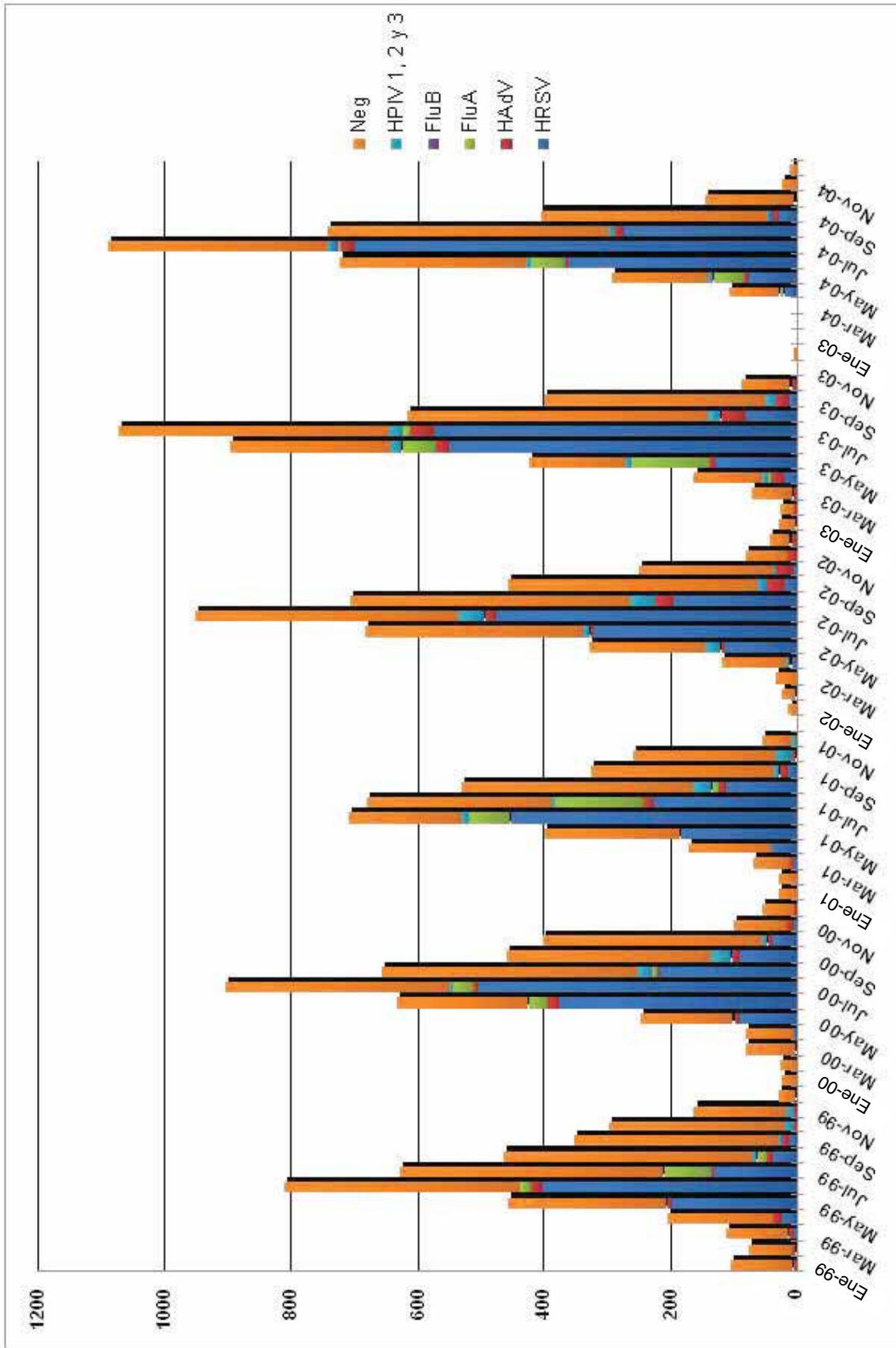


Figura 7. Distribución mensual de los virus respiratorios analizados en el período 1999-2004. En el eje Y se representa el número de casos con la etiología viral correspondiente encontrada, mientras que en el eje X los meses-años del período en estudio.

Los últimos datos presentados muestran una clara tendencia cíclica anual para el HRSV, como ha sido informado previamente (6) (141). 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. 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 aclaramiento 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 (142) (143). 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. La asociación inversa significativa encontrada con la temperatura media mensual y la radiación solar UVB por un lado, mientras asociación positiva significativa con la humedad relativa por el otro, muestran que el HRSV 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). Esto 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 (144-146). 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 endémico (133). La posibilidad de 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 propa-

gación de resistencia a los mismos, así como a tomar los recaudos necesarios en cuanto al aislamiento de los pacientes susceptibles en determinadas épocas del año. También, instaurar terapias preventivas en pacientes con riesgo de infección severa, 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.

2.2. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL HRSV

2.2.1. Distribución de subtipos del HRSV (147)(148).

Como primer objetivo de la caracterización molecular de los HRSV se propuso determinar los subtipos virales circulantes en el período de análisis. Para tal fin fue escogida una técnica de *multiplex* RT-PCR anidada (149). Para hacer este estudio se seleccionaron muestras al azar que representaron toda la duración del brote de cada año, durante los seis años analizados y algunas muestras esporádicas del año 1997. Se seleccionaron en total 353 muestras, de las cuales 232 muestras correspondieron al subtipo A y 121 al subtipo B (65,7% HRSV A y 34,3% HRSV B). 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 entre las siete muestras analizadas, cuatro pertenecientes al subtipo A y tres al B. Estos datos sugieren un rol importante para ambos subtipos en los brotes producidos por este virus en Argentina.

2.2.2. Análisis molecular del HRSV subtipo A (147)

2.2.2.1. 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 *HindII* debido a que existían trabajos previos en los que habían sido utilizadas para hacer este análisis (150). Los resultados de la totalidad de las muestras sometidas al análisis de RFLP se presentan en la Tabla III. Se encontraron cinco patrones de restricción individuales luego de la digestión con la enzima *RsaI*, dos con la *PstI*, y tres con la *HindII*. En total, el análisis de fragmentos de restricción mostró nueve patrones compuestos distintos (PA1-PA9) (Tabla III). La distribución anual de los patrones compuestos se muestra en la Figura 8. 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. Asi-

Tabla III. 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)

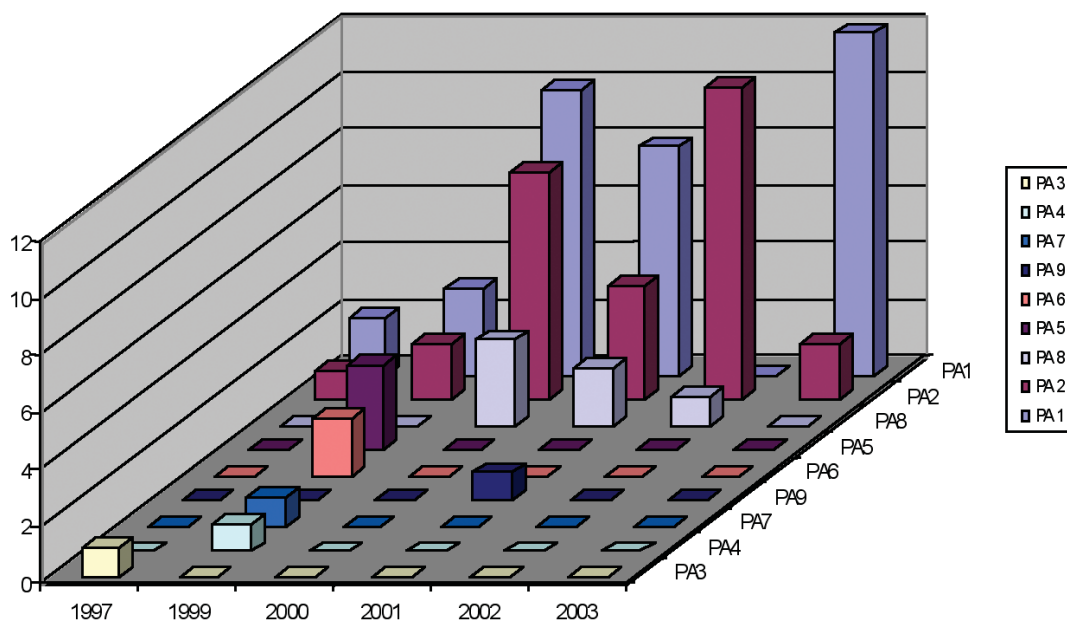


Figura 8. Distribución de patrones de restricción compuestos anuales en el período analizado. En el eje X se grafican los años, en el eje Y el número de muestras correspondientes a cada patrón y en el eje Z se indica cada patrón compuesto.

mismo, los dos últimos años sólo se encontraron los dos patrones principales PA1 y PA2 (Tabla III) (Figura 8).

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 (151), y eran comparables con los obtenidos de las muestras analizadas en este trabajo. 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 patrones compuestos año a año, mostró que no hubo alternancia entre los predominios 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. 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 (152), 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.

2.2.2.2. 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 Argentina 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. El fragmento de estudio de 605 nt de longitud contenía todo el ectodominio de la misma incluyendo las dos regiones variables flanqueando a una región central muy conservada. Se analizaron un total de 62 secuencias. Entre éstas, se encontraron cinco grupos con idénticas secuencias nucleotídicas, 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 distintos criterios de inferencia filogenética (análisis bayesiano, máxima verosimilitud (MV), parsimonia y distancia), para los cuales se obtuvieron de la base de datos de *GenBank* 105 secuencias del gen de la glucoproteína G. Estas secuencias se utilizaron como representativas de los distintos genotipos de HRSV subtipo A. Luego de determinar el modelo de sustitución nucleotídico que mejor se ajustaba a los datos (153), se aplicaron los métodos de análisis bayesiano (154) y MV (155). Para los árboles se fijó como secuencia de grupo externo (del inglés *outgroup*) a la cepa patrón RSVLong/56 (cepa más

antigua disponible en *GenBank*). En la Figura 9 se muestra el árbol obtenido mediante inferencia bayesiana. El resto de los análisis filogenéticos obtenidos por los restantes criterios de inferencia filogenética confirmaron la topología obtenida por el método mostrado y su robustez para asignar genotipos (árboles no mostrados).

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 9. 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, mostrando una ligera predominancia del último. En la Figura 10 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. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por investigadores de otras partes del mundo durante los últimos años (156-159). En concordancia, en países limítrofes como Uruguay y Brasil, la mayoría de los aislamientos de HRSV subtipo A correspondieron a los mismos genotipos descriptos en este estudio, no obstante también se encontraron cepas de los genotipos GA1 y GA7 (160) (161). Un trabajo realizado por un grupo de investigadores de CEMIC en Argentina 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 (29). 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 (30). Una razón que explique las diferencias mencionadas previamente en relación a lo descrito en este trabajo, 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

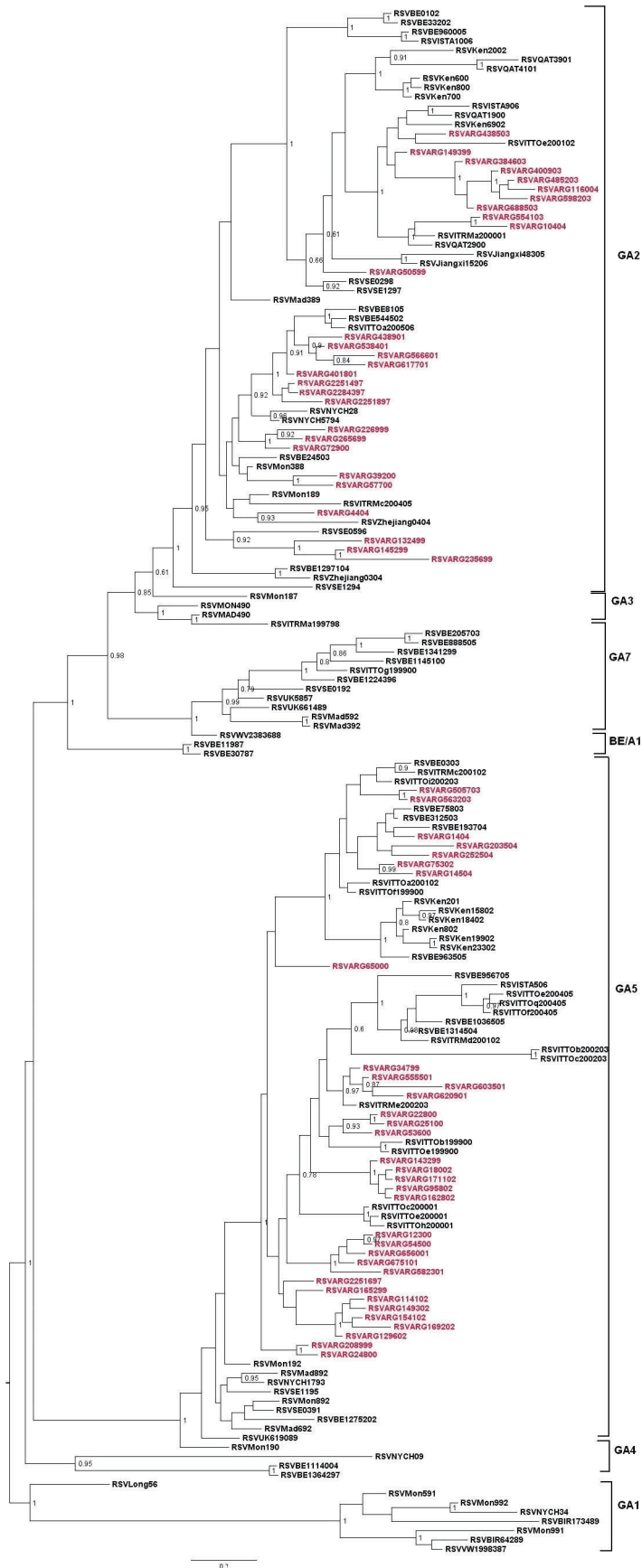


Figura 9. Árbol filogenético de cepas del HRSV subtipo A (secuencias de 605 nt del gen de la gluco-proteína G) construido por inferencia bayesiana (154). El modelo de sustitución nt determinado fue GTR+I+G. Los parámetros de la simulación de MCMC utilizados fueron 600.000 ngen, 1.000 samplefreq, 4 nchains, 1.000 burnin. Las cepas argentinas están resaltadas en color rojo. Sólo los valores de probabilidad posterior mayores a 0,6 son mostrados. La cepa RSVLong/56 fue utilizada como out-group.

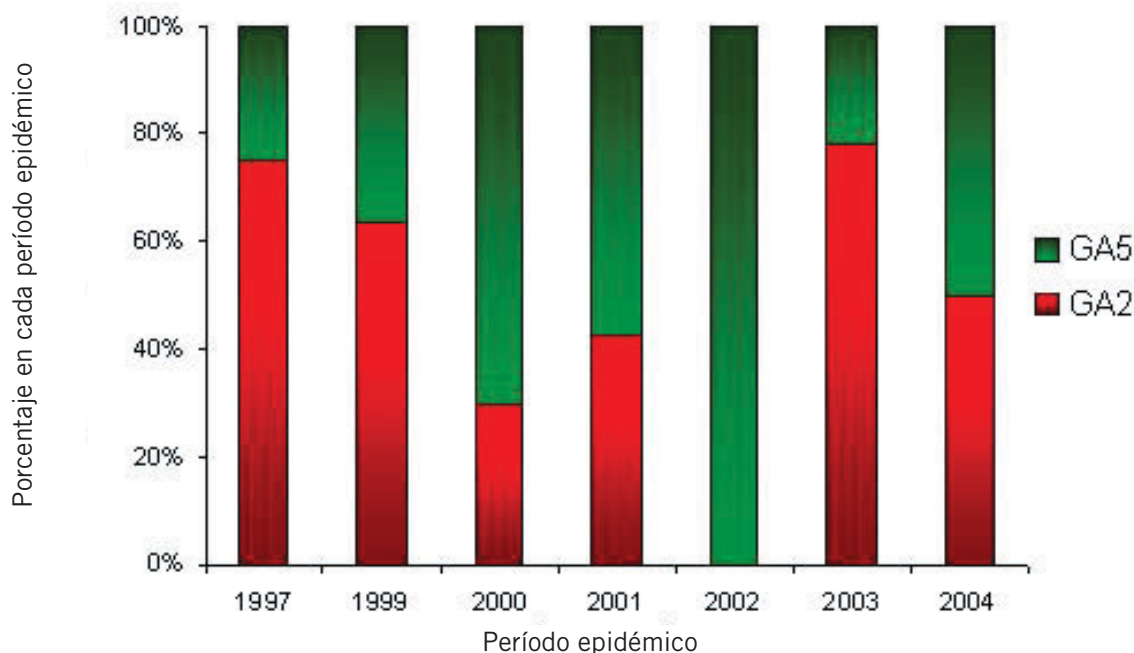


Figura 10. Distribución de genotipos del HRSV subtipo A durante el período 1999-2004, más casos esporádicos de 1997.

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 (131).

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. 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. 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 geno-

tipos que circularon con mayor frecuencia fueron los encontrados entre las cepas de Argentina, 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) (157).

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* (162) 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 (163). Inicialmente todas las secuencias argentinas del subtipo A fueron ingresadas al programa y se determinó que una distancia de Hamming 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 las distancias necesarias 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 Figuras 11-a) y b) se muestran los resultados del análisis por los dos métodos aplicados para cada genotipo.

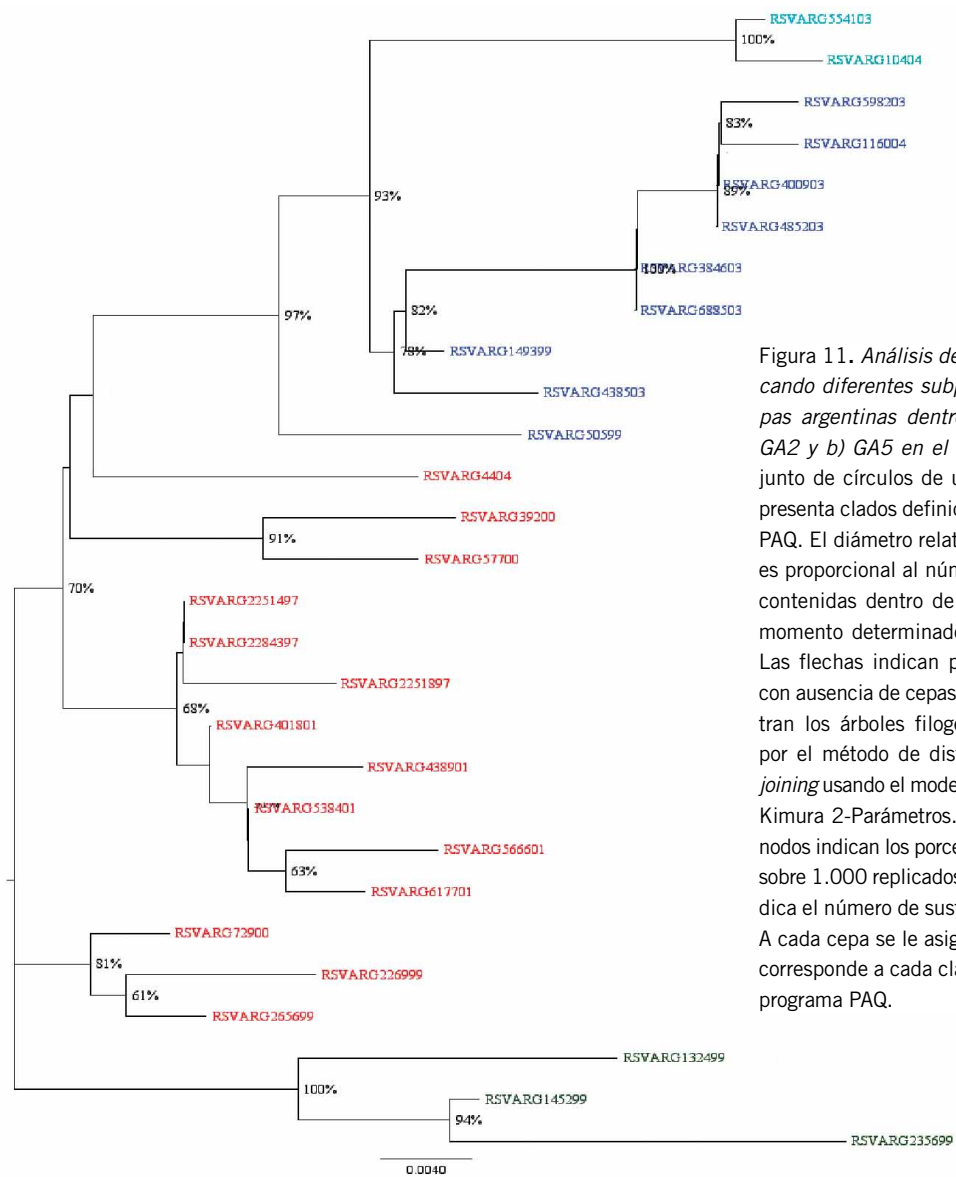
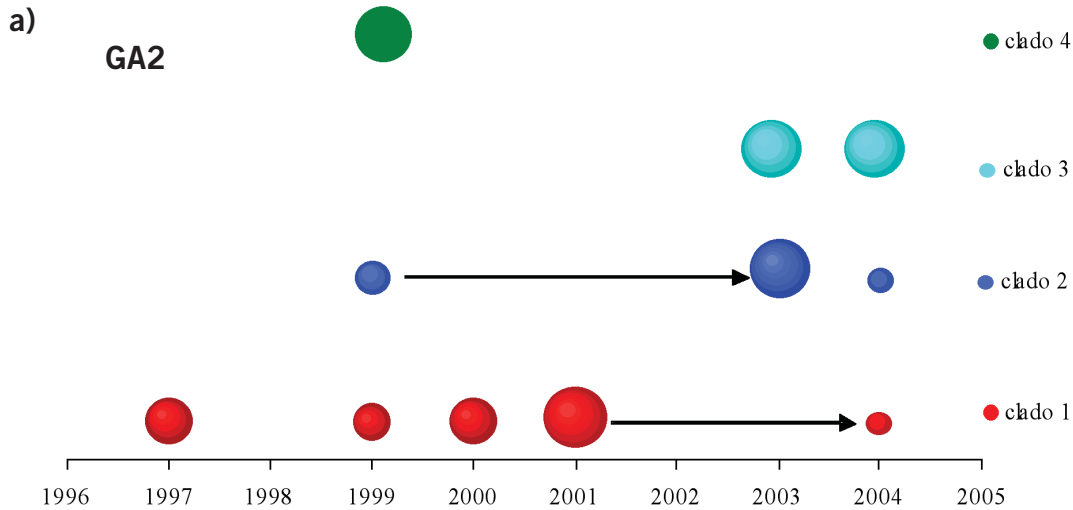
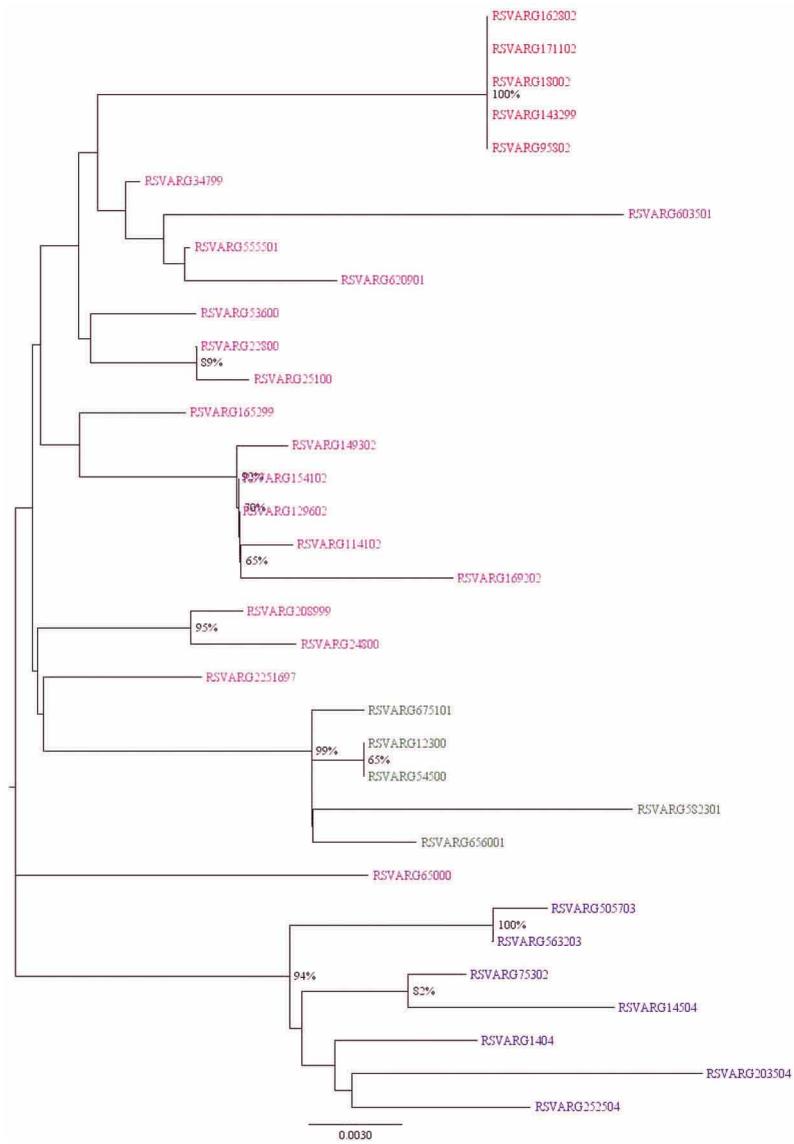
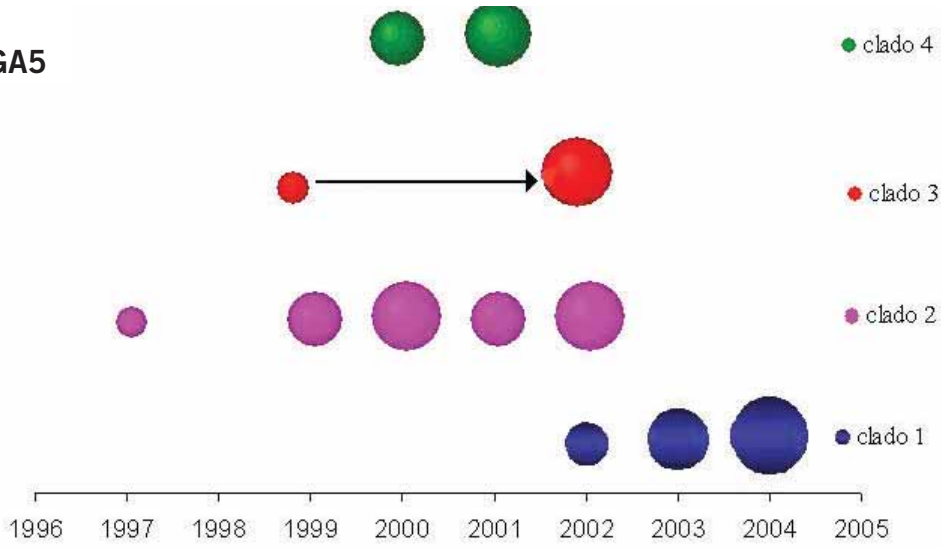


Figura 11. Análisis de Partición identificando diferentes subpoblaciones de cepas argentinas dentro los genotipos a) GA2 y b) GA5 en el tiempo. Cada conjunto de círculos de un mismo color representa clados definidos por el programa PAQ. El diámetro relativo de cada círculo es proporcional al número de secuencias contenidas dentro de cada clado en un momento determinado de tiempo (año). Las flechas indican períodos de tiempo con ausencia de cepas. 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.

b)

GA5



Para el caso del GA2, a partir de una distancia de Hamming 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 reemergieron 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 11-a) puede observarse como las cepas se asociaron en clados filogenéticos acordes con los resultados del análisis de partición.

Para el GA5 una distancia de Hamming de ocho generó cuatro subpoblaciones, particiones o clados (clados 1-4), los cuales pudieron asociar a las cepas en grupos no superpuestos. 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 11-b) puede observarse, como cepas pertenecientes a un clado como el 3 (rojo), 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 11-b)). 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 (164).

Analizando ahora 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*, se determinaron clados dentro de cada genotipo, los cuales asociaron o no a cepas argentinas con las reportadas en el resto del mundo. Esos clados se ubicaron geográficamente en un mapa planisferio, relacionados con los años de aislamiento. En las Figuras 12-a) 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.

Considerando la circulación a nivel global de los diferentes genotipos y linajes, el análisis de la Figura 12 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 Argentina 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 Argentina 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 Argentina 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 Argentina 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 Argentina en los años posteriores al 2004, podrían detectarse ambos linajes virales. El clado 1 (azul), se encontró en Argentina recién en 2002 y permaneció hasta 2004, mientras que había circulado en brotes anteriores en el resto de los continentes.

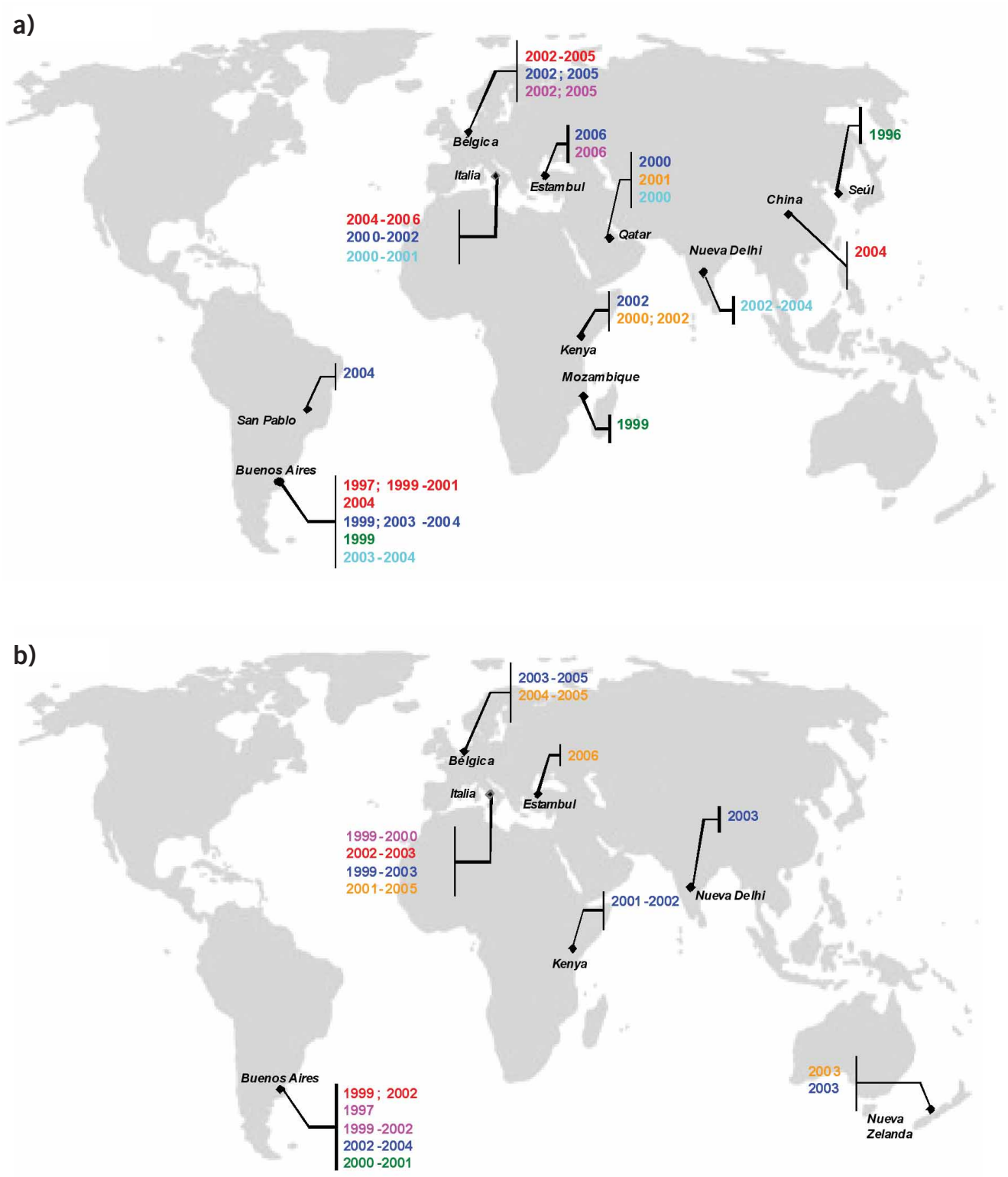


Figura 12. Distribución geográfica mundial de las secuencias del HRSV subtipo A. En cada país se indica el o los clados que fueron encontrados entre las secuencias reportadas y el año de aislamiento. a) Dentro del genotipo GA2 se indican el clado 1 (rojo); clado 2 (azul); clado 3 (celeste); clado 4 (verde); 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 11-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 11-b) del análisis de partición.

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 (164):

- 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 12 (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.

2.2.2.3. 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.

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 (165), 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). Una tasa de sustitución nucleotídica del orden de 10^{-3} sustituciones nt/sitio/año como la encontrada, ha sido observada 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 (166). 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, 157, 167). 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 gené-

ticas 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 (167).

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 selección purificadora ($\omega < 1$). 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 0,7212 ($p < 0,05$) 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 0,487 ($p < 0,05$) y no se encontró evidencia de selección positiva sobre ningún sitio, mientras que se encontraron 29 sitios

con probable selección negativa. Este análisis se realizó con las secuencias aminoacídicas inferidas a partir del ectodominio completo de la glucoproteína G, observándose las diferencias mencionadas, mientras que cuando se hicieron los cálculos utilizando sólo el tercio terminal de la proteína (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 del ectodominio de G). Se obtuvieron secuencias aminoacídicas consenso para ambos genotipos y ambos perfiles se analizaron con el programa Protean incluido en el paquete Lasergene (DNASTAR, Madison, Wis., EE.UU.) (Figura 13). La comparación para las secuencias consenso mostró que la mayoría de las regiones antigénicas en el tercio 3' terminal del ectodominio de G fueron muy similares para ambos genotipos. Mientras que para la primera región variable del ectodominio se observó que GA2 presentó al inicio de la secuencia dos regiones antigénicas más que GA5 (Figura 13). A parte de esto, se observó en ambos perfiles una región con menor índice de hidrofili- cedad que incluyó los aa 164 a 187, coincidentes con la zona de unión al receptor celular (zona altamente hidrofóbica).

De todo el análisis de variabilidad molecular realizado en los párrafos anteriores, surge que el genotipo GA5 es significativamente menos diverso que el GA2, tanto a nivel nucleotídico, como aminoacídico, conclusión que igualmente se desprende del análisis de los perfiles antigénicos. Estas diferencias encontradas podrían deberse a que sobre los genotipos estarían actuando diferentes fuerzas de selección. En este sentido, la relación global dN/dS calculada de 0,655 mostró cómo para estos virus existen más chances de fijarse las mutaciones no sinónimas que las sinónimas (selección positiva), a pesar de que al ser el valor < 1 en forma global actuaría una 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. 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

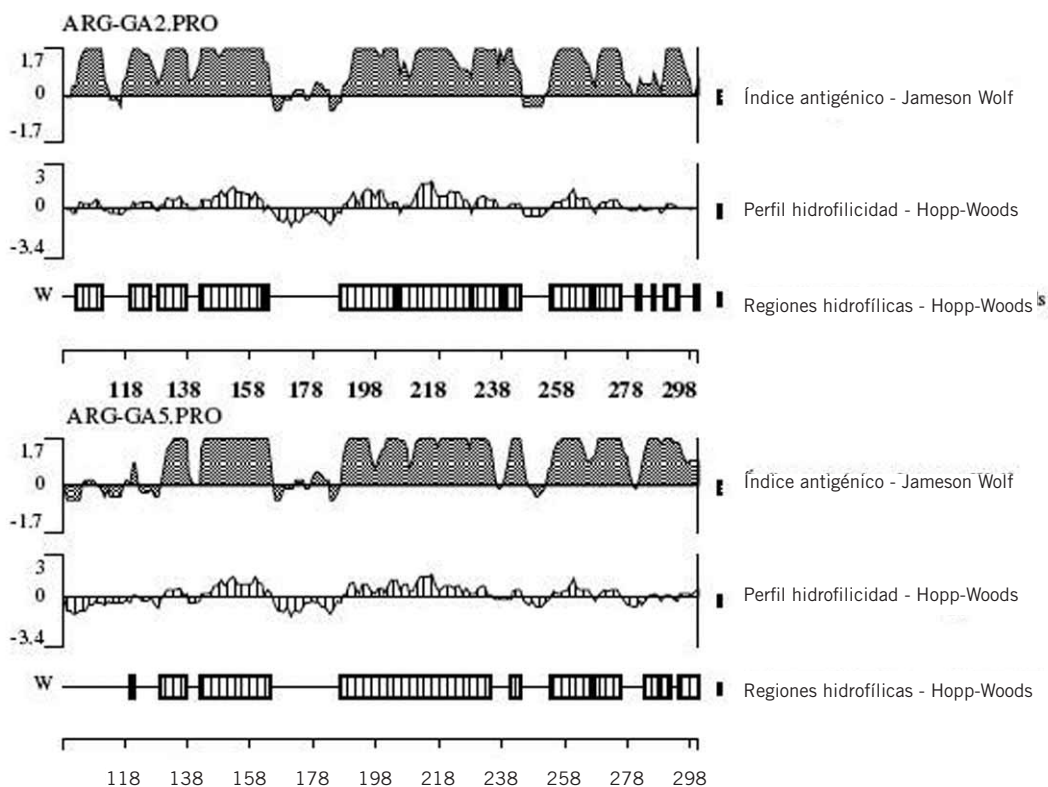


Figura 13. Comparación de perfiles antigénicos del ectodominio de la glucoproteína G completo. Las cepas argentinas correspondientes a cada genotipo fueron analizadas como secuencias consenso (ARG-GA2 y ARG-GA5) obtenidas con todas las secuencias argentinas de GA2 y GA5, respectivamente. El índice antigénico de James-Wolf y las regiones hidrofílicas de Hopp-Woods fueron obtenidos con el programa Protean. Los números de la regla corresponden a los aminoácidos 98 a 298 de la cepa de referencia RSVLong/56.

se realiza el análisis molecular, ya sea desde el punto de vista epidemiológico molecular, evolutivo, antigénico, etc., hacerlo sobre los genotipos en forma separada. Asimismo es de suma importancia tomar estos análisis a la hora de formular futuras vacunas contra este virus.

2.2.3. Análisis molecular del HRSV subtipo B (148)

2.2.3.1. 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.

De las 121 muestras correspondientes al subtipo B detectadas previamente por *multiplex* RT-PCR anidada, se amplificó el gen completo de la glucoproteína G durante el período de estudio (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

colaboradores en tres cepas del año 1999 (113). Para poder confirmar este hallazgo en las cepas analizadas en este trabajo, se decidió realizar a esas muestras una nueva RT-PCR amplificando un fragmento de menor longitud (471 nt) que permitió determinar que había una diferencia de tamaño en el gen de las muestras a las que se les había observado esa disminución en la migración. 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 (168).

En la Tabla IV 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.

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. Analizando la bibliografía disponible en relación a este hallazgo, sólo se encontró el trabajo de los colegas del CEMIC donde describían los tres aislamientos corres-

pondientes al año 1999 de HRSV subtipo B mencionados con características similares a las descritas aquí (113), no habiéndose encontrado ningún trabajo previo que informara este hallazgo.

2.2.3.2. Análisis filogenético y molecular

En 35 muestras se obtuvo la secuencia completa del gen de G, conteniendo las dos regiones variables, más la región transmembrana. Se intentó determinar con la secuenciación completa de G si en este caso habría en el resto del gen alguna deleción que compensara a la proteína que presentaba estas características. La secuenciación posterior del gen confirmó las observaciones previas, encontrándose una inserción de 60 nt. El análisis del total de las muestras correspondientes al subtipo B (N=121), permitió determinar que las cepas con la inserción (N=47) se mantuvieron circulando durante todo el período de estudio entre 1999 y 2004 (Tabla IV).

El alineamiento de nucleótidos de las secuencias obtenidas junto con las de las cepas encontradas por el grupo colega, más la cepa patrón RSVCH18537/63 permitió determinar que la inserción de 60 nt en el gen de la glucoproteína G era una duplicación que comenzaba en la posición nucleotídica 792 con respecto a la cepa patrón. No se encontraron inserciones, ni deleciones que compensaran esos 60 nucleótidos extra incorporados en la glucoproteína G. 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).

A pesar de que previamente al año 1999 se habían informado secuencias de la glucoproteína G de HRSV con duplicaciones o deleciones de uno a dos tripletes (129, 131), las mismas habían 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 IV). 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 (169), Japón (170), Nueva Zelanda (167), India (171) y Brasil (30) entre otros.

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.

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 (154), utilizando la cepa patrón RSVCH18537/63 como secuencia del grupo externo del árbol (*outgroup*) (Figura 14). En el árbol de la Figura 14 se puede observar que las secuencias se agruparon en un genotipo denominado de ahora en adelante BA 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.

El modelo de sustitución nt determinado fue TrN+G.

Tabla IV. 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 RSVCH18537/63, 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.

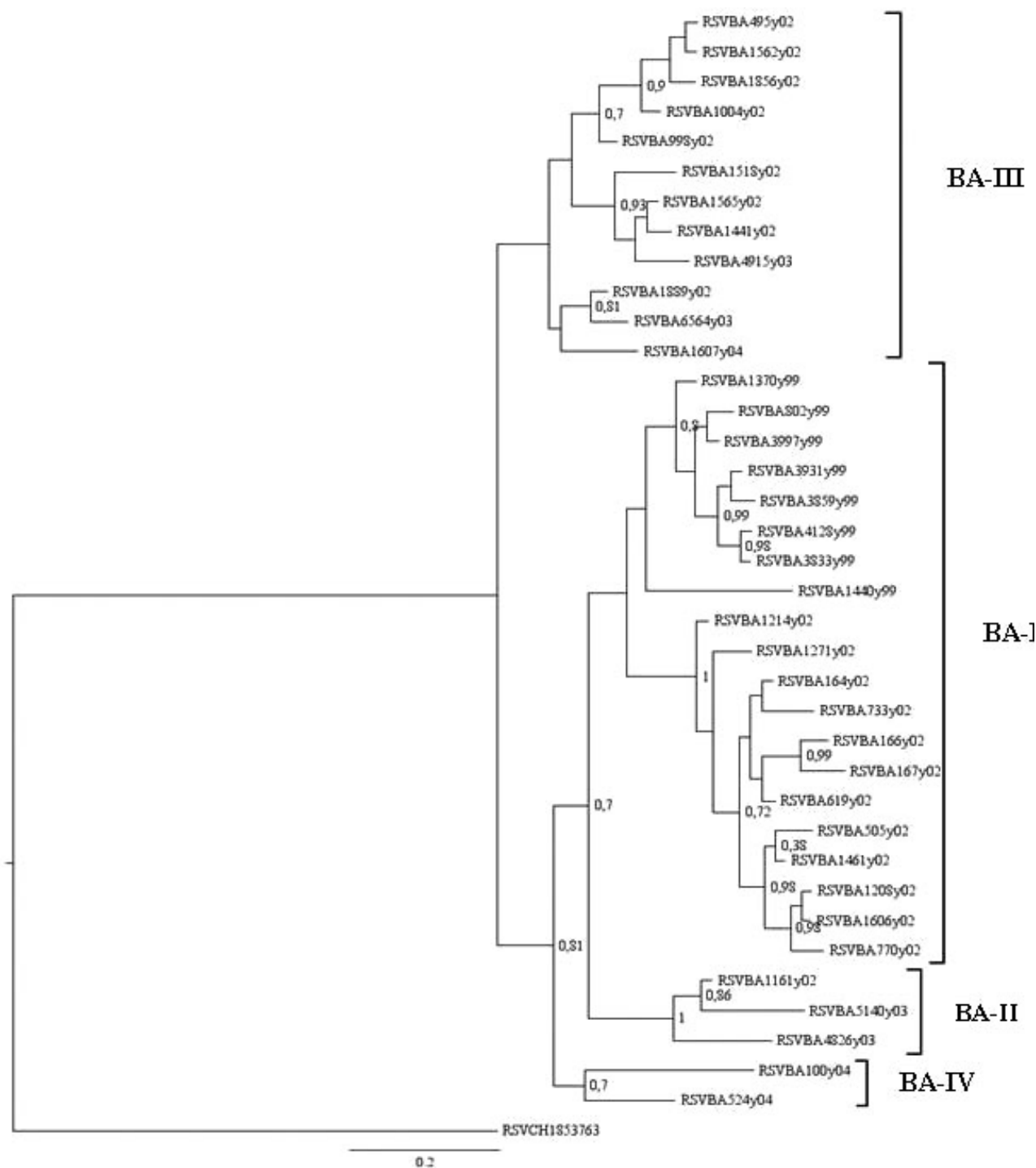


Figura 14. Análisis filogenético de secuencias completas del gen de la glucoproteína G del HRSV subtipo B con una duplicación de 60 nt, aisladas en la Argentina en el período 1999-2004 construido por inferencia bayesiana (154). Los parámetros de la simulación de MCMC utilizados fueron 600.000 ngen, 1.000 samplefreq, 4 nchains, 1.000 burnin. Sólo los valores de probabilidades posteriores mayores a 0,7 son mostrados. La cepa patrón RSVCH18537/63 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.

2.2.3.3. 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 (158), de Niigata (Japón) en 2003 (170), de Kenya en 2003 (156), de Quebec (Canadá) en 2001 y 2002 (171), de Bélgica desde 1999 a 2005 (169), de Nueva Zelanda en 2004 (167) y Nueva Delhi (India) desde 2001 a 2005 (172). Notablemente, todas estas muestras fueron aisladas posteriormente a las encontradas por primera vez en Argentina (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 previamente. 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 47 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. Algunas de estas muestras agregadas correspondían a virus aislados contemporáneamente en Argentina o en países vecinos (Montevideo, Uruguay) (173), pero no poseían el segmento duplicado. La Figura 15 muestra el árbol obtenido por análisis bayesiano. Todas las secuencias con la duplicación de 60 nt se agruparon en el nuevo genotipo BA, separadas de aquellas asignadas previamente a otros genotipos descritos 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), ambos árboles mantuvieron la topología descrita, 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 15 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 14. 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 14, contiene sólo secuencias de muestras aisladas en Buenos Aires desde 2002 a 2004. 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 Argentina.

Todo este análisis detallado permitió utilizar a la aparición de la duplicación como un marcador genético para trazar un mapa mundial de la 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 16).

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 (113). 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 (129) (169) podría haber sucedido más de una vez durante la historia de la evolución del virus. El hecho de

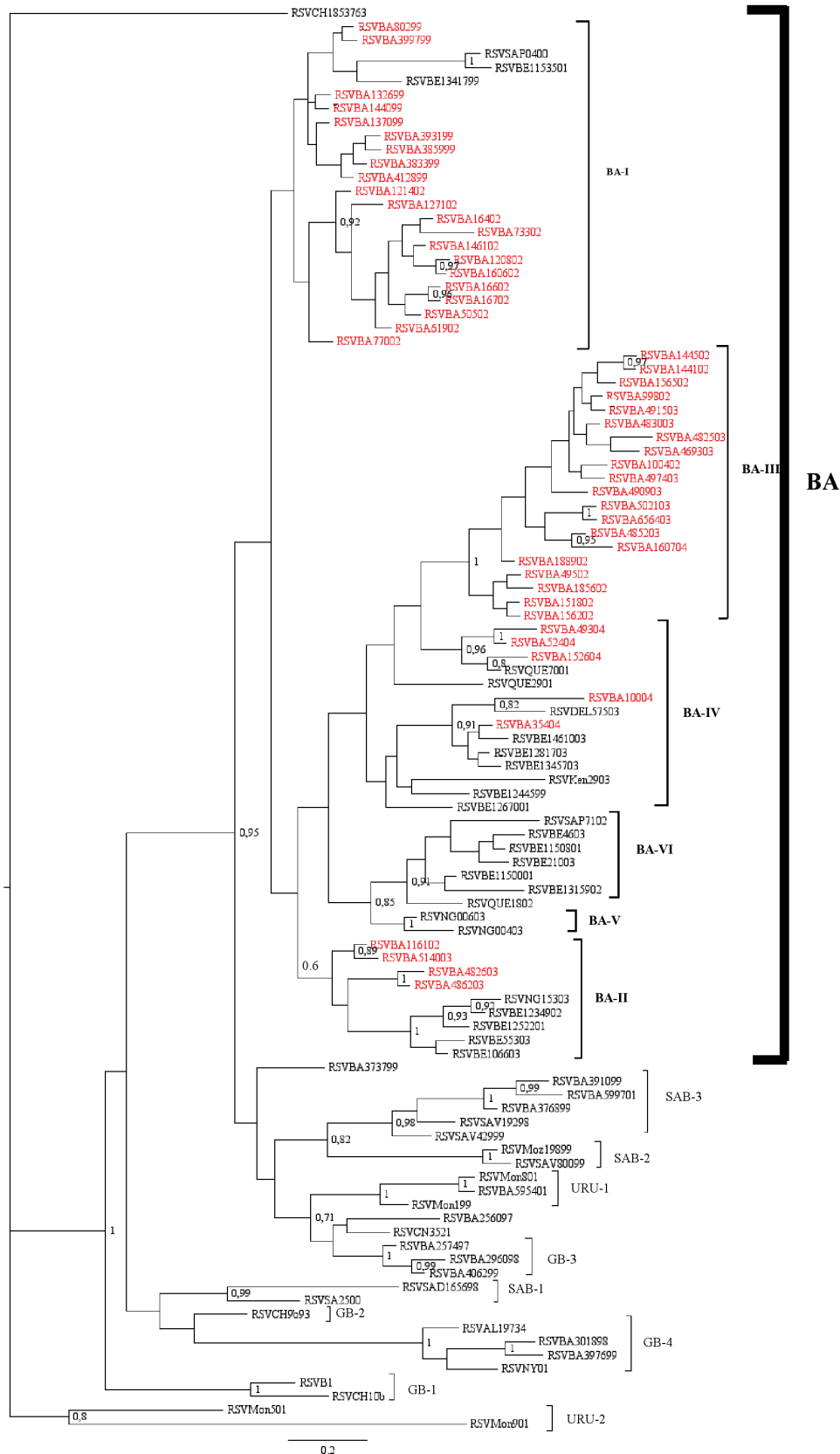


Figura 15. Árbol filogenético correspondiente al extremo C-terminal del gen de la glucoproteína G del HRSV subtipo B, construido mediante análisis bayesiano. Sólo las probabilidades posteriores mayores a 0,7 son mostradas.

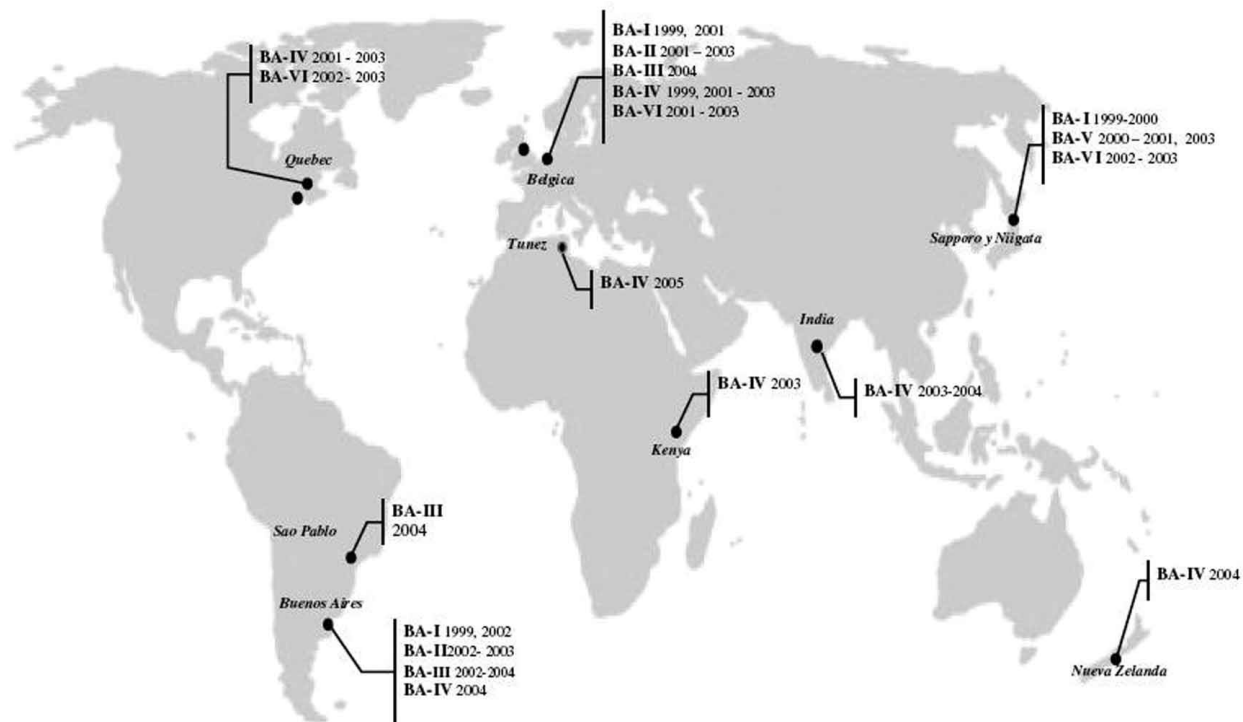


Figura 16. Distribución geográfica de las secuencias BA con la duplicación de 60 nt. En cada país se indica el o los clados que fueron encontrados entre las secuencias halladas y el año de aislamiento.

que las secuencias nucleotídicas lindantes al segmento duplicado fueran idénticas en todas las cepas que presentaron este cambio genético, 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) de la Figura 15 (genotipo que excluye a todas las otras secuencias del subtipo B sin la duplicación) así como también en el análisis filogenético en el que se excluyeron de a uno por vez ambos segmentos duplicados, 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. 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 (37), la Figura 15 provee un excepcional ejemplo de la historia natural del HRSV durante seis años consecutivos. A nivel local, la Figura 14 refleja la circulación de los virus BA durante los seis años consecutivos que abarca este trabajo. 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, y ha sido extensamente publicado en la literatura tanto para cepas del subtipo A como para cepas del B sin el segmento duplicado inclusive (130) (157) (167) (172). Es importante notar que los virus BA-I aparentemente dejaron de circular en Buenos Aires y en otros lugares del mundo luego del 2002 (Figuras 14 y 15). 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.

La Figura 16 refleja 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 (169). 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 (30) y por primera vez en Bélgica (169). Por otro lado los virus BA-V sólo se encontraron en Niigata, Japón (158). 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 (37).

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 (158). 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 sección anterior, se han descrito cinco patrones filogeográficos que intentan interpretar las características filodinámicas de los virus con genoma ARN que infectan humanos (164). 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", 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).

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

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. En general las 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 general las variaciones observadas a nivel nucleotídico se reflejaron en cambios a nivel aminoacídico. 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, como ha sido reportado para otros virus pertenecientes al subtipo B, se observó entre las secuencias determinando la longitud de la proteína. No obstante, otros cambios inusuales, fuera del segmento duplicado, también contribuyeron a polimorfismos en la longitud de la proteína. Inserciones y deleciones de otros tripletes como fue observado en las secuencias argentinas se han encontrado entre las secuencias de muestras aisladas en Bélgica. 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. 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). Esta observación también apoya la idea de un ancestro común para los virus del genotipo BA con el segmento duplicado de 60 nt. Los mecanismos responsables de la gran variabilidad entonces, incluyeron sustituciones de aminoácidos, inserciones, deleciones, y el uso de codones de terminación prematuros. 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 (112). 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. No obstante la duplicación constituyó el mecanismo molecular más drástico que dio origen al genotipo BA.

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, fueron alineadas y 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 17-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 (129). 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 17-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 17-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. 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, 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 (174) (175).

Con el objetivo de determinar si las regiones en donde se observó mayor variabilidad operaba cierta selección positiva se calculó el valor global de dN/dS que fue de 0,706 ($p < 0,05$), 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.

2.2.3.5. 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 (bayesianos y MV), así como se graficaron las longitudes de las ramas filogenéticas (distancias genéticas) versus el año de aislamiento de cada muestra (Figura 18). En este último caso se ajustaron los datos a una recta realizando un análisis por regresión lineal y la secuencia raíz fue fijada de tal manera que se

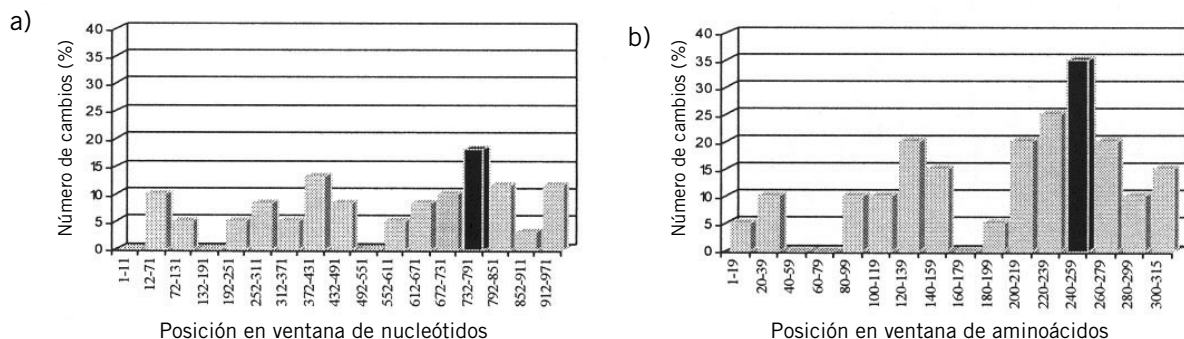


Figura 17. Microscopía electrónica de la liberación de un paramyxovirus de la superficie apical de células infectadas. Se observan viriones con formas esféricas y filamentosas brotando de la superficie celular (72).

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. Todos los métodos coincidieron en que esta duplicación se habría generado en un evento ocurrido aproximadamente 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 (113)(148).

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 (157)(169) (176). Esta alta tasa observada para el HRSV subtipo B, como para los virus con ARN en general (177), probablemente haya contribuido a la variación genética observada entre las secuencias del genotipo BA descrito en este trabajo. 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. Esto 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, 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 hayan 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 del HRSV. Al respecto, los programas de vigilancia epidemiológica a nivel molecular como lo ha constituido en parte este trabajo, 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.

2.3. CONCLUSIONES

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.

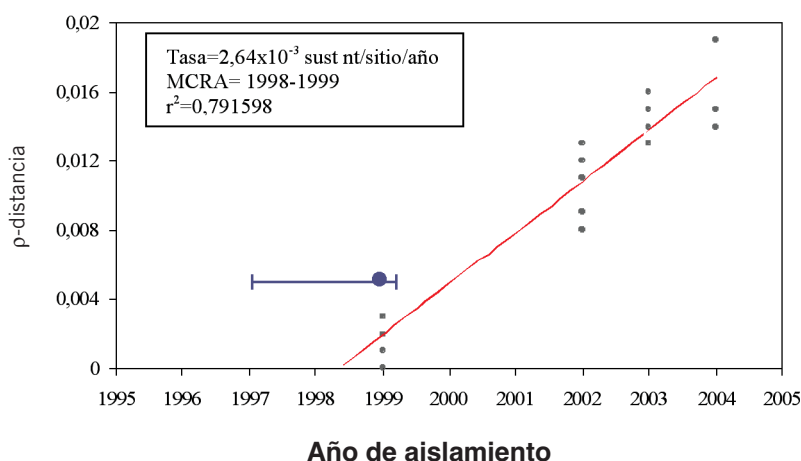


Figura 18. Tasa de evolución y estimación del año del ancestro común más reciente de las secuencias BA con la duplicación de 60 nt. Las distancias genéticas en nucleótidos fueron graficadas vs el año de aislamiento de cada muestra. Se graficó una recta por regresión lineal, la secuencia utilizada como 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%.

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. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. El análisis del valor global y por sitio de ω para las secuencias del subtipo A, mostró que la glucoproteína G estaría bajo 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 la idea de que ambos genotipos podrían estar evolucionando a distinta tasa, constituyendo dos líneas divergentes de evolución.
10. 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.
11. 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.
12. 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. Mostrando un desplazamiento global de estos virus, los cuales circularon en el período mencionado, inclusive reemplazando a otros genotipos dentro del subtipo B.
13. 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.
14. 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 Argentina 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.

Tomando en cuenta lo expuesto en los puntos anteriores principalmente analizando los patrones de circulación local y global del virus la idea planteada al inicio de este trabajo podría aceptarse como válida, debido

a que el HRSV circula en la población siguiendo los distintos brotes invernales y estaciones lluviosas alrededor del mundo no cortando su cadena de transmisión.

Finalmente este trabajo 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 de 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.

CORRESPONDENCIA

DRA. MARIANA VIEGAS

Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez Gallo N° 1330, 2° piso

1425 CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES

Tel: 54-11-49643118

E-mail: viegasmariana@hotmail.com

3. Referencias bibliográficas

- Weissenbacher M, Carballal G, Avila M, Salomón H, Harisiadi J, Catalano M, *et al.* Etiologic and clinical evaluation of acute lower respiratory tract infections in young Argentinean children: an overview. *Rev Infect Dis* 1990; 12:S889-S898.
- Straliotto SM, Siqueira MM, Muller RL, Fischer GB, Cunha ML, Nestor SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35:283-91.
- 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. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009; 360:2605-15.
- Barrero PR, Viegas M, Valinotto LE, Mistchenko AS. Genetic and phylogenetic analyses of Influenza A H1N1pdm in Buenos Aires, Argentina. *J Virol* 2010. *In press.*
- Benguigui Y, López Antumano FJ, Schmunis G, Yunes J, eds. Organización Panamericana de la Salud, Washington D.C., 1997.
- Carballal G, Videla CM, Espinosa MA, Savy V, Uez O, Sequeira M, *et al.* Multicentered study of viral acute lower respiratory infections in children from four cities of Argentina, 1993-1994. *J Med Virol* 2001; 64: 167-74.
- Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 716-47.
- van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, *et al.* A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7: 719-24.
- Heikkinen T, Osterback R, Peltola V, Jartti T, Vainionpää R. Human metapneumovirus infections in children. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:101-6.
- Kaplan NM, Dove W, Abd-ElDayem SA, Abu-Zeid AF, Shamooh HE, Hart CA. 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* 2008; 80:168-74.
- Fleming DM, Pannell RS, Cross KW. Mortality in children from influenza and respiratory syncytial virus. *J Epidemiol Community Health* 2005; 59:586-90.
- Cooper DL, Smith GE, Edmunds WJ, Joseph C, Gerard E, George RC. The contribution of respiratory pathogens to the seasonality of NHS Direct calls. *J Infect* 2007; 55: 240-8.
- Shek LP, Lee BW. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. *Paediatr Respir Rev* 2003; 4: 105-11.
- López Guinea J, Casado Flores M, Sobrino M, Espínola Docio B, de la Calle Cabrera T, Serrano A, *et al.* Bronquiolitis grave. Epidemiología y evolución de 284 pacientes. *An Pediatr (Barc)* 2007; 67: 116-22.
- Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Ray CG, Taussig LM, Lebowitz MD. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol* 1991; 133:1135-51.
- Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child* 1986; 140: 543-6.
- Murry AR, Dowell SF. Respiratory syncytial virus: Not just for kids. *Hosp Pract* 1997; 32: 87-8, 91-84, 98 *passim.*
- Hall CB, Douglas RG Jr. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr* 1981; 99:100-3.
- Bitko V, Musiyenko A, Barik S. Viral infection of the lungs through the eye. *J Virol* 2007; 81: 783-90.
- Graman PS, Hall CB. Epidemiology and control of nosocomial viral infections. *Infect Dis Clin North Am* 1989; 3: 815-41.
- Bont L. Nosocomial RSV infection control and outbreak management. *Paediatr Respir Rev* 2009; 10 Suppl 1: 16-7.
- Hall CB, Geiman JM, Biggar R, Kotok DI, Hogan PM, Douglas GR Jr. Respiratory syncytial virus infections within families. *N Engl J Med* 1976; 294: 414-9.
- Clarke SKR, Gardner PS, Poole PM. Respiratory syncytial virus infection: admissions to hospital in industrial, urban, and rural areas: Research Council subcommittee on respiratory syncytial virus vaccines. *Br Med J* 1978; 2: 796-8.
- Navas L, Wang E, de Carvalho V, Robinson J. 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* 1992; 121: 348-54.
- Organización Panamericana de la Salud. Salud en las Américas 2007: Vol II - Argentina. Washington, US.
- Kim YJ, Boeckh M, Englund JA. 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* 2007; 28: 222-42.
27. Lindblom A, Bhadri V, Söderhäll S, Ohrmalm L, Wong M, Norbeck, *et al.* Respiratory viruses, a common microbiological finding in neutropenic children with fever. *J Clin Virol* 2010; 47: 234-7.
 28. Murata Y, Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Review Antivir Ther* 2007; 12: 659-70.
 29. Galiano MC, Palomo C, Videla CM, Arbiza J, Melero JA, Carballal G. 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* 2005; 43: 2266-73.
 30. da Silva LH, Spilki FR, Riccetto AG, de Almeida RS, Baracat EC, Arns CW. Genetic variability in the G protein gene of human respiratory syncytial virus isolated from the Campinas metropolitan region, Brazil. *J Med Virol* 2008; 80: 1653-60.
 31. Lessler J, Reich NG, Brookmeyer R, Perl TM, Nelson KE, Cummings DA. Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2009; 9:291-300.
 32. Meert K, Heidemann S, Lieh-Lai M, Sarnaik AP. Clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections in healthy versus previously compromised host. *Pediatr Pulmonol* 1989; 7: 167-70.
 33. Maffey AF, Barrero PR, Venialgo C, Fernández F, Fuse VA, Saia M, *et al.* Viruses and atypical bacteria associated with asthma exacerbations in hospitalized children. *Pediatr Pulmonol* 2010; 45:619-25.
 34. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. *N Engl J Med* 1995; 332: 133-8.
 35. McBride JT. Pulmonary function changes in children after respiratory syncytial virus infection in infancy. *J Pediatr* 1999; 135: S28-S32.
 36. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM *et al.* Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999; 354: 541-5.
 37. Cane P. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 2001; 11: 103-16.
 38. Hall CB, Douglas RG Jr, Geiman JM, Messner MK. Nosocomial respiratory syncytial virus infections. *N Engl J Med* 1975; 293: 1343-6.
 39. Aherne W, Bird T, Court SDM, Gardner PS, McQuillin J. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J Clin Pathol* 1970; 23: 7-18.
 40. Gardner PS, McQuillin J, Court SDM. Speculation on pathogenesis in death from respiratory syncytial virus infection. *Br Med J* 1970; 1: 327-30.
 41. Zhang L, Peeples ME, Boucher RC, Collins PL, Pickles RJ. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J Virol* 2002; 76: 5654-66.
 42. Hoffman SJ, Laham FR, FP Polack. Mechanisms of illness during respiratory syncytial virus infection: the lungs, the virus and the immune response. *Microbes Infect* 2004; 6:767-72.
 43. Openshaw PJM, Tregoning JS. 2005. Immune Responses and Disease Enhancement during Respiratory Syncytial Virus Infection. *Clin Microbiol Rev*; 18: 541-55.
 44. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalances in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 633-9.
 45. Hull J, Rowlands K, Lockhart E, Moore C, Sharland M, Kwiatkowski D. Variants of the chemokine receptor CCR5 are associated with severe bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 2003; 188: 904-7.
 46. Awomoyi AA, Rallabhandi P, Pollin TI, Lorenz E, Szein MB, Boukhvalova MS, *et al.* Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children. *J Immunol* 2007; 179: 3171-7.
 47. Murphy BR, Olmsted RA, Collins PL, Chanock RM, Prince GA. 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* 1988; 62:3907-10.
 48. Wright PF, Karron RA, Belshe RB, Thompson J, Crowe JE Jr, Boyce TG, *et al.* Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy. *J Infect Dis* 2000; 182:1331-42.
 49. Henrickson KJ, Hall CB. Diagnostic Assays for Respiratory Syncytial Virus Disease. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26: S36-S40.
 50. Henrickson KJ. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23:S6-S10.
 51. Falsey AR, McCann RM, Hall WJ, Criddle MM. Evaluation of four methods for the diagnosis of respiratory syncytial virus infection in older adults. *J Am Geriatr Soc* 1996; 44: 71-3.
 52. Rodriguez WJ. Management strategies for respiratory syncytial virus infections in infants. *J Pediatr* 1999; 135: 45-50.
 53. Chen CH, Lin YT, Yang YH, Wang LC, Lee JH, Kao CL, *et al.* Ribavirin for respiratory syncytial virus bronchiolitis reduced the risk of asthma and allergen sensitization. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19: 166-72.
 54. Teng MN, Whitehead SS, Birmingham A, St Claire M, Elkins WR, Murphy BR, *et al.* Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. *J Virol* 2000; 74:9317-21.
 55. Schmidt AC, Wenzke DR, McAuliffe JM, St Claire M, Elkins WR, Murphy BR, *et al.* 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* 2002; 76:1089-99.
56. Connors M, Collins PL, Firestone CY, Murphy BR. 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* 1991; 65: 1634-7.
 57. Cherrie AH, Anderson K, Wertz GW, Openshaw PJ. Human Cytotoxic TCells Stimulated by Antigen on Dendritic Cells Recognize the N, SH, F, M, 22k, and 1b Proteins of Respiratory Syncytial Virus. *J Virol* 1992; 66: 2102-10.
 58. Openshaw PJ, Culley FJ, Olszewska W. Immunopathogenesis of vaccine-enhanced RSV disease. *Vaccine* 2001; 20: S27-S31.
 59. Plotnicky H, Siegrist CA, Aubry JP, Bonnefroy JY, Corvaia N, Nguyen TN, *et al.* Enhanced pulmonary immunopathology following neonatal priming with formalin-inactivated respiratory syncytial virus but not with the BBG2NA vaccine candidate. *Vaccine* 2003; 21: 2651-60.
 60. Kalina WV, Wollums AR, Berghaus RD, Gershwin LJ. Formalin-inactivated bovine RSV vaccine enhances a Th2 mediated immune response in infected cattle. *Vaccine* 2004; 22: 1465-74.
 61. Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, Melendi GA, Hernandez JZ, Bataille JP, *et al.* Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat Med* 2009; 15: 34-41
 62. Wright PF, Karron RA, Belshe RB, Shi JR, Randolph VB, Collins PL, *et al.* The absence of enhanced disease with wild type respiratory syncytial virus infection occurring after receipt of live, attenuated, respiratory syncytial virus vaccines. *Vaccine* 2007; 25: 7372-8.
 63. Karron RA, Wright PF, Belshe RB, Thumar B, Casey R, Newman F, *et al.* Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *J Infect Dis* 2005; 191: 1093-104.
 64. de Waal L, Power UF, Yuksel S, van Amerongen G, Nguyen TN, Niesters HG, *et al.* Evaluation of BBG2Na in infant macaques: specific immune responses after vaccination and RSV challenge. *Vaccine* 2004; 22: 915-22.
 65. Nokes JD, Cane PA. New strategies for control of respiratory syncytial virus infection. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21:639-43.
 66. Zhao X, Chen FP, Sullender WM. Respiratory syncytial virus escape mutant derived in vitro resists palivizumab prophylaxis in cotton rats. *Virology* 2004; 318: 608-12.
 67. Zhao X, Sullender WM. In vivo selection of respiratory syncytial viruses resistant to palivizumab. *J Virol* 2005; 79: 3962-8.
 68. Wu H, Pfarr DS, Tang Y, An LL, Patel NK, Watkins JD, *et al.* Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: Effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization. *J Mol Biol* 2005; 350: 126-44.
 69. Blount RE Jr, Morris JA, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coriza. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 92:544-9.
 70. Chanock R, Roizman B, Myers R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to Chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg* 1957; 66: 281-90.
 71. Chanock R, Finberg L. 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* 1957; 66: 291-300.
 72. Roberts SH, Compans RW, Wertz GW. Respiratory Syncytial Virus Matures at the Apical Surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol* 1995; 69: 2667-73.
 73. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 2001; 344: 1917-28.
 74. Collins PL, Hill MG, Camargo E, Grosfeld H, Chanock RM, Murphy BR. 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* 1995; 92: 11563-7.
 75. Mink MA, Stec DS, Collins PL. Nucleotide sequences of the 39 leader and 59 trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 1991; 185: 615-24.
 76. Cowton VM, McGivern DR, Fearn R. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol* 2006; 87: 1805-21.
 77. Johnson PR, Collins PL. 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* 1989; 70: 1539-47.
 78. Ramaswamy M, Shi L, Varga SM, Barik S, Behlke MA, Look DC. Respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 specifically inhibits type I interferon signal transduction. *Virology* 2006; 344: 328-39.
 79. Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, Musiyenko A, Ramaswamy M, Look DC, *et al.* Nonstructural Proteins of Respiratory Syncytial Virus Suppress Premature Apoptosis by an NF- κ B-Dependent, Interferon-Independent Mechanism and Facilitate Virus Growth. *J Virol* 2007; 81: 1786-95.
 80. Garcia-Barreno B, Delgado T, Melero JA. 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* 1996; 70: 801-8.
 81. Fearn R, Peeples ME, Collins PL. 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* 1997; 236: 188-201.
 82. Dupuy LC, Dobson S, Bitko V, Barik S. 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* 1999; 73: 8384-92.
 83. Horikami SM, Curran J, Kolakofsky D, Moyer SA. Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required

- for defective interfering particle genome replication in vitro. *J Virol* 1992; 66: 4901-08.
84. Collins PL, Hill MG, Johnson PR. 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* 1990; 71: 3015-20.
 85. Fearn R, Collins PL. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* 1999; 73: 5852-64.
 86. Bermingham A, Collins PL. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *PNAS* 1999; 96: 11259-64.
 87. Stec DS, Hill MG, Collins PL. Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology* 1991; 183: 273-87.
 88. Henderson G, Murray J, Yeo RP. Sorting of the respiratory syncytial virus matrix protein into detergent-resistant structures is dependent on cell-surface expression of the glycoproteins. *Virology* 2002; 300: 244-54.
 89. Ghildyal R, Li D, Peroulis I, Shields B, Bardin PG, Teng MN, Collins PL, *et al.* Interaction between the respiratory syncytial virus G glycoprotein cytoplasmic domain and the matrix protein *J Gen Virol* 2005; 86: 1879-84.
 90. Ghildyal R, Mills J, Murray M, Vardaxis N, Meanger J. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *J Gen Virol* 2002; 83: 753-7.
 91. Collins PL, Mottet G. Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1993; 74: 1445-50.
 92. Techaarpornkul S, Barretto N, Peeples ME. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J Virol* 2001; 75: 6825-34.
 93. Perez M, Garcia-Barreno B, Melero JA, Carrasco L, Guinea R. Membrane permeability changes induced in *Escherichia coli* by the SH protein of human respiratory syncytial virus. *Virology* 1997; 235: 342-51.
 94. Fuentes S, Tran KC, Luthra P, Teng MN, He B. Function of the Respiratory Syncytial Virus Small Hydrophobic Protein. *J Virol* 2007; 81: 8361-6.
 95. Collins PL, Mottet G. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1991; 72: 3095-101.
 96. Kahn JS, Schnell MJ, Buonocore L, Rose JK. Recombinant vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins: RSV fusion protein can mediate infection and cell fusion. *Virology* 1999; 254: 81-91.
 97. Hemminway BR, Yu Y, Tanaka Y, Perrine KG, Gustafson E, Bernstein JM, *et al.* Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology* 1994; 200: 801-5.
 98. Schlender J, Zimmer G, Herrler G, Conzelmann KK. Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Protein Subunit F2, Not Attachment Protein G, Determines the Specificity of RSV Infection. *J Virol* 2003; 77: 4609-16.
 99. Olmsted RA, Elango N, Prince G, Murphy BR, Johnson PR, Moss B *et al.* 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* 1986; 83: 7462-6.
 100. Kim YK, Choi EH, Lee HJ. Genetic Variability of the Fusion Protein and Circulation Patterns of Genotypes of the Respiratory Syncytial Virus. *J Med Virol* 2007; 79: 820-8.
 101. López JA, Bustos R, Orvell C, Berois M, Arbiza J, García-Barreno B, *et al.* Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J Virol* 1998; 72: 6922-8.
 102. Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1987; 68: 2521-4.
 103. Roberts SR, Lichtenstein D, Ball LA, Wertz GW. The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J Virol* 1994; 68: 4538-46.
 104. Wertz GW, Krieger M, Ball LA. Structure and cell surface maturation of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O glycosylation. *J Virol* 1989; 63: 4767-76.
 105. Wathen MW, Aeed PA, Elhammer AP. Characterization of oligosaccharide structures on a chimeric respiratory syncytial virus protein expressed in insect cell line Sf9. *Biochemistry* 1991; 30: 2863-8.
 106. Gorman JJ, Ferguson BL, Speelman D, Mills J. 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* 1997; 6: 1308-15.
 107. Gallagher JT, Lyon M, Steward WP. Structure and function of heparan sulfate proteoglycans. *Biochem J* 1986; 236: 313-25.
 108. Feldman SA, Hendry RM, Beeler JA. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J Virol* 1999; 73: 6610-6617.
 109. Wertz GW, Moudy RM. Antigenic and genetic variation in human respiratory syncytial virus. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23(Suppl 1):S19-24.
 110. Johnson PR Jr, Olmsted RA, Prince GA, Murphy BR, Alling DW, Walsh EE, *et al.* 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* 1987; 61: 3163-6.
 111. Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: Extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *PNAS* 1987; 84: 5625-9.
 112. Martinez I, Dopazo J, Melero JA. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *J Gen Virol* 1997; 78: 2419-29.

113. Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, García-Barreno B, Melero JA, *et al.* Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J Gen Virol* 2003; 84: 3115-20.
114. Cane PA, Pringle CR. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. *J Virol* 1995; 69: 2918-25.
115. Srinivasakumar N, Ogra PL, Flanagan TD. Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEP-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. *J Virol* 1991; 65: 4063-9.
116. Hardy RW, Wertz GW. The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J Virol* 1998; 72: 520-6.
117. Kreml C, Murphy BR, Collins PL. Recombinant respiratory syncytial virus with the G and F genes shifted to the promoter-proximal positions. *J Virol* 2002; 76: 11931-42.
118. Cheng X, Park H, Zhou H, Jin H. Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication. *J Virol* 2005; 79: 13943-52.
119. Cowton VM, McGivern DR, Fearn R. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol* 2006; 87: 1805-21.
120. McCurdy LH, Graham BS. Role of Plasma Membrane Lipid Microdomains in Respiratory Syncytial Virus Filament Formation. *J Virol* 2003; 77: 1747-56.
121. Arslanagic E, Matsumoto M, Suzuki K, Nerome K, Tsutsumi H, Hung T. Maturation of respiratory syncytial virus within HEP-2 cell cytoplasm. *Acta Virol* 1996; 40: 209-14.
122. Coates HV, Alling DW, Chanock RM. An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization assay. *Am J Epidemiol* 1966; 83: 299-313.
123. Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF, Stone Y, *et al.* Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1985; 151:626-33.
124. Mufson MA, Örvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1985; 66:2111-24.
125. Sullender WM. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 1-15.
126. Cristina J, López JA, Albo C, García-Barreno B, García J, Melero JA, *et al.* Analysis of genetic variability in human respiratory syncytial virus by the RNase A mismatch cleavage method: subtype divergence and heterogeneity. *Virology* 1990; 174: 126-34.
127. Choi E, Lee HJ. 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* 2000; 181: 1547-56.
128. Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Tsutsumi H. Genetic Variability and Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus Subgroup A Strains in Japan Determined by Heteroduplex Mobility Assay. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2048-53.
129. Melero JA, García-Barreno B, Martínez I, Pringle CR, Cane PA. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J Gen Virol* 1997; 78:2411-2418.
130. Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1-4.
131. Garcia O, Martin M, Dopazo J, Arbiza J, Frabasile S, Russi J, *et al.* Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *J Virol* 1994; 68: 5448-59.
132. McCullers JA, Saito T, Iverson AR. Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003. *J Virol* 2004; 78: 12817-28.
133. Viegas M, Barrero PR, Maffey AF, Mistchenko AS. Respiratory virus seasonality in children under five years of age in Buenos Aires, Argentina: a five-year analysis. *J Infect* 2004; 49: 222-8.
134. Gardner PS, McQuilin J. Viral diagnosis by immunofluorescence. *Lancet* 1968; 1: 597-8.
135. Bilkis MD, Barrero PR, Mistchenko AS. Measles resurgence in Argentina: 1997-8 outbreak. *Epidemiol Inf* 2000; 124: 289-93.
136. Collins PL, Chanock RM, Murphy BR. Respiratory syncytial virus. En: *Fields Virology* (Knipe DM, Howley PM, ed.) Philadelphia: Lippincott-Williams and Wilkins; 2001. pp. 1443-86.
137. Grupo colaborativo de vigilancia epidemiológica de gripe y otras virosis respiratorias en Argentina. *Boletín GROG. Aventis Pasteur* 2000; 4 (2).
138. Grupo colaborativo de vigilancia epidemiológica de gripe y otras virosis respiratorias en Argentina. *Boletín GROG. Aventis Pasteur* 2001; 5 (2).
139. World Health Organization. *Weekly Epidemiological Record* 2000, 75 (41).
140. World Health Organization. *Weekly Epidemiological Record* 2001, 76 (40).
141. Lieberman D, Lieberman D, Friger MD. Seasonal variation in hospital admissions from community-acquired pneumonia: a 5-year study. *J Infect* 1999; 39: 134-40.
142. Proctor DF. The mucocilliary system. In: Proctor DF, Andersen I, eds. *The nose. Upper airways physiology and the atmospheric environment.* Amsterdam: Elsevier; 1982; 245-78.
143. Eccles R. An explanation for the seasonality of acute upper respiratory tract viral infections. *Acta Otolaryngol* 2002; 122: 183-91.
144. Hambling MH. Survival of the respiratory syncytial virus during the storage under various conditions. *Br J Exp Pathol* 1964; 45: 647-55.
145. Rechsteiner J, Winkler KC. Inactivation of respiratory syncytial virus in aerosol. *J Gen Virol* 1969; 5: 405-10.
146. Hammond GW, Raddatz RL, Gelskey DE. Impact of atmospheric dispersion and transport of viral aerosols on the epidemiology of influenza. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 494-7.
147. Viegas M, Mistchenko AS. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroup A over a six-year period (1999-2004) in Argentina. *J Med Virol* 2005; 77: 302-10.

148. Trento A*, Viegas M*, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS, Melero JA. (*) contributed equally to this work. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. *J Virol* 2006; 80: 975-84.
149. Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2990-5.
150. Sullender WM, Sun L, Anderson LJ. Analysis of respiratory syncytial virus genetic variability with amplified cDNAs. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1224-31.
151. Rajala MS, Sullender WM, Prasad AK, Dar L, Broor S. Genetic variability among Group A and B respiratory syncytial virus isolates from a large referral hospital in New Delhi, India. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2311-6.
152. Nei and Kumar. Population Trees from Genetics Markers in Nei and Kumar editors. *Molecular Evolution and phylogenetics*. Oxford University Press 2000; 265-89.
153. Posada D, Crandall KA. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*; 14: 817-8
154. Huelsenbeck JP, Ronquist F. Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 2001; 17:754-755.
155. Swofford DL. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sunderland, MA: Sinauer Associates; (Version 4.0b10), 2003.
156. Scott PD, Ochola R, Ngama M, Okiro EA, Nokes DJ, Medley GF, *et al.* Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. *J Med Virol* 2004; 74: 344-54.
157. Zlateva KT, Vijgen L, Dekeersmaecker N, Naranjo C, Van Ranst M. Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3022-3030.
158. Sato M, Saito R, Sakai T, Sano Y, Nishikawa M, Sasaki A, *et al.* Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 36-40.
159. Reiche J, Schweiger B. Genetic variability of group A human respiratory syncytial virus strains circulating in Germany from 1998 to 2007. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1800-10.
160. Frabasile S, Delfraro A, Facal L, Videla C, Galiano M, de Sierra MJ, *et al.* Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993-2001. *J Med Virol* 2003; 71: 305-12.
161. Araujo Moura FE, Blanc A, Frabasile S, Delfraro A, de Sierra MJ, Tome L, *et al.* Genetic diversity of respiratory syncytial virus isolated during an epidemic period from children of North-Eastern Brazil. *J Med Virol* 2004; 74: 156-60.
162. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24: 1596-9.
163. Baccam P, Thompson RJ, Fedrigo O, Carpenter S, Cornette JL. PAQ: Partition Analysis of Quasispecies. *Bioinformatics* 2001; 17: 16-22.
164. Holmes EC. Evolutionary history and phylogeography of human viruses. Review. *Annu Rev Microbiol* 2008; 62: 307-28.
165. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 2007; 7: 214-22.
166. Duffy S, Shackelton LA and Holmes EC. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 267-76.
167. Matheson JW, Rich FJ, Cohet C, Grimwood K, Huang QS, Penny D, *et al.* Distinct patterns of evolution between respiratory syncytial virus subgroups A and B from New Zealand isolates collected over thirty-seven years. *J Med Virol* 2006; 78: 1354-64.
168. García-Barreno B, Palomo C, Peñas C, Delgado T, Perez-Breña P, Melero JA. Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J Virol* 1989; 63: 925-32.
169. Zlateva KT, Lemey P, Moës E, Vandamme AM, Van Ranst M. Genetic Variability and Molecular Evolution of the Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup B Attachment G Protein. *J Virol* 2005; 79: 9157-67.
170. Nagai K, Kamasaki H, Kuroiwa Y, Okita L, Tsutsumi H. Nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus subgroup B variants with the 60 nucleotides-duplicated G protein gene. *J Med Virol* 2004; 74: 161-5.
171. Gilca R, De Serres G, Tremblay M, Vachon ML, Leblanc E, Bergeron MG, *et al.* Distribution and clinical impact of human respiratory syncytial virus genotypes in hospitalized children over 2 winter seasons. *J Infect Dis* 2006; 193: 54-8.
172. Parveen S, Broor S, Kapoor SK, Fowler K, Sullender WM. Genetic diversity among respiratory syncytial viruses that have caused repeated infections in children from rural India. *J Med Virol* 2006; 78: 659-65.
173. Moura FE, Blanc A, Frabasile S, Delfraro A, de Sierra MJ, Tome L, *et al.* Genetic diversity of respiratory syncytial virus isolated during an epidemic period from children of northeastern Brazil. *J Med Virol* 2004; 74: 156-60.
174. Botosso VF, Zanotto PM, Ueda M, Arruda E, Gilio AE, Vieira SE, *et al.*; VGDN Consortium. Positive Selection Results in Frequent Reversible Amino Acid Replacements in the G Protein Gene of Human Respiratory Syncytial Virus. *PLoS Pathog* 20085(1): e1000254. doi:10.1371.
175. Woelk CH, Holmes EC. Variable immune-drive natural selection in the attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus (RSV). *J Mol Evol* 2001; 52: 182-92.