



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**Universitat Autònoma de Barcelona  
Departamento de Genética y Microbiología  
Programa de Doctorado: Microbiología**

## **TESIS DOCTORAL**

**VIGILANCIA VIROLÓGICA DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL  
HUMANO: EPIDEMIOLOGÍA Y CARACTERIZACIÓN  
MOLECULAR**

**Presentada por Laura Gimferrer Arriaga  
para optar al grado de Doctora**

**Dirigida por el Prof. Tomàs Pumarola Suñé y el Dr. Andrés Antón Pagarolas  
Tutorizada por la Dra. Núria Rabella Garcia**

**Barcelona, 2018  
Universitat Autònoma de Barcelona**







**Tomàs Pumarola Suñé**, Catedrático del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona, **Andrés Antón Pagarolas**, facultativo especialista responsable de la Unidad de Virus Respiratorios del Servicio de Microbiología del mismo hospital, y **Núria Rabella Garcia**, Jefa Clínica de la Unidad de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Certificamos,

Que la memoria titulada “Vigilancia virológica del virus respiratorio sincitial humano: epidemiología y caracterización molecular” presentada por **Laura Gimferrer Arriaga**, ha sido realizada bajo nuestra supervisión y cumple todos los requisitos necesarios que dicta la normativa vigente para ser defendida delante el tribunal correspondiente como compendio de publicaciones en la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y para que así conste,

Firmamos este certificado en Barcelona, el 9 de Julio de 2018

**Prof. Tomàs Pumarola**

**Dr. Andrés Antón**

**Dra. Núria Rabella**

**Laura Gimferrer**

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

Hospital Universitari Vall d'Hebron  
Vall d'Hebron Institut de Recerca

Doctorado en Microbiología  
Departamento de genética y Microbiología



**Als meus pares.**



# AGRADECIMIENTOS

Aquesta Tesi no s'hagués escrit mai si no fos per totes aquelles persones que han format part de la meua vida durant aquests darrers anys. A tots ells, gràcies per ensenyar-me tant.

Primer de tot m'agradaria agrair al Dr. Andrés Antón i al Prof. Tomàs Pumarola l'oportunitat que em van donar al convidar-me a treballar al seu equip. Gràcies a la seva confiança he pogut realitzar aquesta tesis.

Andrés, permíteme tutearte, después de tantos cafés sería extraño dirigirme a ti de otra forma. Gracias por enseñarme tanto, sin duda tú eres el mayor responsable de que haya podido sacar adelante esta tesis.

Tomàs, gràcies per la teua ajuda i els teus consells durant aquests quasi cinc anys. Gràcies per endinsar-te en la cultura Coreana per donar-me un cop de mà. Tant de bo em trobi amb moltes persones com tu al llarg de la meua vida laboral.

Je ne peux pas écrire ces remerciements sans parler de toi Isabelle. Tu as été la première à me voir trembler devant une pipette. Malgré toutes mes erreurs et mes cultures cellulaires jetées par terre, tu n'as pas perdu la patience. Tu resteras toujours un exemple à suivre pour moi en tant que scientifique mais surtout en tant que personne.

Les coses sempre son més fàcils de fer si al teu dia a dia estàs envoltat de bones persones. En el meu cas, ha estat així. Cristina, Maria i Candela, gràcies per aguantar-me tant de temps. Sense els crusants de Montbau de les tardes hagués sigut tot molt més avorrit. Gràcies també als meus companys Paco, Mari i Pili. Al Paco pels mojitos, a la Pili per la xocolata de les tardes i a la Mari per fer-me riure com ningú.

Thais, gràcies per les converses de cafè de cada matí. He passat d'amagar-me de tu quan anava a fer un gel, a buscar-te tot el dia per desconnectar cinc minuts. Ni t'imagines com m'ha ajudat la teua positivitat i fortalesa.

Zaira...mi media naranja! ¡Ni nuestras diferencias culturales han podido con nosotras! Todo lo que te pueda decir aquí ya lo sabes. Así que, siguiendo con la dinámica de las últimas líneas, gracias. Gracias por hablar mí mismo idioma, por aparecer cuando más lo necesitaba y por convertirte en alguien tan imprescindible para mí. Tienes una amiga en Barcelona para siempre.

I no em puc oblidar de tota la gent del servei de Microbiologia que m'ha acompanyat durant tant de temps. La Juliana, el Mateu, l'Anna, la Rosa, l'Elena, l'Aroa, la Susana, el Leo, el Paco, la Marta, la Irene, el David, la Chari, l'Alba, l'Albert, el Toni, la Núria, el Juanjo, la Gema, la Rosa, la Virginia, la Gloria, la Judit, la Maite, la Lidia, el Miguel, l'Ari... Ha estat un plaer compartir aquest temps amb tots vosaltres.

I què hagués sigut de mi si al sortir de la feina no hagués pogut seure a una terrassa i comentar el dia? Aquests moments els he d'agrair als meus amics, que després de tants anys ja son família. A la Sandra per la seva amistat incondicional, a l'Anna per ser el millor descobriment dels últims anys, a la Cata per no desaparèixer mai, al Xavi pel seu costat Zen, a l'Albert per ser tant especial per mi, al Boris per la seva tendresa i a la Celia per ser la Celia. A tots vosaltres, gràcies per ser-hi sempre.

I no em voldria oblidar de la Laura, que malgrat creuar-nos cada tants anys ha dedicat unes hores a millorar aquesta tesi, i unes quantes hores més a escoltar-me.

En cadascuna de les pàgines d'aquest treball hi ha una part teva Xavi. Les nostres tardes al sofà parlant de ciència i no tant de ciència, amb un tesito entre mans, ho han fet tot més fàcil. Ens vam conèixer tot just començant en el món de la biologia, i no podria haver trobat un millor company que tu. Gràcies per fer-me entendre cada dia el que és realment important per a mi.

I finalment, he d'agrair a la meva família el seu suport. A l'Helena i al Robert, gràcies per regalar-nos al Pau, a la Juli i al Titus. A l'Oriol per tantes converses Mallorca-Barcelona, crec que amb ningú he parlat tant per telèfon. Però sobretot als meus pares que mai han deixat d'esforçar-se perquè siguem feliços amb el que fem, sense deixar-nos oblidar mai que l'important és de qui ens envoltem. A ells, gràcies de tot cor.

## ABREVIATURAS

<b>AdVH</b>	Adenovirus humano
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BoVH</b>	Bocavirus humano
<b>CoV</b>	Coronavirus
<b>ELISA</b>	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
<b>EV</b>	Enterovirus
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>ICTV</b>	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
<b>F</b>	Proteína de fusión
<b>G</b>	Glicoproteína de unión
<b>GE</b>	Señal <i>gene-end</i>
<b>Gs</b>	Proteína G soluble
<b>GS</b>	Señal <i>gene-start</i>
<b>HRA/B/C</b>	Regiones heptédicas repetidas
<b>HUVH</b>	Hospital Universitario Vall d'Hebron
<b>IC</b>	Inmuncromatografía
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IFN</b>	Interferón
<b>ITRI</b>	Infección de tracto respiratorio inferior
<b>L</b>	Polimerasa viral
<b>M</b>	Proteína de matriz
<b>M2</b>	Factor antiterminador de la transcripción
<b>MPVH</b>	Metapneumovirus humano
<b>N</b>	Nucleoproteína
<b>nt</b>	Nucleótido
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ORF</b>	<i>Open reading frames</i>
<b>P</b>	Fosfoproteína
<b>Pep27</b>	Péptido 27
<b>PF</b>	Péptido de fusión
<b>PIDIRAC</b>	Plan de Información de las Infecciones Respiratorias Agudas en Cataluña
<b>PLFR</b>	Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción

<b>poliA</b>	Poliadenilación
<b>PS</b>	Péptido señal
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RCP</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>RHV</b>	Región hipervariable
<b>RVH</b>	Rinovirus humano
<b>SH</b>	Proteína hidrofóbica de membrana
<b>TM</b>	Transmembrana
<b>VPI</b>	Virus parainfluenza
<b>VG</b>	Virus de la gripe
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>VRSH</b>	Virus respiratorio sincitial humano

# ÍNDICE

---

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN POR EL VRSH .....</b>	<b>7</b>
2.2.1 PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR EL VRSH .....	7
2.2.2 RESPUESTA INMUNITARIA EN LA INFECCIÓN POR EL VRSH.....	8
2.2.3 EPIDEMIOLOGÍA DEL VRSH.....	10
2.2.4 PREVENCIÓN, TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VRSH.....	11
<b>2.3 BIOLOGÍA DEL VRSH .....</b>	<b>14</b>
2.3.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	14
2.3.2 MORFOLOGÍA Y COMPOSICIÓN DEL VIRIÓN .....	15
2.3.3 ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y PROTEÍNAS VIRALES.....	15
2.3.4 LA PROTEÍNA G.....	19
2.3.5 LA PROTEÍNA F .....	22
2.3.6 CICLO REPLICATIVO.....	24
<b>2.4 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y CIRCULACIÓN DEL VRSH .....</b>	<b>25</b>
2.4.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VRSH.....	25
2.4.2 CIRCULACIÓN DEL VRSH .....	28
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 HIPÓTESIS .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2 OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>

<b>4.1 PRIMER TRABAJO: EPIDEMIOLOGÍA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL EN UN HOSPITAL TERCIARIO DE CATALUÑA (ESPAÑA) DURANTE LA TEMPORADA 2013-2014.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2 SEGUNDO TRABAJO: CIRCULACIÓN DE UN NUEVO GENOTIPO DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL HUMANO DEL GRUPO B DURANTE LA TEMPORADA 2014-2015 EN CATALUÑA (ESPAÑA). .....</b>	<b>49</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>79</b>
<b>8. MATERIAL ANEXO .....</b>	<b>91</b>

# 1. RESUMEN

---



# 1. RESUMEN

---

El virus respiratorio sincitial humano (VRS) es el máximo representante de la familia *Pneumoviridae* y del género *Orthopneumovirus*. Es reconocido como un importante agente viral causante de infecciones respiratorias en toda la población, aunque su importancia clínica es especialmente relevante en la población pediátrica e inmunodeprimidos. Se estima que prácticamente todos los niños han sufrido la infección por el VRS antes de los dos primeros años de vida. Dado que la inmunidad generada frente a la infección es incompleta, las reinfecciones se dan con más o menos frecuencia a lo largo de la vida de un individuo. Pese al gran impacto del VRS en la población sólo se dispone de un tratamiento profiláctico, el palivizumab (Synagis®), un anticuerpo monoclonal humanizado que se administra a pacientes con alto riesgo de padecer una infección grave por el VRS. Ni existe un antiviral específico, ni existe todavía una vacuna segura y efectiva para la prevención de la infección por este patógeno, aunque se están dedicando todos los esfuerzos posibles en su desarrollo. Las proteínas mayoritarias de la envuelta viral son las principales dianas escogidas para su diseño, ya que son los principales determinantes antigénicos estimuladores de una inmunización activa. Sin embargo, diversos estudios han demostrado una elevada variabilidad genética en estas proteínas por la alta presión selectiva a la que están sometidas. Por esta razón, el conocimiento preciso de las características moleculares de los virus circulantes, así como su evolución temporada tras temporada es una información valiosa para el correcto desarrollo de una vacuna efectiva a largo plazo y la monitorización de su efectividad en el futuro.

Este trabajo se centra en el estudio de la epidemiología de la infección respiratoria causada por el VRS en nuestra área geográfica durante cinco temporadas consecutivas, desde 2013 hasta 2018. En él, se describen las características moleculares, el perfil epidemiológico de los pacientes afectados de los VRS recogidos durante este período, y se estudia la presencia de cepas variantes en la población resistentes al actual tratamiento preventivo contra la infección, así como la de aquellos que están en desarrollo.



# 2. INTRODUCCIÓN

---



## 2. INTRODUCCIÓN

---

### 2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El VRSH fue aislado por primera vez por J. A. Morris *et al.* en 1956 en el Walter Reed Army Institute of Research (Maryland, EEUU), donde se estudiaba un brote epizootico de infección respiratoria en un grupo de chimpancés con una sintomatología similar a la del resfriado común [10]. Este nuevo patógeno, al ser aislado en cultivo celular, producía un efecto citopático muy característico, la formación de sincitios. En un primer momento recibió el nombre de agente de coriza del chimpancé.

Un año más tarde, R. Chanock *et al.* aislaron el mismo virus en Baltimore (EEUU), a partir de muestras respiratorias de dos niños con enfermedad respiratoria de vías bajas [11]. Fue este segundo grupo quién lo denominó por primera vez virus respiratorio sincitial por ese característico efecto citopático observado en cultivo celular.

### 2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN POR EL VRSH

#### 2.2.1 Patogénesis de la infección por el VRSH

Inicialmente, la infección en los niños comienza en las vías respiratorias superiores, cursando habitualmente con rinorrea, tos, estornudos y fiebre, aunque por lo general no muy elevada. Sin embargo, en un 30% a 50% de los casos la infección se extiende hasta el tracto respiratorio inferior siendo la bronquiolitis, la bronquitis y la neumonía las manifestaciones más comunes [12]. Estos casos más graves se caracterizan por presentar disnea, fatiga, irritabilidad, problemas de alimentación y, en casos más graves, broncoespasmos, apneas o cianosis por hipoxia [13].

En la población adulta las reinfecciones se dan con más o menos frecuencia, siendo especialmente recurrentes en personal sanitario o en personas en contacto directo con niños [14]. Por lo general, la infección en el adulto suele autolimitarse al tracto respiratorio superior produciendo una sintomatología más leve o incluso cursando de forma asintomática. En personas que padecen comorbilidades, personas inmunodeprimidas o de avanzada edad, la

infección tiene más probabilidades de extenderse al tracto respiratorio inferior cursando con una mayor gravedad por neumonía [15].

La infección por el VRSH se inicia con la entrada del virus en las células epiteliales del tracto respiratorio superior. Se estima que el tiempo de incubación es de entre dos y ocho días [16]. Una vez iniciada la infección y, por lo general cuando la carga viral es muy elevada, esta puede extenderse al tracto respiratorio inferior por la aspiración de partículas provenientes del epitelio nasofaríngeo [17].

Las manifestaciones clínicas citadas anteriormente asociadas a la infección se dan en parte por la propia citotoxicidad viral, aunque principalmente, son consecuencia de la respuesta inmune del propio huésped. Se ha visto que tanto la propia respuesta del sistema inmunitario contra las células infectadas, como la inflamación del epitelio del tracto respiratorio, son las principales causas de la sintomatología asociada a la infección [18]. Por otro lado, en el caso de los niños más pequeños, el menor diámetro de los conductos respiratorios, la inflamación y la producción de moco en respuesta a la infección pueden llegar a obstruir las vías pulmonares generando una insuficiencia respiratoria, agravando todavía más el cuadro clínico [19].

### 2.2.2 Respuesta inmunitaria en la infección por el VRSH

La respuesta inmunitaria del huésped a la infección por el VRSH está mediada por mecanismos tanto del sistema inmunitario innato, que se activa en fases iniciales de la infección, como del sistema inmunitario adaptativo, que se inicia en fases más tardías.

**Inmunidad innata:** la primera respuesta a la infección por el VRSH se inicia por las propias células epiteliales infectadas. Estas, junto con las células dendríticas y los macrófagos alveolares, son las principales células efectoras de la respuesta inmunitaria innata. Al inicio de la infección se da un reconocimiento por parte de los receptores toll-like 4 de los virus circulantes [20]. La activación de los toll-like 4 mediante esta interacción genera la activación del NF- $\kappa$ B que, a su vez, induce la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias. Estas inician un conjunto de cascadas de señalización que provocan el reclutamiento de eosinófilos, monocitos y neutrófilos al epitelio pulmonar [18]. Por otro lado, el NF- $\kappa$ B también induce la producción de los interferones (IFN)  $\alpha$  y  $\beta$  que contribuyen a la activación de células efectoras.

La presencia del VRSH, además, induce la producción de proteínas surfactantes (SP-A y SP-D) que juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune pulmonar estimulando la activación de los macrófagos. Además, la proteína SP-D es capaz de unirse a la superficie del VRSH inhibiendo su adhesión a las células huésped [21].

Por otro lado, las células dendríticas juegan un papel importante en la respuesta inmune primaria. Mediante la presentación de antígenos, activan las células T *naïve* transformándolas en células T efectoras que producen INF $\gamma$ , IL-2 y IL-4, entre otras citoquinas antivirales. Estas moléculas inducen la proliferación de eosinófilos, leucotrienos e IgE cuya presencia se ha asociado a una respuesta inmune exacerbada [16].

Finalmente, las células *natural killer* (NK) actúan a nivel de la infección donde eliminan las células infectadas además de producir INF $\gamma$  y citoquinas activando así las células T CD8+ [22].

**Inmunidad adaptativa:** la inmunidad adaptativa mediada por células juega un papel muy importante en el curso de la infección por el VRSH. Estudios en los que se analizaba el tiempo de excreción del virus, demostraron que niños con inmunodeficiencias tenían periodos de excreción mucho más prolongados [23]. Las células T (CD4+ y CD8+), principales efectoras de la inmunidad adaptativa, juegan un papel muy importante en la resolución de la infección. Sin embargo, también son en parte responsables de una mayor gravedad del proceso infeccioso. Se ha demostrado en ratones infectados con el VRSH, que las células T son esenciales para la eliminación del virus. Sin embargo, su respuesta provoca una activación exacerbada del sistema inmune en las vías respiratorias causando una importante inflamación, que como se ha comentado anteriormente, puede influir negativamente en el curso clínico de la infección [24]. Los principales mediadores de la respuesta humoral son anticuerpos neutralizantes IgM, IgG e IgA. En recién nacidos a término se detecta la presencia de IgG protectores de la madre adquiridos por transferencia transplacentaria [25]. Los niveles en sangre de estos anticuerpos van disminuyendo desde el nacimiento hasta ser indetectables a partir del primer mes de vida. No es hasta la primera infección natural por el VRSH, cuando los niveles de IgG vuelven a aumentar [26]. Por otro lado, las IgA son detectables en el lugar de la infección donde neutralizarán el virus evitando su unión con la célula. Sin embargo, estos anticuerpos tienen una vida limitada por lo que su protección es temporal [27].

La mayor parte de anticuerpos generados durante una infección por el VRSH van dirigidos contra todas las proteínas estructurales del VRSH, sin embargo, solo aquellos dirigidos contra las principales proteínas de superficie son capaces de neutralizar el virus.

### 2.2.3 Epidemiología del VRSH

El VRSH es el principal agente vírico causante de infecciones de tracto respiratorio inferior (ITRI) en niños [28]. Se estima que prácticamente todos los niños han sufrido una infección durante sus dos primeros años de vida y que la mitad ya ha sufrido dos infecciones a los dos años. La ITRI por el VRSH tiene una incidencia global estimada del 22% anual, afectando hasta a 33.8 millones de personas. Esta alta incidencia se traduce en aproximadamente 3.4 millones de personas (10%) que requieren ser hospitalizadas. Esta cohorte de pacientes hospitalizados está compuesta principalmente por menores de 2 años previamente sanos en su mayoría (79%), siendo un 44% de estos menores de 2 meses (Figura 1) [1]. Se estima que la infección por el VRSH es la tercera causa principal de muerte por ITRI por detrás de la neumonía neumocócica y las infecciones por *Haemophilus influenzae*, y por delante de los virus de la gripe (VG), en niños menores de 5 años. Las estimaciones de mortalidad asociadas a la infección por el VRSH oscilan entre 36.000 y 199.000 en este grupo de edad [29]. Al darse los mayores índices de mortalidad en países subdesarrollados (99%), es muy complicado obtener una estimación ajustada de este valor. Sin embargo, junto con los VG y en contraste con la infecciones bacterianas anteriormente citadas, el ratio de mortalidad del VRSH es muy bajo, siendo su alta incidencia en la población la que le sitúa en la tercera causa de mortalidad en menores de 5 años por ITRI [30].

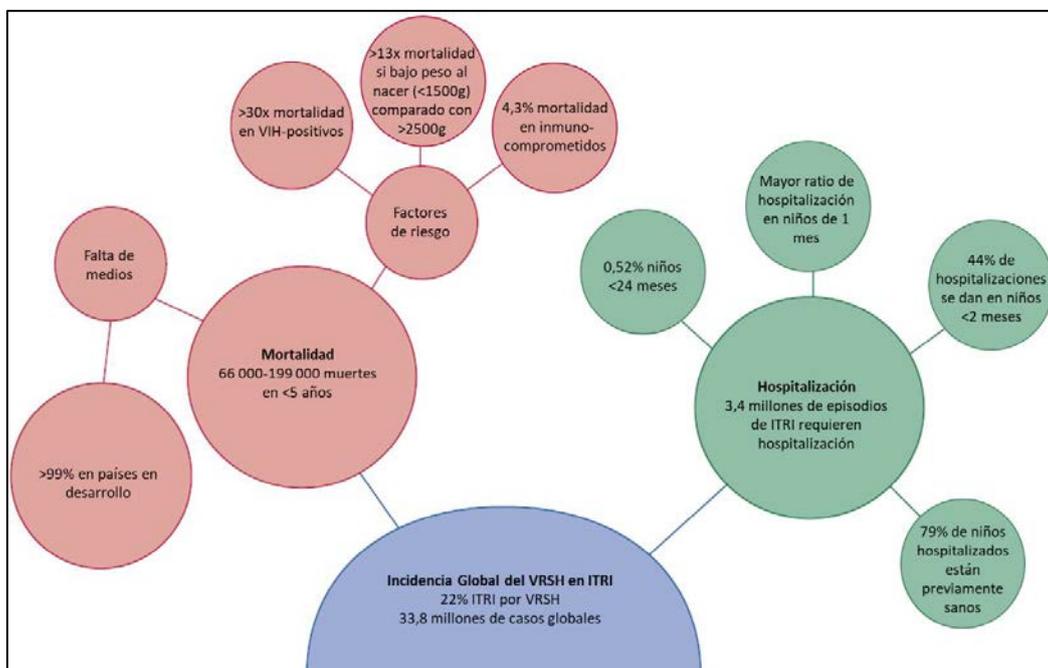


Figura 1: Prevalencia mundial de la infección por el VRSH. Imagen adaptada [1].

Existen ciertos factores de riesgo asociados a una mayor gravedad de la infección por el VRSH. Los pacientes más vulnerables de sufrir una infección grave son mayoritariamente pacientes con enfermedades cardíacas congénitas, enfermedades pulmonares crónicas, niños prematuros con un periodo de gestación inferior a 32 semanas, y pacientes con algún grado de inmunosupresión, incluyendo pacientes con una infección activa por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

### 2.2.4 Prevención, tratamiento y diagnóstico de la infección por el VRSH

#### 2.2.4.1 Prevención y tratamiento

La prevención es una de las medidas más efectivas en cuanto al control de las enfermedades infecciosas. En el caso del VRSH, la adopción de medidas para el control y la prevención de la transmisión es primordial, especialmente durante la fase epidémica en los centros hospitalarios. El contacto directo o indirecto con secreciones nasofaríngeas a través de pequeñas gotas o fómites son las principales vías de transmisión de la infección. Por ello, medidas como una correcta higiene de manos, evitar el contacto cercano con personas enfermas y sus secreciones, no llevarse las manos a la cara, cubrir la boca al estornudar o quedarse en casa cuando se está enfermo, siguen siendo los métodos de prevención más efectivos.

En cuanto al tratamiento, existe la ribavirina, un viroestático análogo de nucleósido que fue aprobado en 1986 por la *Food and Drug Administration* (FDA). Este, aun no siendo considerado un tratamiento antiviral específico frente a la infección del VRSH, está cada vez más en desuso por la falta de evidencias en su eficacia, así como sus efectos carcinogénicos. Así pues, la ribavirina se usa puntualmente en casos muy específicos, en pacientes con un cuadro clínico especialmente grave, como trasplantados de medula ósea [31, 32].

Más tarde, en 1996 la FDA aprobó el RespiGam para la prevención de la infección por el VRSH en menores de dos años con displasia broncopulmonar o historia de prematuridad. El RespiGam se obtenía a través del plasma de individuos sanos que tenían altas concentraciones de anticuerpos protectores frente al VRSH. Aunque este tratamiento no era capaz de prevenir completamente la infección, ayudaba a neutralizar el virus cuando se administraba minimizando así su gravedad [33].

En 1998, la FDA aprobó el palivizumab, tratamiento que se usa actualmente para la profilaxis en niños con alto riesgo de sufrir una infección severa, tales como pacientes con enfermedades

cardíacas congénitas, enfermedades pulmonares crónicas, y niños prematuros con un periodo de gestación inferior a las 32 semanas. [34] Aunque el palivizumab está indicado como tratamiento preventivo, también se administra en algunos casos durante una infección activa neutralizando la infectividad del virus, ayudando así a la respuesta propia del huésped y minimizando la gravedad de la infección. Sin embargo, el uso de este medicamento tiene como principal limitación su elevado coste y su uso exclusivamente hospitalario.

Por tanto, el tratamiento actual es principalmente de soporte, basado en la disminución de la fiebre con antitérmicos, el aspirado de las secreciones en caso de dificultad respiratoria, e incluso el soporte respiratorio en los casos más severos. En caso de bronquitis, se mantiene el tratamiento de soporte y además se administran broncodilatadores y corticoides para controlar la inflamación bronquial y facilitar la respiración [35].

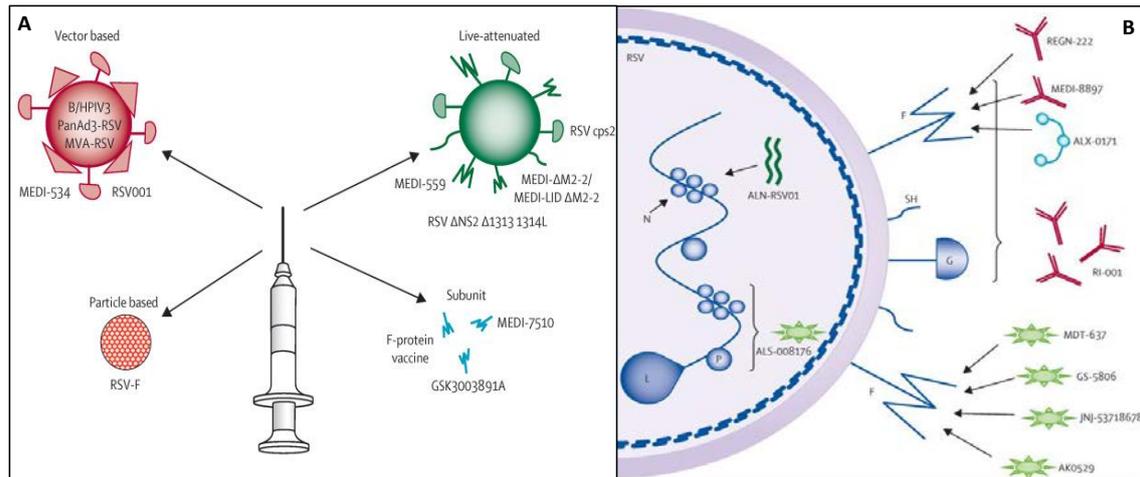
#### 2.4.4.3 Vacunas y antivirales

Siendo el VRSH una de las mayores causas de ITRI en la población pediátrica, el desarrollo de antivirales específicos y de una vacuna eficaz se ha convertido en uno de los principales objetivos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la iniciativa BRaVe (*Battle Against Respiratory Viruses*), de la comunidad científica y de las empresas farmacéuticas.

Una década después del primer aislamiento del virus, se desarrolló la primera vacuna. Esta estaba compuesta por virus inactivados con formalina (FI-RSV, *formalin-inactivate RSV*). Sin embargo, no resultó ser segura puesto que, aunque inicialmente los pacientes no presentaban efectos adversos después de su administración, un pequeño porcentaje de los casos cuando sufrían una infección natural desarrollaban la enfermedad con mayor gravedad, llegando incluso algunos de ellos a fallecer [36].

Actualmente, pese a los grandes esfuerzos, no existen ni vacunas ni antivirales aprobados eficaces frente a este virus. Sin embargo, un gran número de laboratorios a nivel internacional están trabajando en su desarrollo. En la Figura 2 se muestran todos los anticuerpos monoclonales, antivirales y vacunas en fases de desarrollo que se están estudiando actualmente. De forma resumida, por un lado, hay cuatro grandes tipos de vacunas en desarrollo: las basadas en vectores, las atenuadas, las basadas en partículas, y las subunidades virales. De éstas, diez vacunas están en fase de ensayo clínico (seis en fase 1 y cuatro en fase 2). Por otro lado, como antivirales existen 4 tipos de compuesto: inmunoglobulinas, siARN de

interferencia, inhibidores de fusión y pequeñas moléculas. Como se puede observar en la Figura 2, la gran mayoría de vacunas y antivirales en desarrollo se basan o están dirigidos contra la proteína de fusión (F), una de las principales proteínas de superficie [1]. Tal como se comentará más adelante (apartado 2.3.5), es considerada la principal proteína diana candidata para el desarrollo de estos fármacos por su alto grado de conservación, su gran capacidad inmunógena, y su función esencial en el ciclo replicativo viral.



**Figura 2:** Se muestran las vacunas (A) y tratamientos (inmunoglobulinas y antivirales) (B) en fases de desarrollo. Para los tratamientos, además, se muestran las proteínas del HRSV contra las que van dirigidos. Revisión de los tratamientos para el VRSH en desarrollo. Imagen adaptada [1].

#### 2.4.4.2 Diagnóstico

Existe un gran número de técnicas disponibles para el diagnóstico microbiológico del VRSH en muestra respiratoria. El uso de unas u otras depende en gran medida del coste de los reactivos, y el tiempo de respuesta y la sensibilidad requeridos. Los principales métodos de diagnóstico del VRSH empleados son técnicas de detección directa de los antígenos virales o del ARN viral, y en menor medida, el aislamiento viral en cultivo celular.

La detección de antígenos virales se fundamenta en el uso de anticuerpos monoclonales marcados directa o indirectamente con un fluoróforo (inmunofluorescencia o IF, inmunocromatografía o IC, y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA). Estas técnicas aun no siendo las más sensibles, permiten obtener resultados en tiempos muy reducidos [37]. Los métodos basados en la detección de ARN viral o moleculares se basan principalmente en la técnica de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (RCP).

Estos métodos moleculares, son ampliamente utilizados cuando se persigue un diagnóstico microbiológico de alta sensibilidad y especificidad. Además, ofrecen la gran ventaja de poder detectar diferentes dianas en un mismo ensayo, sin reducción importante de la sensibilidad, mejorando así sustancialmente el rendimiento de la técnicas [38].

El aislamiento en cultivo celular del VRSH se realiza principalmente en la línea celular HEp-2, aunque otras líneas son también sensibles a la infección. Estas son células heteroploides humanas derivadas de un carcinoma laríngeo. Aunque esta era la técnica más empleada en el pasado, actualmente su uso se limita prácticamente a los laboratorios de referencia por el gran consumo de recursos humanos y materiales que supone.

## 2.3 BIOLOGÍA DEL VRSH

### 2.3.1 Clasificación taxonómica

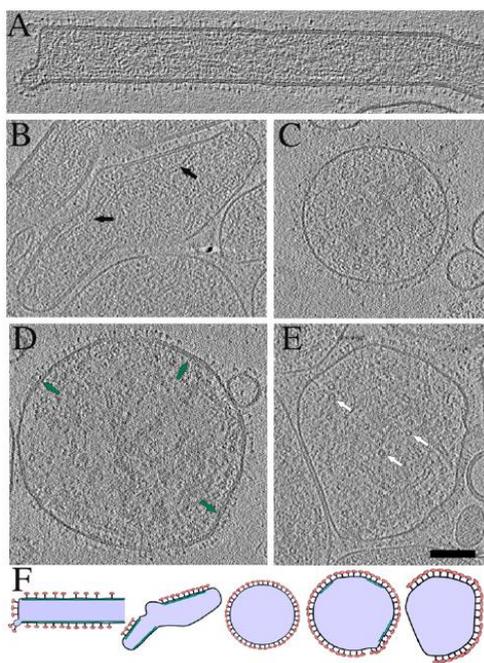
El VRSH pertenece al orden *Mononegavirales* y a la familia *Pneumoviridae*. Previamente, el VRSH pertenecía junto al metapneumovirus humano (MPVH) entre otros, a la familia *Paramyxoviridae* y a la subfamilia *Pneumovirinae*. Dada la similitud de las relaciones filogenéticas entre las subfamilias *Pneumovirinae*, *Paramyxovirinae* y las demás familias del orden de los *Mononegavirales*, así como la presencia exclusiva de la proteína M2 en los *Pneumovirinae* y la diferencia estructural de los complejos ribonucleoproteicos entre los miembros de ambas subfamilias, el International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) propuso los *Pneumoviridae* como nueva familia dentro del mismo orden. Así, en 2015 esta nueva familia fue nombrada y se subdividió en dos géneros, los *Metapneumovirus* y los *Orthopneumovirus* [39].

Por un lado, los *Metapneumovirus* están formados por las especies *Metapneumovirus humano* y el *Metapneumovirus aviar*. Por otro lado, dentro de los *Orthopneumovirus* se encuentran clasificadas las especies *Orthopneumovirus murino*, *Orthopneumovirus bovino* y *Orthopneumovirus humano*, anteriormente conocidas como *Virus de la pneumonia murina*, *Virus respiratorio sincitial bovino* y *Virus respiratorio sincitial humano*. El nombre de la especie también se cambió para evitar confusiones entre el nombre de la especie y el nombre común del virus. Antes de esta reclasificación, el nombre de la especie del VRSH era *Virus respiratorio sincitial humano* y su nombre común era virus respiratorio sincitial humano, por lo que solo se distinguían en el formato en el que se escribían (mayúscula y cursiva) dando lugar a confusiones.

Además, M.H Van Regenmortel *et al.* propuso dar al nombre de las especies un nombre no latinizado y binomial, norma que se está implementando al resto de las especies de lo *Mononegavirales* [40]. Por ello se renombraron estas tres especies, pero se mantuvo virus respiratorio sincitial humano y su abreviatura como nombre común del virus.

### 2.3.2 Morfología y composición del virión

Los VRSH aislados en cultivo celular tienen morfologías y tamaños muy variables (Figura 3). Existen partículas esféricas de entre 0.1-1  $\mu\text{m}$  de diámetro, sin embargo, también se encuentran



**Figura 3:** Tomografía de viriones de VRSH. La morfología de viriones va desde formas completamente filamentosas (A) hasta completamente esféricas (C) así como formas intermedias (B y D) que aun teniendo partes con forma tubular a grandes rasgos son esféricas. Se muestra una ilustración esquemática (F) de cada tomografía en orden alfabético [9].

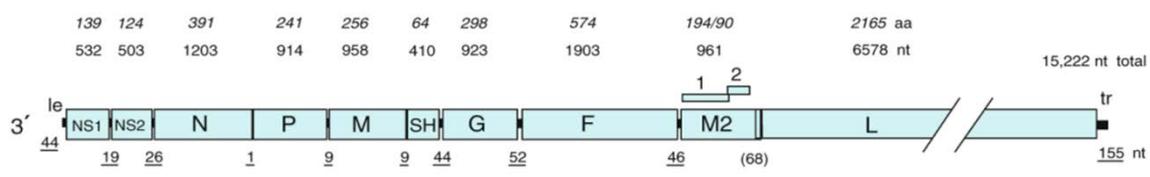
viriones de forma filamentosas de entre 70-190 nm de diámetro y de entre 2-0.2  $\mu\text{m}$  de longitud [9]. Las partículas víricas están constituidas, de adentro a fuera, por una nucleocápside helicoidal recubierta por una matriz proteica, envuelta a su vez por una cubierta lipoprotéica. La nucleocápside es un complejo que se encuentra protegiendo el material genético y está formado por la nucleoproteína (N), la polimerasa vírica (L), la fosfoproteína (P) y un factor antiterminador de la transcripción (M2-1). Por encima, la matriz está formada por una única proteína, la proteína de matriz (M), que interacciona directamente con la bicapa lipídica aportando una mayor estabilidad a la partícula. Finalmente, en la bicapa lipídica se encuentran ancladas tres proteínas víricas: una pequeña proteína hidrofóbica (SH), la glicoproteína (G) y la proteína de fusión (F) [6].

### 2.3.3 Organización genómica y proteínas virales

El genoma viral está constituido por una única molécula de ARN, monocatenaria, lineal, de polaridad negativa, de aproximadamente 15,200 nt. A diferencia del genoma de muchos otros virus, el VRSH carece de *cap* en el extremo 5' y de cola de poliadenilación (poliA) en el extremo

3'. Para mantener la integridad tanto del genoma como del antigenoma, estos se encuentran unidos a la proteína N formando, junto con otras proteínas, la nucleocápside. Más allá de sus funciones estabilizadoras, este complejo mantiene el material genético vírico a salvo de los procesos de degradación y de los receptores de detección de material foráneo de la célula huésped encargados de iniciar la respuesta inmunitaria.

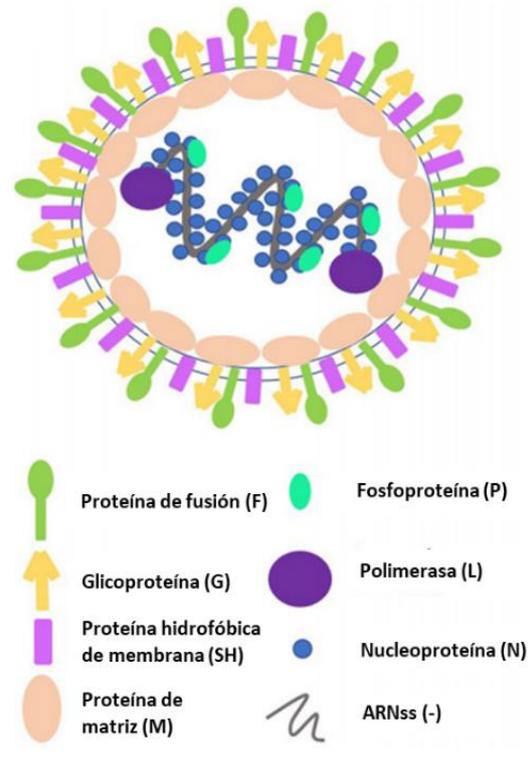
El genoma consta de diez genes que se encuentran en el siguiente orden desde el extremo 3' al extremo 5': NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L (Figura 4). Cada uno de estos genes se transcribe en un único ARN mensajero (ARNm) subgenómico excepto el gen M2 que tiene dos marcos abiertos de lectura (ORF, *Open Reading Frame*) superpuestos. En el extremo 3' hay una región de 44 nt extragenética que precede a la ORF del gen NS1, mientras en el extremo 5' del genoma hay una región de 155 nt extragenética que sigue al gen L. Cada gen es precedido por una región inicial de 9 nt altamente conservada llamada señal *gene-start* (GS) y termina con una región moderadamente conservada de entre 12 y 14 nt llamada señal *gene-end* (GE) que se caracteriza por tener uracilos en sus últimas 4 a 7 posiciones que darán lugar a la cola de poliA en el ARNm resultante. Además, los primeros nueve genes se encuentran separados entre ellos por regiones intergénicas que varían en su tamaño entre 1 nt y 58 nt. Estas regiones carecen de motivos conservados entre cepas por lo que parecen ser sólo regiones espaciadoras. Sin embargo, el primer nucleótido de estas regiones parece tener un papel importante en la terminación de la síntesis del ARNm [41, 42]. Por lo contrario, los últimos dos genes (M2 y L) se solapan en 68 nt, siendo la región GS del gen L la que se encuentra solapada con el final del gen M2 [8].



**Figura 4:** Esquema de la organización genómica del VRSH. Imagen adaptada [8].

A continuación, se describen brevemente las funciones y características de nueve de las once proteínas codificadas en el genoma del VRSH según se encuentran en el genoma en el sentido 3' → 5' (Figura 5). Dada la importancia de las proteínas G y F para la caracterización del VRSH, principal objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral, estas proteínas se describirán con mayor detalle más adelante (ver secciones 2.2.4 y 2.2.5).

**Proteínas no estructurales (NS1 y NS2):** son proteínas multifuncionales que parecen tener como función principal la modulación del sistema inmunitario del huésped. Inhiben la producción de IFN así como las vías de señalización activadas por el mismo IFN [43]. Además, pueden inhibir la apoptosis celular facilitando así la replicación viral, e incrementando así la carga viral [44]. En efecto, en una infección con virus recombinantes carentes de NS1 y/o NS2 se observa una mayor tasa de apoptosis y una menor eficiencia replicativa tanto en cultivo celular como *in vivo* [45, 46]. Aunque estas dos proteínas pueden funcionar independientemente la una de la otra parece que forman un complejo con un efecto sinérgico entre ellas.



**Figura 5:** Representación de la estructura del VRS y de sus proteínas virales. Imagen adaptada [6].

**Nucleoproteína (N):** como mayor constituyente de la nucleocápside, esta proteína tiene dos dominios de unión. Por un lado, su mitad N-terminal se une tanto al genoma como al antígeno y, por otro lado, su extremo C-terminal interactúa con la proteína P. De este modo, la nucleocápside protege al material genético durante la transcripción y replicación evitando la formación de estructuras secundarias del ARN y su detección por parte de mecanismos celulares con actividad antiviral [47].

**Fosfoproteína (P):** es un cofactor esencial para la polimerasa. A nivel estructural funciona como un adaptador que une las proteínas N, M2-1 y L entre ellas formando la nucleocápside. La proteína P se encuentra como homotetrámero formando un dominio de multimerización en su centro. Por otro lado, la proteína P se une a los monómeros de la proteína N y los guía hasta los genomas y antígenomas en proceso de síntesis. De este modo esta proteína evita la autoagregación de la proteína N así como su unión al ARN no vírico presente en la célula, favoreciendo así la replicación del virus [48]. Junto con la proteína N forma cuerpos de inclusión en la célula huésped donde tiene lugar la síntesis del ARN vírico.

**Proteína de matriz (M):** juega un papel esencial en la morfogénesis del virión al componer la matriz proteica. Es una proteína no glicosilada con un dominio hidrofóbico en su extremo C-

terminal que mantiene la matriz proteica unida con la membrana lipídica que la rodea [49]. Además, parece ser la responsable del transporte de la nucleocápside desde los cuerpos de inclusión hasta la membrana plasmática de la célula huésped [50].

**Proteína hidrofóbica de membrana (SH):** es una glicoproteína de tipo II de pequeño tamaño que está anclada a la membrana por su extremo N-terminal y tiene su extremo C-terminal en la región extracelular. De forma general la proteína SH no está glicosilada, aunque se sabe que puede presentarse en distintas isoformas por la adición de N-azúcares o polilactosaminoglicanos, aunque se desconoce la funcionalidad de estos. Además, por la existencia de un segundo codón de iniciación la proteína SH se puede sintetizar en una forma más corta. La proteína SH forma poros pentaméricos con una actividad de canal de cationes selectivo [51, 52]. Aunque no se conoce exactamente la función de este canal se cree que podría actuar como una viroporina pudiendo afectar así a la liberación de virus y a la apoptosis celular. Además la proteína SH parece tener una función inhibitoria en la señalización de TNF- $\alpha$ , una citoquina antiviral [53]. Sin embargo, parece que la delección del gen SH no altera ni la capacidad infectiva del virus, ni su capacidad de formar sincitios *in vitro* [54-56].

**M2-1:** es un factor implicado en la regulación de la transcripción mediante su unión al ARN viral y a la proteína P. Es un factor antiterminador de la transcripción que contribuye a la producción de ARNm completos y policistrónicos [57]. Por otro lado se cree que está implicado en el transporte de la proteína M a los cuerpos de inclusión [58].

**M2-2:** juega un papel en la regulación de la transcripción y replicación del ARN vírico. Su nivel de expresión en células infectadas es muy bajo, especialmente en las fases iniciales de la infección ya que su ORF está superpuesto al de la proteína M2-1 en su región *upstream*. En experimentos de infección en cultivo celular con virus en los que se separan las ORF de estas dos proteínas, incrementando así la expresión de la proteína M2-2 se ha visto una tasa de replicación mucho más disminuida, por lo que se sugiere que tiene un papel regulador de dicho proceso [59].

**Polimerasa (L):** es una ARN polimerasa dependiente de ARN que forma parte de la nucleocápside, por lo que está siempre presente en los viriones maduros [60]. Como para todos los virus ARN, su presencia es indispensable para los procesos de transcripción y replicación [61].

### 2.3.4 La proteína G

La proteína G se caracteriza por encontrarse en dos conformaciones durante la infección. Por un lado, y junto con la proteína F, es una glicoproteína transmembrana cuya mayor porción se encuentra expuesta en la región extracelular. Por otro lado, existe una forma truncada y soluble (Gs), que es excretada en grandes cantidades por las células infectadas.

La proteína G de membrana se traduce inicialmente como un polipéptido precursor de unos 300 aminoácidos (32 kDa) dependiendo de la cepa. Una vez traducida, la proteína es trasladada al retículo endoplasmático (RE) donde sufre modificaciones postraduccionales por la adición de N-glucósidos en residuos de asparagina. Estas modificaciones incrementan su peso molecular llegando a los 40-50 kDa [62]. Posteriormente, en la red trans Golgi se cambian los enlaces N-glicosídicos al tipo complejo y se añaden O-glucósidos en residuos de serina o treonina alcanzando así un peso molecular final de 80-90 kDa [63].

Los primeros 35 aminoácidos del extremo N-terminal componen una cola citoplasmática. Posteriormente, entre los aminoácidos 36 y 67 hay una región hidrofóbica que conforma la región transmembrana que además de anclar la proteína a la membrana lipídica, actúa como péptido señal asegurando la traslocación de la proteína inmadura al RE (Figura 6). Por otro lado, el ectodominio de la proteína se divide en tres regiones; dos de ellas son regiones similares a mucinas y la tercera, flanqueada por las dos anteriores, es un pequeño dominio muy conservado (Figura 6). Este dominio central, muy conservado entre cepas, contiene cuatro cisteínas en los residuos 173, 176, 186 y 182 que, en la proteína madura forman dos puentes disulfuro entre ellas [64]. Además, dentro de esta región se encuentra un dominio CX3C que actúa modulando la respuesta inmunitaria mimetizando la actividad quimiotáctica de los leucocitos e inhibiendo

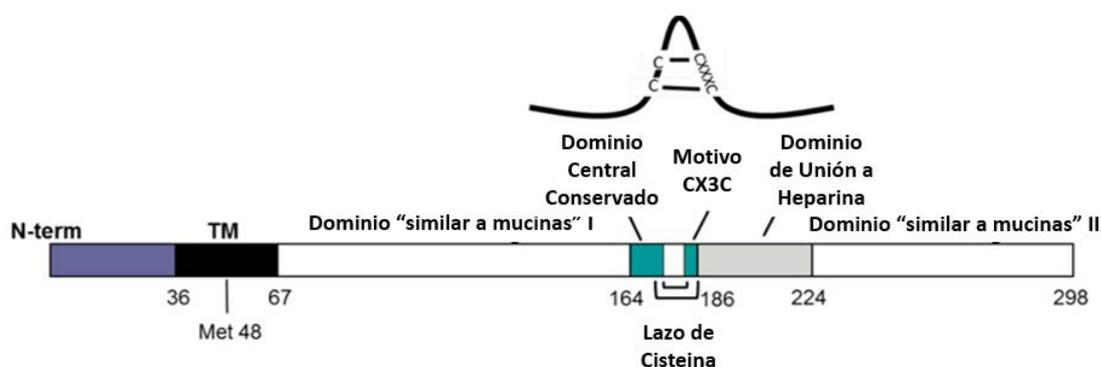
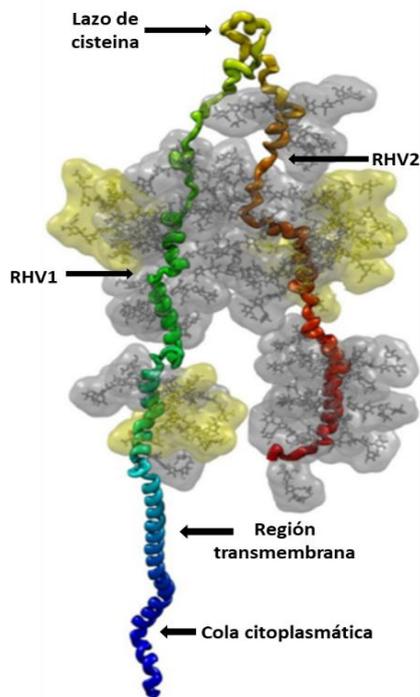


Figura 6: Se muestra los distintos dominios de la proteína G. Imagen adaptada [7].

la activación de NF- $\kappa$ B y de las quimioquinas proinflamatorias. Inmediatamente después se encuentra un dominio de unión a la heparina encargado de la unión del virus a la superficie de la célula huésped a través de fragmentos heparán sulfato (proteoglicanos) [65]. Por otro lado, las otras dos regiones que flanquean la región central se caracterizan principalmente por su gran variabilidad, convirtiendo al gen de la proteína G en el más variable del genoma del VRSH. Por ello, son comúnmente denominadas región hipervariable 1 y región hipervariable 2 (RHV-1 y RHV-2). Ambas regiones se caracterizan además por tener todos los sitios potenciales de N-glicosilación, y por su alto contenido en serinas y treoninas que actúan como puntos potenciales de O-glicosilación. Por su composición aminoacídica y el alto número de modificaciones postraduccionales que pueden sufrir, se asemejan mucho a las mucinas, las glicoproteínas que presentan las células epiteliales en su membrana [66].



**Figura 7:** representación 3D de la proteína G (cepa A2). Se muestran las dos regiones altamente glicosiladas similares a mucinas separadas por la región conservada en la parte superior (amarillo). Se muestran en amarillo las N-glicosilaciones y en gris las O-glicosilaciones. Imagen adaptada [7]

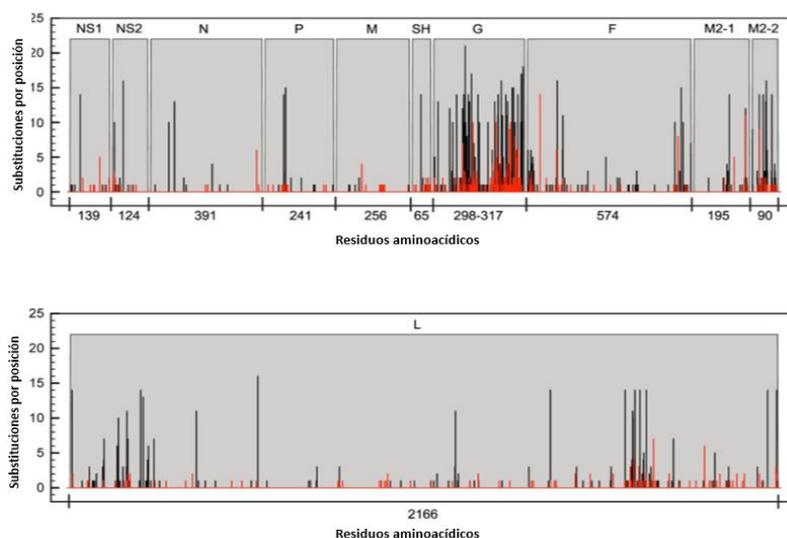
En la Figura 7 se representa un modelo tridimensional de la estructura de la proteína G en su forma monomérica, aunque esta se encuentra en la membrana del virus en forma de homotetrámero. La Gs secretada al medio se encuentra en forma monomérica por lo que se cree que este homotetrámero se forma por la oligomerización de la región transmembrana ausente en la forma Gs [67]. En la Figura 5 se aprecia que la RHV-1 forma una vara rígida que mantiene su estructura gracias a la presencia de cadenas de azúcares muy cercanas entre ellas [68]. Gracias a la rigidez aportada por esta región, el dominio de unión al receptor queda expuesto en la parte más apical de la proteína facilitando así la unión a la superficie celular. El dominio de unión al receptor celular, gracias al nodo formado por los cuatro residuos de cisteína, conforma un giro entre dos láminas  $\beta$  estabilizado por puentes disulfuro [69]. Además esta región es ligeramente hidrofóbica facilitando así la unión con el receptor [70].

En esta misma región además, se encuentran dos epítomos altamente conservados [71]. Finalmente, la RHV-2, al encontrarse en la región C-terminal y estando más expuesta al espacio extracelular, es la zona más accesible a los anticuerpos, en este caso específicos de cepa. Estos epítomos están directamente condicionados por las glicosilaciones que contiene esta región,

cuya adición no depende solo de la secuencia nucleotídica sino también del tipo celular donde replican. Por ello, son extremadamente variables [66, 72].

En la Figura 8 se muestra el resultado de un estudio de Lydia Tan *et al.* [2] en el que se secuenciaron los genomas completos de VRSH aislados en muestras de pacientes y posteriormente analizaron su variabilidad respecto una secuencia consenso a lo largo del genoma. En ella se puede apreciar que el número de sustituciones por posición de la proteína G es mucho más elevado en comparación con el resto de proteínas. Por otro lado, se sabe que esta proteína es capaz de adaptarse a cambios muy drásticos en su secuencia. En los últimos años se ha visto como las regiones RHV-1 y RHV-2 son capaces de incorporar duplicaciones de tamaños muy variables, desde 3 nucleótidos hasta 72 dando lugar a un tamaño muy variable en la proteína resultante. Otro cambio drástico que se ha observado en este gen y que también afecta al tamaño final de la proteína, es la incorporación de codones de terminación prematuros en la región terminal de la RHV-2.

La proteína G<sub>s</sub> se sintetiza debido a la existencia de un segundo codón de iniciación que corresponde al aminoácido 48 de la proteína G, el cual se encuentra dentro de la región hidrofóbica [73]. Esta proteína G<sub>s</sub> se encuentra en grandes cantidades en el espacio extracelular durante una infección y tiene como función principal la inhibición del receptor toll-like jugando así un papel muy importante en la inmunomodulación de la respuesta inmune del huésped. Por otro lado, se une a los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la proteína G de membrana minimizando así la neutralización de los viriones circulantes por el sistema inmunitario del huésped [74].



**Figura 8:** Variabilidad genética entre distintas cepas observada en todos los genes del VRSH. En el eje vertical se muestra el número de sustituciones aminoacídicas por posición (barras negras para el VRSH-A y barras rojas para VRSH-B) respecto a una secuencia consenso. En el eje horizontal se muestra la secuencia de residuos aminoacídica del genoma del VRSH. Imagen

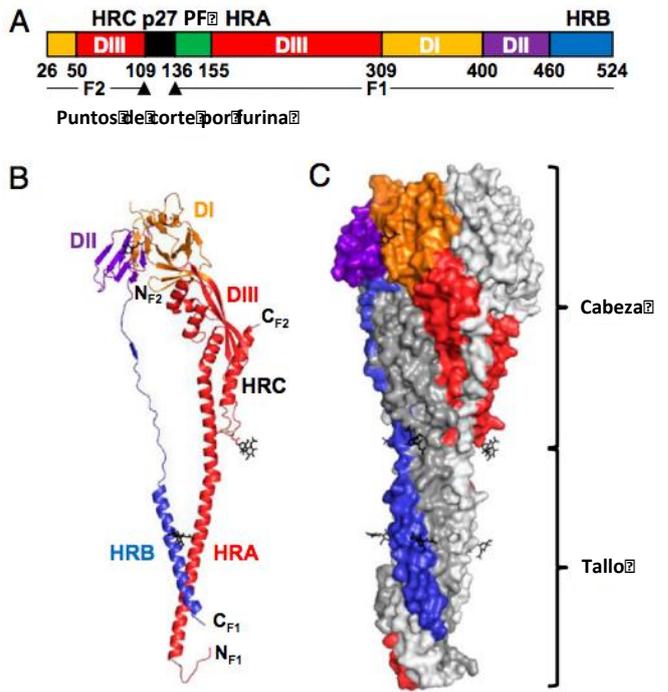
### 2.3.5 La proteína F

La proteína F es una glicoproteína de tipo I altamente conservada cuya principal función es la de fusionar las membranas del virus y de la célula huésped permitiendo así la entrada de la nucleocápside en el interior del citoplasma. Como consecuencia de esto, una vez iniciado el proceso de replicación, las células infectadas expresan proteína F en grandes cantidades en su membrana que son capaces de fusionar la membrana de las células infectadas con las células adyacentes siendo entonces la responsable de la formación de los sincitios observados en el aislamiento en cultivo celular, efecto citopático tan característico de este virus [75, 76].

Inicialmente se sintetiza en una forma inactiva ( $F_0$ ) que posteriormente es procesada proteolíticamente en el trans Golgi por una furina. Esta proteólisis se da en dos sitios de corte que delimitan el péptido pep27 (aa109 y aa136) resultando en dos cadenas ( $F_2$  y  $F_1$ ) que se mantendrán unidas por al menos un puente disulfuro y que conformarán la proteína madura que se encuentra en la superficie del virus en forma homotrimérica [77, 78].

La proteína F contiene tres regiones hidrofóbicas. La primera es un péptido señal (PS) que se encuentra en la región N-terminal (aa 1-21) y que guiará la translocación de la proteína al RE. La segunda, un poco más alejada de la región N-terminal (aa 137-155), es un péptido de fusión (PF), responsable de la fusión de membranas. Por último, la tercera se encuentra en la zona C-terminal y compone la región transmembrana (TM) que permitirá el anclaje de la proteína a la membrana plasmática [79]. Adyacentes al PF y a la región TM se encuentran tres regiones heptádicas repetidas (HRA, HRB y HRC) que aportan estabilidad estructural a la proteína (Figura 9) [80].

La proteína F puede encontrarse en dos formas conformacionales, prefusión y postfusión. En la superficie del virus (y de las células infectadas), la proteína F se encuentra en una conformación estable llamada prefusión. Para llevar a cabo su actividad de fusión de membranas, realiza un

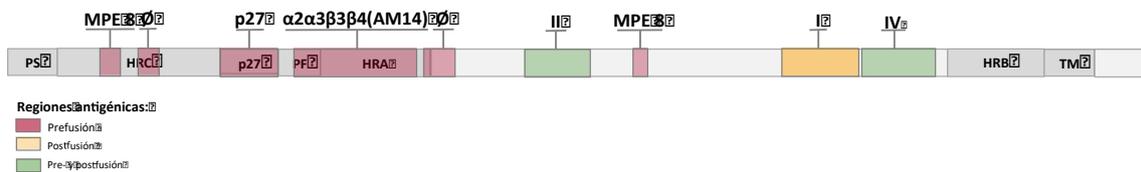


**Figura 9:** Conformación estructural de la proteína F. (A) diagrama lineal de los diferentes dominios de la proteína F (PS: péptido señal, PF: péptido de fusión, TM: región transmembrana, HRA/B/C: regiones heptádicas repetidas). Los dos triángulos negros muestran los puntos de corte proteolítico. (B) Representación de la estructura proteica. (C) Estructura del ectodominio de la proteína en forma trimétrica. Imagen adaptada [3].

cambio conformacional en el que quedarán expuestos los PFs del homotrímero en la parte más apical del virus para que estos puedan fusionarse con la membrana de la célula. Esta conformación final es la llamada postfusión [81].

En una infección por el VRSH se generan un gran número de anticuerpos neutralizantes contra la proteína F. La mayoría de estos anticuerpos reconocen epítomos presentes en la conformación prefusión de la proteína, y son aquellos con mayor capacidad neutralizante [82]. Las regiones antigénicas presentes en esta conformación son los dominios  $\phi$ , MPE-8, pep27,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 4$  (siendo las últimas cuatro

reconocidas por el mismo anticuerpo AM14) [83-86]. Sin embargo, también se ha descrito una región antigénica en la conformación postfusión, el dominio antigénico I [87] (Figura 8). Además, existen los epítomos II y IV presentes en ambas conformaciones [88, 89]. De hecho, la región antigénica II es el dominio diana del palivizumab, el anticuerpo monoclonal usado para la prevención de la infección por el VRSH (Figura 10).



**Figura 10:** Regiones antigénicas de la proteína F. Se muestran en rojo las regiones antigénicas presentes en la conformación prefusión, en amarillo la presente en la conformación postfusión y en verde aquellas presentes en ambas conformaciones.

La proteína F es una proteína altamente conservada entre ambos grupos del VRSH mostrando una similitud aminoacídica del 90%. Su alto grado de conservación, su localización en la partícula vírica y su potencial antigénico, convierten a la proteína F en la principal diana para el desarrollo de vacunas, de anticuerpos monoclonales y de péptidos inhibidores de la infección [90].

### 2.3.6 Ciclo replicativo

En la Figura 11 se muestran ilustradas las etapas que componen el ciclo replicativo del VRSH que se explican a continuación.

El primer contacto entre la célula huésped y el virus se da cuando la proteína G se une al receptor de la membrana celular, la nucleolina [91]. Una vez han entrado en contacto, la proteína F sufre un cambio conformacional que permite la fusión entre ambas membranas permitiendo la entrada de la nucleocápside en el citoplasma celular. Una vez en el citoplasma el ARN vírico con polaridad negativa se replica generando un ARN complementario o antígenoma que servirá tanto de molde para generar nuevos ARN vírico que más adelante serán encapsidados, como de molde para la transcripción de ARNms.

Para el proceso de transcripción la polimerasa se une a un único promotor situado en el extremo 3' a partir del cual se irá desplazando hasta el extremo 5' a lo largo del genoma. Una vez la polimerasa (L) se une al ARN y empieza a desplazarse, funcionará por un mecanismo de terminación y reiniciación en función de las señales de iniciación GS y de terminación GE, presentes en las regiones intergénicas [92, 93]. Sin embargo, estas secuencias no tienen una efectividad completa por lo que la polimerasa no siempre responde a su señal, además, es necesario que termine la transcripción de un gen para iniciar la del siguiente. Por estos motivos se genera un gradiente de ARNms en el que aquellos genes más próximos al extremo 3' se transcribirán en mayores cantidades, especialmente en las fases iniciales del ciclo, que aquellos presentes en el extremo 5' [93]. Este tipo de transcripción es la principal estrategia del virus para el control de la expresión de las diferentes proteínas virales.

Una vez sintetizados los ARNs, se produce la traducción y cambios postraduccionales en las proteínas de superficie, F y G. A medida que se van sintetizando, estas se van acumulando en la membrana de la célula donde se unen a las nucleocápsides que se van formando. Cuando todo el material necesario para la formación del virión está encapsidado, por un proceso de gemación se liberan los nuevos viriones al espacio extracelular.

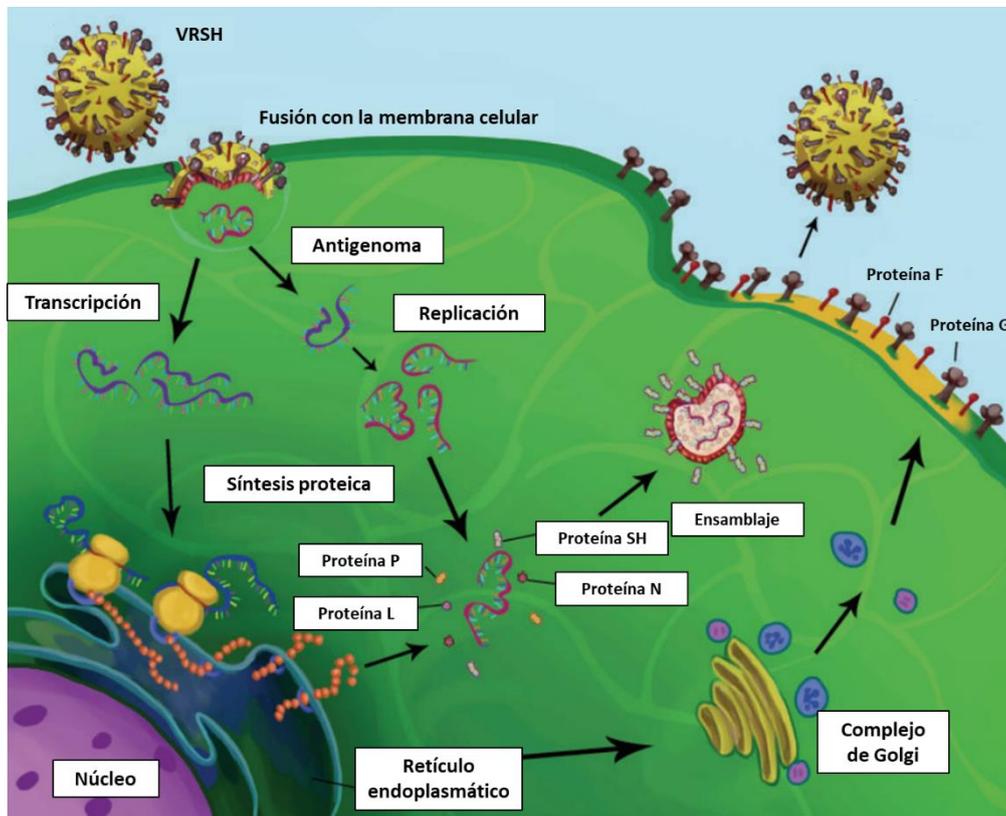


Figura 11: Representación esquemática del ciclo replicativo del VRSV. Imagen adaptada [4].

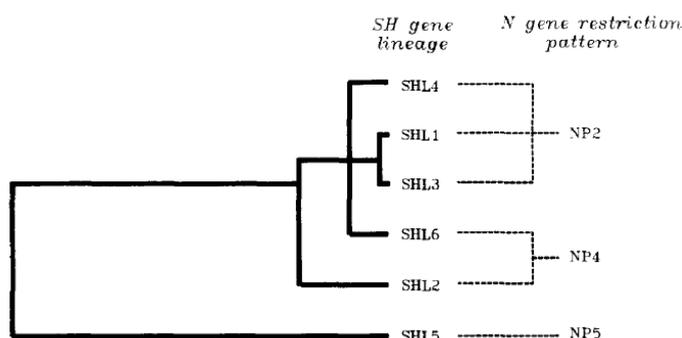
## 2.4 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y CIRCULACIÓN DEL VRSV

### 2.4.1 Caracterización molecular del VRSV

Desde el primer aislamiento del VRSV por Chanock *et al.* y en los años posteriores se consideró que solo existía un único serotipo de VRSV [11]. Más adelante, a principios de los años 60 en estudios de neutralización con sueros hiperinmunes animales se observó que existían diferencias a nivel antigénico, por lo que se extrapoló que el origen de estas diferencias sería la

existencia de distintos tipos antigénicos de VRSH [94-96]. En los años 80, con la aparición de las técnicas de análisis antigénico con anticuerpos monoclonales, que tenían una mayor resolución, se evidenció la existencia de tan solo dos grupos que se clasificaron como VRSH-A y VRSH-B [97-99]. El uso de anticuerpos monoclonales en técnicas de inmunoensayo, además, permitió encontrar diferencias antigénicas. Se observó que las mayores diferencias antigénicas encontradas entre ambos grupos estaban definidas por la proteína G. Más tarde, mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales específicos de grupo y con métodos basados en escisión por RNasas, se observó que había una cierta heterogeneidad dentro de los dos grupos definidos previamente, evidenciándose así la existencia de subgrupos [100-103].

A partir de los años 90 se empezaron a usar nuevos métodos para discriminar mejor entre los distintos subgrupos que se sabía existían dentro de los grupos VRSH-A y VRSH-B. Uno de estos primeros métodos utilizados fue el estudio de la proteína N mediante la técnica de análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (PLFR), pudiendo distinguir hasta tres subgrupos (NP2, NP4 y NP5) para los VRSH-A, y hasta dos grupos (NP-1 y NP-3) para los VRSH-B. Sin embargo, no existía una clasificación consensuada entre los distintos autores. Posteriormente, con la aparición e implementación de las técnicas de secuenciación se empezaron a analizar las secuencias codificantes de las distintas proteínas del virus. Con ellas se construyeron los primeros árboles filogenéticos que permitían discernir con precisión los subgrupos existentes dentro del VRSH-A y el VRSH-B. En la Figura 12, se muestra el resultado de un estudio en el que se compararon las diferencias genéticas encontradas en la secuencia del gen SH de VRSH-A con los subgrupos definidos en trabajos previos mediante PLFR (NP2, NP4 y NP5) [5, 104]. Estos estudios evidenciaron que la técnica de secuenciación y su posterior representación en un árbol filogenético era la que aportaba una mayor resolución para la



**Figura 12:** Dendrograma mostrando la clasificación del VRSH-A según la técnica de secuenciación de la proteína SH y la técnica PLFR de la proteína N y su relación [5].

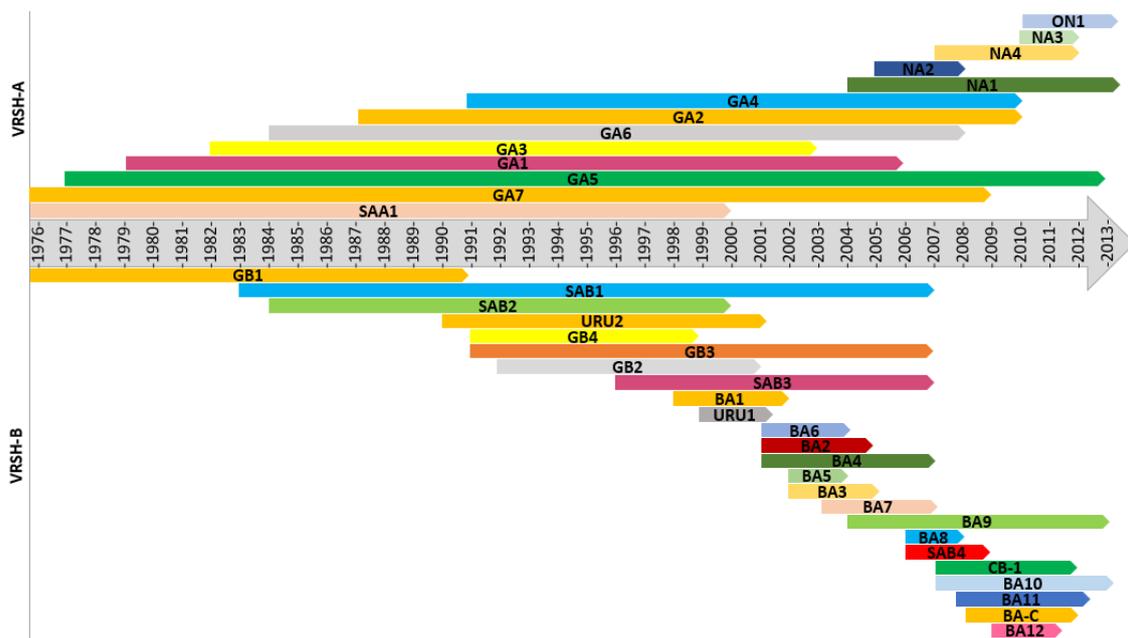
definición de los diferentes subgrupos dentro del VRSH-A y del VRSH-B.

Aunque en estudios previos ya se había observado que la proteína G era la proteína vírica que mostraba mayor variabilidad antigénica, no fue hasta finales de la década de los

90 cuando se empezó a establecer el uso de la secuenciación de la proteína G como una herramienta útil en la realización de estudios epidemiológicos.

En dos trabajos publicados en 1998 y 1999 Peret *et al.* [105, 106] clasificaron por primera vez los subgrupos según la nomenclatura que actualmente está en uso. Subdividieron el VRSH-A en siete subgrupos (GA1 a GA7) y el VRSH-B dentro de cuatro subgrupos (GB1 a GB4) a raíz del análisis filogenético de cepas circulantes entre el 1990 y 1995. Además, emplearon por primera vez el término “genotipo” para referirse a estos subgrupos. A raíz de este estudio y del uso cada vez más extendido de la secuenciación se empezaron a publicar cada vez más estudios de epidemiología molecular del VRSH en los que se fueron describiendo nuevos genotipos a medida que eran identificados. En la Figura 13, se representa la circulación por años de los diferentes genotipos descritos en ambos grupos del VRSH hasta el 2013, fecha del inicio de los trabajos de la presente Tesis Doctoral.

Actualmente, de forma general se usa la RHV-2 de la proteína G para la realización de estudios de epidemiología molecular como herramienta de clasificación dado que es lo suficientemente variable e informativa como para poder discernir entre genotipos.



**Figura 13:** Esquema temporal de la aparición y años de detección a nivel global de los distintos genotipos desde 1976 hasta 2013. En la parte superior de muestran los genotipos de VRSH-A y en la parte inferior los genotipos del VRSH-B.

## 2.4.2 Circulación del VRSH

El VRSH causa epidemias anuales a nivel mundial con un patrón estacional muy definido y muy dependiente, en cuanto a la época de año y a su duración, de la zona geográfica. En algunos estudios se ha asociado esta variable circulación entre países a factores climáticos tales como la temperatura y la humedad [107, 108]. Sin embargo, estas variables no parecen ser los únicos determinantes de su circulación.

En Europa, de forma general, la epidemia se inicia a principios de diciembre, alcanza su mayor pico a principios de febrero y termina a principios de abril. Aunque existen variaciones entre países. En efecto, se ha establecido una correlación entre el gradiente latitudinal y el inicio de la epidemia, así como con su duración. De este modo, por un lado los países más al sur suelen alcanzar antes su pico epidémico máximo, y por otro lado los países nórdicos suelen sufrir epidemias de mayor duración [109]. Sin embargo, en cuanto a la duración de la epidemia, en Estados Unidos se ha descrito una tendencia opuesta, donde las zonas más al sur son las que presentan epidemias más duraderas [110]. Por ello, todavía queda por esclarecer qué factores, más allá de la temperatura y de la humedad, son responsables de la aparición, finalización y duración de las epidemias.

Durante las epidemias suele haber cocirculación de ambos grupos de VRSH, aunque por lo general y dependiendo de la temporada, siempre hay uno de los dos que prevalece sobre el otro. Algunos estudios sugieren que existe un patrón cíclico bienal en la alternancia del predominio de un grupo u otro. Estudios realizados en Bélgica, Estados Unidos, Kenia, Gran Bretaña y Uruguay han detectado este patrón de circulación [111-115], aunque en España este patrón bienal no se ha documentado [116].

Por lo que a la circulación de genotipos se refiere, en una misma temporada suele haber cocirculación de distintos genotipos. Las proporciones de dichos genotipos varían temporada tras temporada, y cíclicamente hay un reemplazo de los genotipos circulantes más antiguos por otros nuevos emergentes. Esta heterogeneidad en su circulación también se observa a nivel global. Como se puede observar en la Figura 11 (apartado 1.2.1) existen genotipos que persisten hasta 31 años y, en cambio, hay otros que emergen una temporada y ya no vuelven a ser detectados. Sin embargo, aunque un genotipo pueda prevalecer durante muchas temporadas las proporciones en las que circula van variando. No se conoce el mecanismo que determina este

reemplazo a nivel de genotipo. Sin embargo, la principal teoría defiende que podría tratarse de una adaptación del virus al estado inmunológico poblacional.



# 3.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

### 3.1 HIPÓTESIS

La diversidad genética del VRSH es ampliamente conocida. Esta diversidad genética de los virus en circulación muy probablemente estará condicionando, junto con otros factores como los ambientales, tanto la actividad como la gravedad de la epidemia anual. Sin embargo, son pocos los estudios o iniciativas de vigilancia virológica en Europa, que más allá de establecer el patrón temporal de circulación, realicen una caracterización de los virus circulantes. El conocimiento preciso de las características virológicas de los virus detectados en nuestra área geográfica, especialmente del paciente hospitalizado, contribuirá a mejorar los actuales sistemas de vigilancia. Estos, a corto plazo, serán una herramienta indispensable para monitorizar con mayor detalle la epidemia anual, mejorar la gestión de los recursos asistenciales y la adopción de medidas en Salud Pública reduciendo así la morbilidad y mortalidad asociadas. Además, este conocimiento es una información valiosa en un momento donde el desarrollo de antivirales específicos, tratamientos preventivos y sobretodo de una vacuna efectiva son los principales retos.

### 3.2 OBJETIVOS

1. Estudiar la epidemiología del VRSH en un hospital terciario de Barcelona durante cinco temporadas de vigilancia (2013 - 2018).
2. Estudiar la diversidad genética (grupo genético, genotipo y linajes) de los VRSH detectados durante cinco temporadas de vigilancia (2013 - 2018) en base a la secuencia parcial codificante de la proteína G.
3. Estudiar las características genéticas de la proteína F, especialmente de las regiones antigénicas ya conocidas, en base a la secuencia completa de los VRSH detectados durante cinco temporadas de vigilancia (2013 - 2018).



# 4. RESULTADOS

---



## 4. RESULTADOS

---

Los resultados de la presente Tesis Doctoral por compendio de artículos son los expuestos en los siguientes estudios publicados:

**. Primer Trabajo:**

**Titulo:** Molecular epidemiology and molecular characterization of respiratory syncytial viruses at a tertiary care university hospital in Catalonia (Spain) during 2013-2014 season.

**Revista:** Journal of Clinical Virology

**Factor de Impacto:** 3.101

**Cuartil:** Q2

**. Segundo Trabajo:**

**Titulo:** Circulation of a novel human respiratory syncytial virus group B genotype during the 2014-2015 season in Catalonia (Spain).

**Revista:** Clinical Microbiology and Infection

**Factor de Impacto:** 4.57

**Cuartil:** Q1

Entre el material del apartado Anexo se adjuntan otros dos artículos adicionales enviados pero pendientes de aceptación:

**. Tercer trabajo:**

**Titulo:** Virological surveillance of human respiratory syncytial virus A and B at a tertiary hospital in Catalonia (Spain) during five consecutive seasons (2013-2018)

**. Cuarto trabajo:**

**Titulo:** Genetic variability of the fusion protein and circulation patterns of the respiratory syncytial virus in Spain (2013-2018)



## 4.1 Primer trabajo: Epidemiología y caracterización molecular del virus respiratorio sincitial en un hospital terciario de Cataluña (España) durante la temporada 2013-2014.

**Título original:** *“Molecular epidemiology and molecular characterization of respiratory syncytial viruses at a tertiary care university hospital in Catalonia (Spain) during 2013-2014 season.”*

**Autores:** Laura Gimferrer<sup>1</sup>, Magda Campins<sup>2</sup>, Maria Gema Codina<sup>1</sup>, Maria del Carmen Martín<sup>1</sup>, Francisco Fuentes<sup>1</sup>, Juliana Esperalba<sup>1</sup>, Andreu Bruguera<sup>2</sup>, Luz María Vilca<sup>2</sup>, Lluís Armadans<sup>2</sup>, Tomàs Pumarola<sup>1</sup>, Andrés Antón<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Virus Respiratorios, Departamento de Microbiología, Hospital Universitario Vall d’Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Preventiva y Epidemiología, Hospital Universitario Vall d’Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

**Publicado en:** Journal of Clinical Virology

**Recibido:** 9 de diciembre de 2014

**Aceptado:** 25 de febrero de 2015

## RESUMEN:

### Antecedentes y Objetivos:

El VRSH es uno de los mayores agentes víricos causantes de ITRI, especialmente en la población pediátrica. Existen dos grupos antigénicos y genéticos, el VRSH-A y el VRSH-B, que a su vez se subdividen en distintos genotipos que se distinguen en base a la RHV-2 de la proteína G. El VRSH suele causar epidemias en los meses de invierno con un patrón muy definido. Aunque no exista una vacuna disponible, el palivizumab se usa habitualmente como tratamiento preventivo en la población con un alto riesgo de padecer una infección severa. Algunos estudios ya han definido cambios en la proteína F que se asocian a resistencias frente a este fármaco.

El objetivo de este trabajo es describir la diversidad genética de las cepas de VRSH encontradas en muestras respiratorias de pacientes atendidos en el HUVH durante la temporada 2013-2014 mediante el análisis de la proteína G. Además, mediante el análisis del epítipo A de la proteína F se buscarán posibles mutaciones en cepas circulantes que otorguen resistencia al palivizumab.

### Métodos:

Se recogieron muestras respiratorias de pacientes atendidos en el HUVH para la detección de virus respiratorios. Se realizó la determinación del grupo genético de aquellas muestras positivas para VRSH mediante un RT-RCP dirigida contra una región del gen N. Para el estudio filogenético se amplificó y posteriormente secuenció el gen completo de la proteína G de un número representativo de pacientes por semana. Los árboles filogenéticos, así como el análisis de la composición aminoacídica se obtuvieron mediante el software MEGA v5.2. La presencia de sitios potenciales de O- y N-glicosilación se evaluó mediante los programas N-GlycoSite tool y Biosino, respectivamente. Para el análisis de la secuencia del epítipo A se amplificó y secuenció una región parcial de la proteína F. El análisis de las secuencias obtenidas se llevó a cabo también mediante el programa MEGA v5.2.

### Resultados:

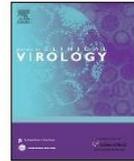
Un 9% de las muestras recogidas fueron positivas para el VRSH. De los pacientes afectados, un 70% eran menores de 2 años, un 18% tenía entre 2 y 4 años, un 9% tenía entre 4 y 64 años y un 3% tenían más de 64 años. Los casos de VRSH se detectaron desde la semana 42/2013 hasta 19/2014 con una máxima detección en la semana 52/2013. Se confirmó la presencia del VRSH-A (23%) y del VRSH-B (70%). El análisis filogenético del VRSH-A mostró que un 98% de las cepas pertenecían al genotipo ON1 y un 2% al genotipo NA1. El análisis filogenético del VRSH-B mostró que un 96% de las cepas pertenecían al genotipo BA9, un 3% al genotipo BA10 y un 1% a un genotipo BA no definido. Dentro de ambos genotipos predominantes (ON1 y BA9), se pueden

distinguir tres subgrupos filogenéticos diferentes. Las sustituciones aminoacídicas encontradas en ambos grupos implican en algunas posiciones la ganancia o pérdida de sitios potenciales de N- u O-glicosilación. En el epítipo A de la proteína F se encontró la mutación K272M en una cepa ON1, caracterizada previamente por conferir resistencia a palivizumab; y la mutación S276N en dos cepas BA9, no asociada previamente con resistencia a palivizumab.

### **Conclusiones:**

El VRSH ha demostrado afectar mayoritariamente a la población pediátrica. Ha mostrado un patrón de circulación similar al observado en el resto de países europeos. Aunque ambos grupos se han detectado, el VRSH-B ha sido el grupo predominante. Los genotipos más detectados han sido el ON1 (VRSH-A), y el BA9 (VRSH-B). Además, se ha observado la ganancia o pérdida de sitios potenciales de N- u O-glicosilación, que podría ser un mecanismo de evasión de la respuesta inmune. Finalmente, aunque en un número muy reducido de muestras, el análisis del epítipo A mostró la presencia de mutaciones que se han asociado con resistencia al palivizumab en pacientes no tratados.

El presente estudio describe la diversidad genética de las cepas circulantes recientes en Barcelona durante la temporada 2013-2014 contribuyendo así con datos recientes de vigilancia en Europa. Además, los resultados resaltan la importancia de una vigilancia continua del VRSH para detectar y monitorear no solo los genotipos en circulación sino también aquellas variantes con nuevas características que pueden afectar la antigenicidad y susceptibilidad al único tratamiento profiláctico, palivizumab.



## Molecular epidemiology and molecular characterization of respiratory syncytial viruses at a tertiary care university hospital in Catalonia (Spain) during the 2013–2014 season



Laura Gimferrer<sup>a</sup>, Magda Campins<sup>b</sup>, María Gema Codina<sup>a</sup>, María del Carmen Martín<sup>a</sup>, Francisco Fuentes<sup>a</sup>, Juliana Esperalba<sup>a</sup>, Andreu Bruguera<sup>b</sup>, Luz María Vilca<sup>b</sup>, Lluís Armadans<sup>b</sup>, Tomàs Pumarola<sup>a</sup>, Andrés Antón<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Virology Unit, Microbiology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Preventive Medicine and Epidemiology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 December 2014

Received in revised form 22 February 2015

Accepted 25 February 2015

#### Keywords:

Respiratory syncytial virus  
Surveillance  
HRSV  
Palivizumab  
Genotypes  
Molecular  
Epidemiology

### ABSTRACT

**Background:** Human respiratory syncytial virus (HRSV) is the main cause of lower respiratory tract infections among infants and young children.

**Objectives:** The molecular epidemiology and characterization of HRSV strains detected at a Spanish tertiary hospital during the 2013–2014 season is reported.

**Study design:** Phylogenetic analysis and molecular characterization of HRSV laboratory-confirmed respiratory samples were performed, based on coding sequences of G and F proteins.

**Results:** HRSV infection was laboratory-confirmed in respiratory samples from 320 patients of which 223 (70%) were less than 2 years of age and none undergoing Palivizumab treatment. HRSV was detected at varying levels throughout the season with a maximum rate in the week 52/2013, right before the beginning of the influenza epidemic. Whilst both HRSV groups were found co-circulating, HRSV-B group clearly predominated. The phylogenetic analyses from 139 HVR-2 sequences revealed that most characterized strains belonged to ON1 and BA9 genotypes. Three different phylogenetic subgroups could be distinguished within these genotypes. In addition, three strains (out of the 52 randomly selected) were carrying amino acid substitutions in the epitope A of the F protein, one of them previously related to Palivizumab resistance.

**Conclusions:** The results of the present study highlight the importance of a continuous HRSV surveillance to monitor not only the introduction of new genotypes on circulation but also the emergence of viral variants with new genetic characteristics that can affect the antigenicity features and the susceptibility to the only current prophylaxis treatment and also for the future development of HRSV vaccines.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Background

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is the most common respiratory pathogen and the main cause of lower respiratory tract infections (LRTI) among infants and young children. Primary infection usually affects infants under two years of age, and reinfections are common throughout life. HRSV is also recognised as a

significant respiratory pathogen among immunosuppressed and elderly patients.

HRSV is classified in the genus *Pneumovirus*, family of Paramyxoviridae. Its genome is a non-segmented negative-strand RNA of approximately 15,000 nucleotides that contains 10 genes, which encode for 11 proteins. Two different groups, HRSV-A and HRSV-B, are described based on antigenic and genetic differences. Subsequently, twelve genotypes have been described for HRSV-A (GA1–GA7, SAA1, NA1–NA2, CB–A and ON1), and twenty for HRSV-B (GB1–GB4, SAB1–SAB3 and BA1–BA12, CB–B), using the hypervariable region 2 (HVR-2) in the C-terminal domain of the G protein. HRSV exhibits a clear pattern of seasonality; epidemics usually occur in the late fall and winter in temperate regions, or during the rainy season in tropical countries.

\* Corresponding author at: Virology Unit, Microbiology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Tel.: +34 665 94 17 22; fax: +34 932746801.

E-mail address: [aanton@vhebron.net](mailto:aanton@vhebron.net) (A. Antón).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.02.018>

1386-6532/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

To date, no safe and effective human vaccine has been licensed for prophylaxis. However, Palivizumab (HRSV-specific humanized monoclonal antibody) is currently used as a prophylaxis treatment for paediatric patients at high-risk for severe HRSV infection. Palivizumab binds the antigenic site A of the viral fusion protein (F), but some amino acid substitutions have already been associated with resistance despite being a highly conserved region [1,2]. As other RNA viruses, HRSV has a high capability to acquire point mutations in its genome, mainly in the coding regions of the envelope glycoproteins (G and F proteins) that are under the selection pressure from immunity [2,3]. Therefore, the emergence and selection of viral variants carrying new antigenic and genetic mutations can affect the diversity described among population and the viral features that are determinant to evade the recognition of Palivizumab and its prophylactic effectiveness.

2. Objective

To describe the genetic diversity of HRSV strains in respiratory samples collected from patients attended during the 2013–2014 season in the Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH) in Barcelona (Spain), a tertiary 1200-bed university hospital, using the complete or partial sequencing of the coding sequences of the viral proteins G and F, respectively.

3. Study design

3.1. Patients and samples

From October 2013 (week 40/2013) to May 2014 (week 20/2014), upper (nasopharyngeal aspirates or swabs) and lower (bronchoalveolar lavages, bronchoaspirates and tracheal aspirates) respiratory tract samples were collected for laboratory-confirmation of respiratory virus infection from patients attended at the HUVH. Respiratory specimens were processed within the first 24 h, being kept at 2–4 °C in several aliquots until use.

3.2. Detection and typing of HRSV from respiratory specimens

The detection of HRSV was performed either by immunochromatography (Binax Now RSV Card, Allere Scarborough Inc., USA), immunofluorescence (D<sup>3</sup> Ultra 8<sup>TM</sup> DFA Respiratory Virus Screening & Identification Kit Diagnostic HYBRIDS, USA) or real-time multiplex RT-PCR (Anyplex II RV16 Detection Kit See-ge, Korea) assays. Total nucleic acids were extracted using NucliSense easyMAG (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) according to the manufacturer's instructions and kept frozen until use. The determination of HRSV group (HRSV-A and-B) from all HRSV laboratory-confirmed samples was achieved using a specific real-time PCR with primers and probes that target a highly conserved genomic region of the nucleoprotein gene [4].

3.3. Phylogenetic analysis and molecular characterization of HRSV strains

For the phylogenetic analysis and the molecular characterization, the entire G gene of HRSV-A and HRSV-B was sequenced from a representative sampling that included at least 4 representative laboratory-confirmed specimens by week and by age groups (0–2, 2–4, 5–14, 15–65, >65 years old) when available. The amplification of the whole coding G protein sequence was carried out by a one-step RT-PCR assay using One-step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany), primers and PCR protocols, as shown in Table 1. PCR products were subsequently purified using Exo-SAP-IT (USB, Affymetrix Inc. Cleveland, Ohio, USA) and sequenced by the ABI Prism Big Dye Terminator cycle sequencing kit v3.1 on the ABI PRISM 3130XL sequencer (Applied Biosystems,

Table 1 Primers and specific conditions used for PCR amplification of complete G and partial F protein-coding sequences. The M13 primer binding sites used for sequencing are marked in bold.

Gene	HRSV group	Fragment	Primers	PCR conditions	Position (nt)
G	A	1	G-A-FWD1: <b>TGTA</b> AAACGCGCCAGTGGCCYTAATTACACTAATACAVATG G-A-REV2: <b>CAG</b> AAACAGCTATGACCGYTTGTRGTGGTTTCTTYCC	50 °C × 30'–95 °C × 15'–45C; (95 °C × 15'–53 °C × 20'–72 °C × 1'30")–72 °C × 10'	4346–43715291–5270
		2	G-A-FWD2: <b>TGTA</b> AAACGCGCCAGCTGACCTGACGATATGCA G-A-REV1: <b>CAG</b> AAACAGCTATGACCGTATACACTRGTATACCAACC	50 °C × 30'–95 °C × 15'–45C; (95 °C × 15'–53 °C × 20'–72 °C × 1'30")–72 °C × 10'	5198–52165834–5812
	B	1	G-B-FWD1: <b>TGTA</b> AAACGCGCCAGTGGCCYTAATTACACTAATACAVATG G-B-REV2: <b>CAG</b> AAACAGCTATGACCGTATACACTRGTATACCAACC	50 °C × 30'–95 °C × 15'–45C; (95 °C × 15'–53 °C × 20'–72 °C × 1'30")–72 °C × 10'	4343–43695275–5253
		2	G-B-FWD2: <b>TGTA</b> AAACGCGCCAGCTGACCTGACCTGTTCCCTG G-B-REV1: <b>CAG</b> AAACAGCTATGACCGTATACACTRGTATACCAACC	50 °C × 30'–95 °C × 15'–45C; (95 °C × 15'–53 °C × 20'–72 °C × 1'30")–72 °C × 10'	5186–52055837–5815
F	ABB		F-A-FWD: <b>GGT</b> GGTATACYAGTGYATAC F-B-REV: <b>GAG</b> CTTAVRTCTGTTTTC	50 °C × 30'–95 °C × 15'–45C; (95 °C × 15'–53 °C × 20'–72 °C × 1'30")–72 °C × 10'	5811–5833 6875–6853

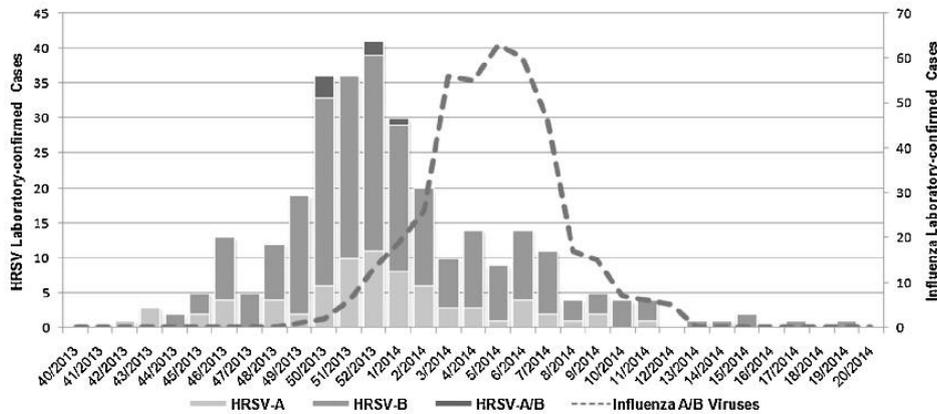


Fig. 1. Weekly distribution of HRSV and influenza cases detected from week 40/2013 to week 20/2014 (2013–2014 season).

Foster City, California, USA) using M13 primers (Table 1). Nucleotide sequences were assembled and edited using SeqScape v2.5 software (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). A collapse of the sequences to haplotypes was carried out with ALignment Transformation EnviRonment (ALTER) [5]. Phylogenetic analysis of HVR-2 sequences was performed with some sequences from previous molecular epidemiological studies, downloaded from NCBI GenBank database, and used as reference (Supplementary Table 1). The molecular evolutionary models of nucleotide substitution were fitted to the multiple sequence alignments using evolutionary analyses conducted in MEGA v5.2 [6]. The phylogenetic trees were constructed using a neighbor-joining distance method as implemented in MEGA v5.2 with the evolutionary model with lowest Bayesian Information Criterion score [6]. The topological accuracy of the trees was evaluated by the bootstrap method (1000 replicates). The amino acid composition of whole G protein was studied using MEGA v5.2 relative to the homologous sequences with accession numbers M11486 [3] (A2 strain for HRSV-A, GA1 genotype) and AF065250 [7] (CH10b strain for HRSV-B, GB1 genotype). The acquisition or loss of potential N- and O-glycosylation sites in the complete amino acid sequence of G protein was tracked using N-GlycoSite tool [8] and Biosino software [9], respectively.

Molecular characterization of antigenic site A of the F protein (from 258 to 276 amino acid position) was also performed from a random selection among laboratory-confirmed samples belonging to the different found genotypes. A specific one-step RT-PCR assay was developed using One-step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) to amplify the antigenic site A with primers and PCR protocols as shown in Table 1. The purification and sequencing methods of PCR products were performed as described above. The same primers used for amplification were also used for sequencing. Amino acid substitutions within the epitope A of the F protein were reported using MEGA v5.2.

#### 4. Results

A total of 3571 specimens from 2271 patients were collected, of which 334 (9%) from 320 patients were positive for HRSV. From the 320 patients, 223 (70%) were less than 2 years of age, while the other 59 (18%) patients were between two and four years of age. Among the remaining 38 (12%) patients, 8 (3%) were older than 64. HRSV cases were detected from week 42/2013 to 19/2014 with a maximum rate in the week 52/2013 as shown in Fig. 1. The seasonality pattern was in accordance to the previous ones observed

in Catalonia [10], in which the annual HRSV epidemics usually preceded the influenza circulation. The presence of both HRSV-A (74; 23%) and HRSV-B (224, 70%) groups was confirmed, as well as some HRSV-A/B co-infections (6; 2%). The HRSV group could not be determined from 16 laboratory-confirmed samples, likely due to the low quality of the extracted nucleic acids, or to the low viral load. No patients undergoing Palivizumab treatment were found among the laboratory-confirmed HRSV cases.

Phylogenetic analysis of 54 selected HRSV-A sequences showed (Fig. 2A) that the majority of strains belonged to the ON1 genotype (53, 98%), but one (2%) belonged to the NA1 genotype. Phylogenetic analysis from 85 selected HRSV-B strains (Fig. 2B) showed that sequences fell within genotypes BA9 (82, 96%), BA10 (2, 3%) and an undefined BA (1, 1%). Within both predominant ON1 (HRSV-A) and BA9 (HRSV-B) genotypes, three different phylogenetic subgroups can be distinguished. These subgroups can often be defined by some amino acid substitutions relative to the first-described ON1 [11] and BA [12] strains. These amino acid substitutions for both HRSV-A and -B strains in the HVR-2 also imply in some positions the gain or loss of potential N- or O-glycosylation sites, as shown in Fig. 2 and Supplementary Table 2.

Molecular characterization of the epitope A of the F protein from 52 randomly selected specimens revealed two amino acid substitutions. The K272M mutation, previously characterized to confer resistance to Palivizumab [1], was found in an ON1-B strain isolated from a non-treated Palivizumab patient. The mutation S276N, not previously associated with resistance to Palivizumab [13], was found in two BA9-B strains, as shown in Fig. 2.

The nucleotide sequences of the present study were submitted to GenBank database with accession numbers KM402618 – KM402756.

#### 5. Discussion

It is well known that HRSV has a significant clinical impact on the paediatric population. Accordingly, these results showed that close to 90% of HRSV positive samples were detected in respiratory samples from children below five years of age.

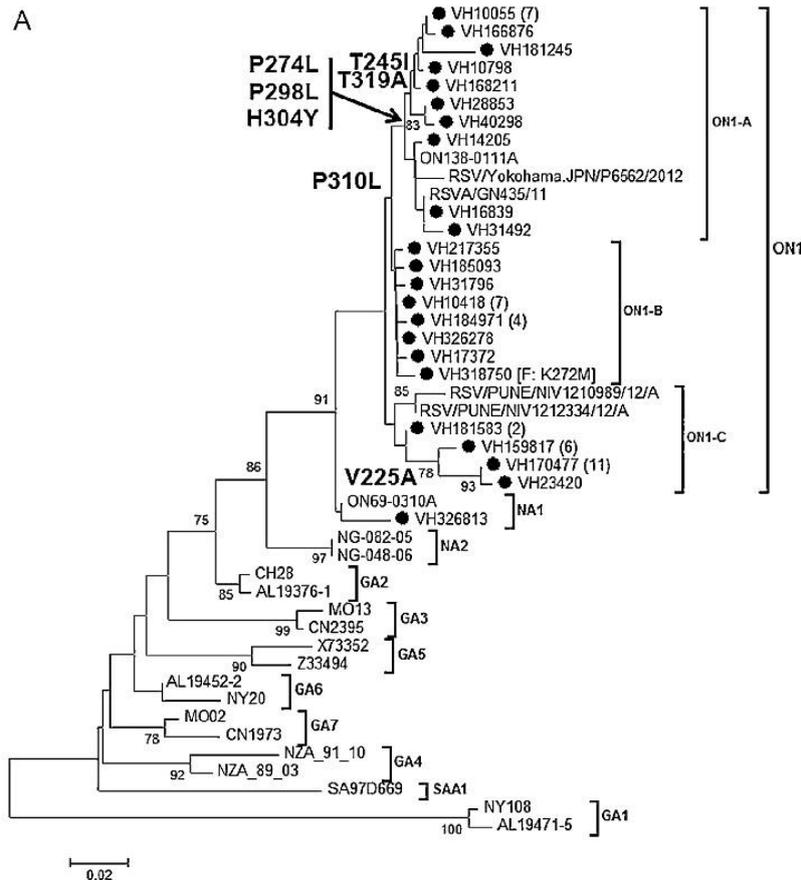
HRSV was detected from October to March at varying levels, being the maximum detection rate in the week 52/2013, similar to the seasonality reported in other European countries [14,15] and according to ECDC-WHO information. Although there was co-circulation of both HRSV groups, in the present study HRSV-B was predominant over HRSV-A. This predominance of a particular HRSV group during a season has been previously described in largest

surveillance studies [16]. In addition, the percentage of HRSV-A/B co-infections (2%) was similar to a recent study (7%) reported in Brazil [17].

In the present study, all characterized HRSV-A strains were classified into ON1 genotype, but one into NA1. NA1 genotype was first identified in Niigata (Japan) in 2004, and in 2010 NA1 became predominant over other older genotypes [18]. The ON1 genotype was reported for the first time in Ontario (Canada) in 2012 [11] and is spreading worldwide and becoming predominant since then [19–22]. Similarly, after its emergence in 1999 in Buenos Aires (Argentina) [23], BA genotype spread worldwide and became predominant in most countries showing over time a great diversification in at least 12 different genetic genotypes (from BA1 to BA12). In the present study, all characterized HRSV-B strains belonged to BA genotypes, most of them within BA9 genotype. BA9 was first identified in Niigata during the 2006–2007 season and became predominant worldwide during the 2009–2010 season [24,25]. In addition, two strains belonged to the BA10 genotype, and one strain could not be classified into any genotype, although its HVR-2 sequence clustered with a sequence from a Chinese study that could not be assigned for the authors to any previously known cluster [26].

The high nucleotide substitution rate of HRSV, mainly for the G protein, contributes to the genetic variability observed among the several genotypes. Phylogenetic analyses of HVR-2 sequences distinguished some phylogenetic subgroups (A–C) within the most representative genetic clusters of the present study (ON1 for HRSV-A, and BA9 for HRSV-B). In addition, these genetic subgroups also showed some amino acid differences between them within the two hypervariable regions of the G protein where strain-specific antigenic epitopes were described. In parallel, as shown in Supplementary Table 2, amino acid substitutions sometimes resulted to the gain or loss of potential *N*- or *O*-glycosylation sites, which is also a mechanism for evading the immune response through changes in the antigenicity features [2,27]. This variability increases the risk of reinfections and allows these viral variants to evolve into new genotypes in the midterm [21,28].

The molecular characterization of the epitope A of the F protein showed the presence of viral variants carrying genetic markers, which were or could be associated with Palivizumab resistance in respiratory specimens from non-treated patients. The prolonged use of Palivizumab in patients at high-risk of severe HRSV infection may confer a selective pressure that would contribute to the emergence of resistant variants in the general population [2].



**Fig. 2.** Phylogenetic trees based on HVR-2 sequences from HRSV-A (figure A) and HRSV-B (figure B) strains. Amino acid differences ( $\pm$  O-gly: acquisition or loss of potential O-linked glycosylation site) in the deduced HVR-2 sequences between phylogenetic subgroups (A–C) are shown. The sequences of the present study are marked with black points. Sequences were previously collapsed to haplotypes, and the numbers of represented sequences, when more than one, are shown in brackets. In square brackets, the found mutations in the antigenic site A of the F protein and the number of strains carrying them, relative to the total of sequences represented by the haplotype, are shown.

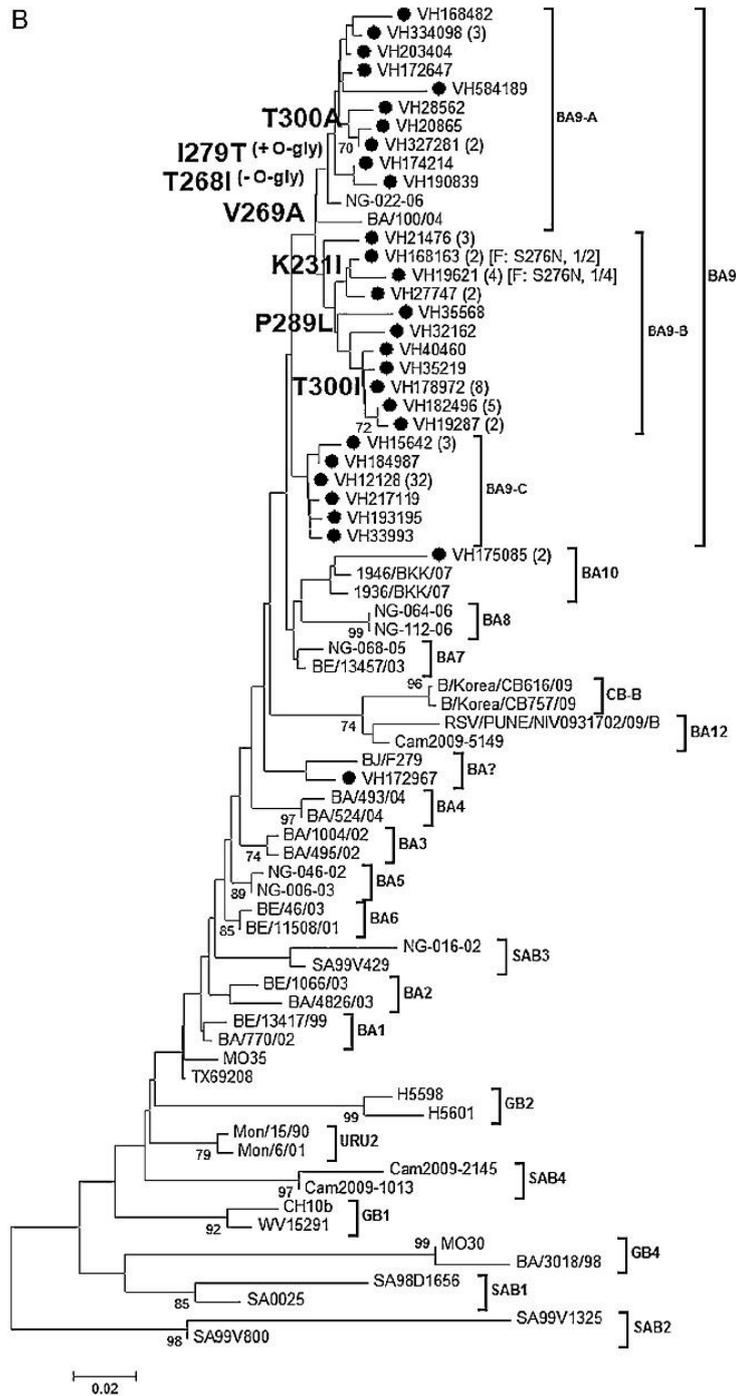


Fig. 2. (Continued).

The present study is subject to several limitations. Firstly, the comparison of genetic diversity and epidemiological patterns with previous seasons could not be carried out due to the fact that the reported data is limited to a single winter season and to our geographical location. Furthermore, this study only included patients who were attended in the hospital with HRSV infection, and therefore, conclusions for the general population who acquired HRSV infections cannot be drawn. Finally, the HRSV incidence reported among adults might be an underestimation considering that adults usually suffer mild symptomatology, and hence, are not used to attend the hospital.

In summary, the present study describes the genetic diversity of recent circulating strains in Barcelona (Spain), and contributes with recent surveillance data in Europe [19,20,22,29] regarding this respiratory virus of great clinical impact, in particular in infants and young children. In addition, the results highlight the importance of a continuous surveillance of HRSV to detect and monitor not only the new genotypes on circulation but also those variants with new amino acid characteristics that can affect the antigenicity and susceptibility to the only prophylaxis treatment, Palivizumab, and the development of the future vaccines.

#### Funding

This work was partially supported by Plan Nacional de I+D+i 2008–2011 and by Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio Español de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015); by Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio Español de Economía y Competitividad (grant FIS PI 14/01838); and European Regional Development Fund (ERDF).

#### Competing interests

The authors declare no conflict of interest.

#### Ethical approval

Institutional Review Board approval (PR.AG.78/2014) was obtained from the Hospital Universitari Vall d'Hebron Clinical Research Ethics Committee.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.02.018>.

#### References

- [1] J.T. Bates, et al., Escape from neutralization by the respiratory syncytial virus-specific neutralizing monoclonal antibody palivizumab is driven by changes in on-rate of binding to the fusion protein, *Virology* 454–455 (2014) 139–144.
- [2] Y.H. Grad, et al., Within-host whole-genome deep sequencing and diversity analysis of human respiratory syncytial virus infection reveals dynamics of genomic diversity in the absence and presence of immune pressure, *J. Virol.* 88 (13) (2014) 7286–7293.
- [3] L.I. Tapia, et al., Gene sequence variability of the three surface proteins of human respiratory syncytial virus (HRSV) in Texas, *PLoS One* 9 (3) (2014) e90786.
- [4] R.N. Gunson, T.C. Collins, W.F. Carman, Real-time RT-PCR detection of 12 respiratory viral infections in four triplex reactions, *J. Clin. Virol.* 33 (4) (2005) 341–344.
- [5] D. Glez-Pena, et al., ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments, *Nucleic Acids Res.* 38 (Suppl) (2010) W14–W18.
- [6] K. Tamura, et al., MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol. Biol. Evol.* 28 (10) (2011) 2731–2739.
- [7] T.C. Peret, et al., Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community, *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 9) (1998) 2221–2229.
- [8] M. Zhang, et al., Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin, *Glycobiology* 14 (12) (2004) 1229–1246.
- [9] S. Li, et al., Predicting O-glycosylation sites in mammalian proteins by using SVMs, *Comput. Biol. Chem.* 30 (3) (2006) 203–208.
- [10] Pla d'informació de les infeccions respiratòries agudes a Catalunya (PIDIRAC). Available from: [http://grip.gencat.cat/ca/la\\_grip\\_professionals/pidirac](http://grip.gencat.cat/ca/la_grip_professionals/pidirac)
- [11] A. Eshaghi, et al., Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication, *PLoS One* 7 (3) (2012) e32807.
- [12] A. Trento, et al., Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides, *J. Gen. Virol.* 84 (Pt 11) (2003) 3115–3120.
- [13] Q. Zhu, et al., Natural polymorphisms and resistance-associated mutations in the fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV): effects on RSV susceptibility to palivizumab, *J. Infect. Dis.* 205 (4) (2012) 635–638.
- [14] J.S. Casalegno, M. Ottmann, M. Bouscambert-Duchamp, M. Valette, F. Morfin, B. Lina, Impact of the 2009 influenza A(H1N1) pandemic wave on the pattern of hibernal respiratory virus epidemics, France, 2009, *Euro Surveill.* 15 (6) (2010), pii=19485. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19485>
- [15] B. Reiche, J. Schweiger, Genetic variability of group A human respiratory syncytial virus strains circulating in Germany from 1998 to 2007, *J. Clin. Microbiol.* 47 (6) (2009) 1800–1810.
- [16] H. Tsutsumi, et al., Occurrence of respiratory syncytial virus subgroup A and B strains in Japan: 1980–1987, *J. Clin. Microbiol.* 26 (6) (1988) 1171–1174.
- [17] F. de-Paris, et al., Evaluation of respiratory syncytial virus group A and B genotypes among nosocomial and community-acquired pediatric infections in southern Brazil, *Virol. J.* 11 (1) (2014) 36.
- [18] M.A. Pretorius, et al., Replacement and positive evolution of subtype A and B respiratory syncytial virus G-protein genotypes from 1997 to 2012 in South Africa, *J. Infect. Dis.* 208 (Suppl 3) (2013) 227–237.
- [19] J. Tabatabai, et al., Novel respiratory syncytial virus (RSV) genotype ON1 predominates in Germany during winter season 2012–13, *PLoS One* 9 (10) (2014) e109191.
- [20] A. Pierangeli, D. Trotta, C. Scagnolari, M.L. Ferreri, A. Nicolai, F. Midulla, K. Marinelli, G. Antonelli, P. Bagnarelli, Rapid spread of the novel respiratory syncytial virus A ON1 genotype, central Italy, 2011 to 2013, *Euro Surveill.* 26 (2014), pii=20843. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20843>
- [21] C.N. Agoti, et al., Rapid spread and diversification of respiratory syncytial virus genotype ON1: Kenya, *Emerg. Infect. Dis.* 20 (6) (2014) 950–959.
- [22] C. Panayiotou, et al., Epidemiology of respiratory syncytial virus in children in Cyprus during three consecutive winter seasons (2010–2013): age distribution, seasonality and association between prevalent genotypes and disease severity, *Epidemiol. Infect.* 142 (11) (2014) 2406–2411.
- [23] A. Trento, et al., Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication, *J. Virol.* 80 (2) (2006) 975–984.
- [24] I.C. Dapat, et al., New genotypes within respiratory syncytial virus group B genotype BA in Niigata: Japan, *J. Clin. Microbiol.* 48 (9) (2010) 3423–3427.
- [25] A. Ohno, et al., Genetic characterization of human respiratory syncytial virus detected in hospitalized children in the Philippines from 2008 to 2012, *J. Clin. Virol.* 57 (1) (2013) 59–65.
- [26] G. Cui, et al., Genetic variation in attachment glycoprotein genes of human respiratory syncytial virus subgroups A and B in children in recent five consecutive years, *PLoS One* 8 (9) (2013) e75020.
- [27] R. García-Beato, et al., Host cell effect upon glycosylation and antigenicity of human respiratory syncytial virus G glycoprotein, *Virology* 221 (2) (1996) 301–309.
- [28] U.B. Aamir, et al., Molecular characterization of circulating respiratory syncytial virus (RSV) genotypes in Gilgit Baltistan Province of Pakistan during 2011–2012 winter season, *PLoS One* 8 (9) (2013) e74018.
- [29] A. Trento, et al., Ten years of global evolution of the human respiratory syncytial virus BA genotype with a 60-nucleotide duplication in the G protein gene, *J. Virol.* 84 (15) (2010) 7500–7512.



## 4.2 Segundo trabajo: Circulación de un nuevo genotipo del virus respiratorio sincitial humano del grupo B durante la temporada 2014-2015 en Cataluña (España).

**Título original:** *“Circulation of a novel human respiratory syncytial virus group B genotype during the 2014-2015 season in Catalonia (Spain)”*

**Autores:** Laura Gimferrer<sup>1</sup>, Cristina Andrés<sup>1</sup>, Magda Campins<sup>2</sup>, Maria Gema Codina<sup>1</sup>, Jose Angel Rodrigo<sup>2</sup>, Susana Melendo<sup>3</sup>, Maria del Carmen Martín<sup>1</sup>, Francisco Fuentes<sup>1</sup>, Maria Rosa Saiz<sup>1</sup>, Juliana Esperalba<sup>1</sup>, Andreu Bruguera<sup>2</sup>, Luz Maria Vilca<sup>2</sup>, Lluís Armadans<sup>2</sup>, Tomàs Pumarola<sup>1</sup>, Andrés Antón<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Virus Respiratorios, Departamento de Microbiología, Hospital Universitario Vall d’Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Preventiva y Epidemiología, Hospital Universitario Vall d’Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

<sup>3</sup> Unidad de enfermedades infecciones pediátricas e inmunodeficiencias, Hospital Universitario Vall d’Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

**Publicado en:** Clinical Microbiology and Infection

**Enviado:** 24 de julio de 2015

**Aceptado:** 15 de septiembre de 2015

## RESUMEN:

### Antecedentes y Objetivos:

El VRSH es la principal causa de ITRI en la población pediátrica. La infección primaria generalmente ocurre en los primeros años de la infancia, aunque las reinfecciones son comunes durante toda la vida. El VRSH tiene un claro patrón estacional, circulando entre finales de otoño e invierno. En base a diferencias antigénicas y genéticas el VRSH se clasifica en dos grupos, VRSH-A y VRSH-B, y al menos en 12 genotipos para VRSH-A, y 22 para VRSH-B. En el presente estudio, se describe la circulación de un nuevo genotipo del VRSH-B detectado en Cataluña durante la temporada 2014-2015.

### Métodos:

Se recogieron muestras respiratorias de pacientes con sospecha de infección del tracto respiratorio atendidos en el HUVH desde octubre de 2014 hasta abril de 2015 para realizar un diagnóstico virológico. Todas las muestras positivas para el VRSH se tipificaron como VRSH-A o -B, y de un número representativo de muestras del VRSH-B se realizó un análisis filogenético como se describió en el primer trabajo.

### Resultados:

Un 11% de las muestras recogidas fueron positivas por el VRSH. Ambos grupos fueron detectados: VRSH-A (35%) y VRSH-B (63%). El análisis filogenético mostro que un 46% de las cepas son del genotipo BA9 y un 10% del BA10. El 44% restante de las secuencias estaban agrupadas juntas con un valor de bootstrap de 100%, con una p-distancia entre miembros de 0.006. De acuerdo con el criterio definido por Venter *et al.*, se definió a este cluster como un nuevo genotipo nombrado BA13.

### Conclusiones:

El VRSH-B ha sido el grupo predominante durante la temporada 2014-2015. Desde su descripción en 1999 en Buenos Aires el genotipo BA se propagó por todo el mundo y se convirtió en el predominante en la mayoría de los países. Con el tiempo se diversificó hasta en al menos, 13 genotipos diferentes (de BA1 a BA12 y CB-B). En este estudio, se describe la circulación de nuevo genotipo BA13 que probablemente ha evolucionado del genotipo BA9. Estos resultados refuerzan la idea de que la proteína G viral evoluciona continuamente, adquiriendo sustituciones aminoacídicas que podrían dar lugar a la aparición de nuevos genotipos.

## Circulation of a novel human respiratory syncytial virus Group B genotype during the 2014–2015 season in Catalonia (Spain)

L. Gimferrer<sup>1</sup>, C. Andrés<sup>1</sup>, M. Campins<sup>2</sup>, M. G. Codina<sup>1</sup>, J. A. Rodrigo<sup>2</sup>, S. Melendo<sup>3</sup>, M. C. Martín<sup>1</sup>, F. Fuentes<sup>1</sup>, M. R. Saiz<sup>1</sup>, J. Esperalba<sup>1</sup>, A. Bruguera<sup>2</sup>, L. M. Vilca<sup>2</sup>, L. Armadans<sup>2</sup>, T. Pumarola<sup>1</sup> and A. Antón<sup>1</sup>

1) Virology Unit, Microbiology Department, 2) Preventive Medicine and Epidemiology Department and 3) Pediatric Infectious Diseases and Immunodeficiencies Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

### Abstract

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is one of the most common viral aetiological agents in the youngest population. In the present study a novel HRSV-B BA genotype is first described based on the phylogenetic analysis of the coding hypervariable region 2 sequences of G protein from strains detected during the 2014–2015 season. Among all strains detected in the last season, 44% belonged to this new genotype. Therefore, it highlights the importance of a continuous HRSV surveillance to monitor the emergence and spread of new genotypes or variants with genetic changes that may affect antigenic and tropism features.

Clinical Microbiology and Infection © 2015 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Genotypes, molecular epidemiology, respiratory infection, respiratory syncytial virus, surveillance

**Original Submission:** 24 July 2015; **Accepted:**

11 September 2015

Editor: L. Kaiser

**Article published online:** 25 September 2015

**Corresponding author:** A. Antón, Virology Unit – Microbiology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119-129, Barcelona, Spain  
E-mail: [aanton@vhebron.net](mailto:aanton@vhebron.net)

### Introduction

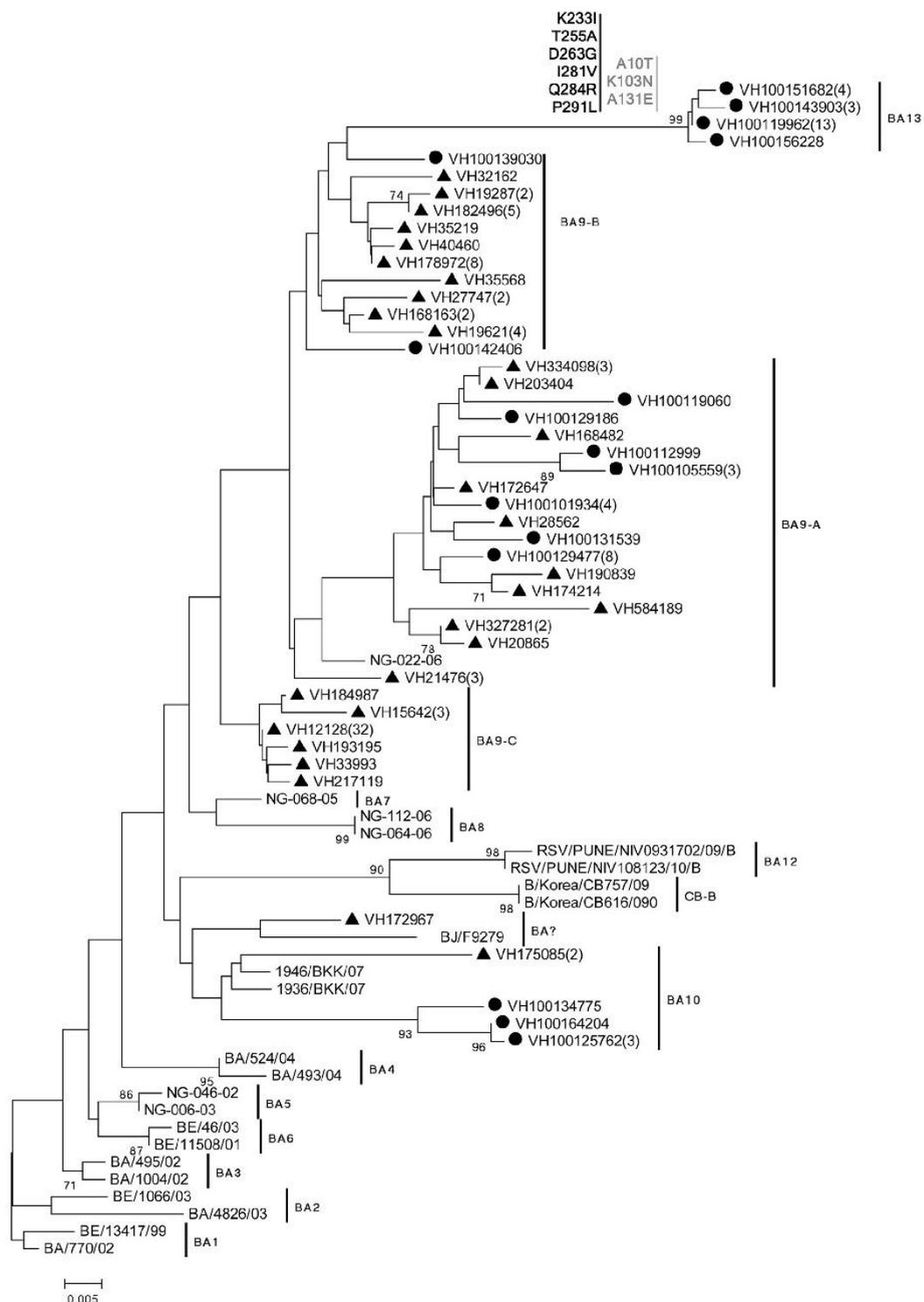
Human respiratory syncytial virus (HRSV) is the most common respiratory pathogen and the main cause of lower respiratory tract infections among infants and young children. Primary infection usually occurs in the first years of childhood, although re-infections are common throughout life [1]. It is also recognized as a significant respiratory pathogen among immunosuppressed and elderly patients. HRSV exhibits a clear pattern of seasonality, and epidemics are usually reported in the late autumn and winter in temperate regions, and during the rainy season in tropical regions [2]. HRSV is classified in the genus *Pneumovirus* belonging to the Paramyxoviridae family. Its genome is a non-segmented negative-strand RNA of approximately 15 000 nucleotides that contains ten genes encoding 11 proteins [3]. The envelope of the virus contains two major glycoproteins, G and F, which play an essential role in the virus attachment and entry to the host cell. Antigenic and genetic differences lead to classification of HRSV into two different groups, HRSV-A and HRSV-B, which co-circulate every season with one being predominant. Based on the hypervariable region 2 (HVR-2) located in the C-terminal domain of the G protein, at least 12 genotypes (GA1–GA7 [4,5], SAA1 [6], NA1 and NA2 [7], CB-A [8] and ONI [9]) for HRSV-A and 22 genotypes (GB1–GB4 [5,10], URU1 and URU2 [11], SABI–SAB3 [10], BAI–BA12 [12] and CB-B [13]) for HRSV-B have been described. In the present study, we report the circulation of a novel HRSV-B genotype circulating in Catalonia (Spain) during the 2014–2015 season.

### Materials and Methods

Respiratory specimens from patients with suspicion of acute respiratory tract infection attending the Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona were collected from October 2014 to April 2015 for virological diagnosis. All laboratory-confirmed HRSV samples were typed as HRSV-A or HRSV-B, and phylogenetic analysis and molecular characterization of a random representative sampling of HRSV-B strains were performed as previously described [14].

### Results

A total of 5189 specimens from 3683 patients were collected, of which 448 (9%) from 409 (11%) patients were laboratory-confirmed for the different HRSV groups: HRSV-A (145; 35%)



and HRSV-B (256; 63%). In addition, two (<1%) samples were HRSV-A/B co-infections, and six (1%) could not be typed. Complete HVR-2 sequences from 48 HRSV-B specimens were sequenced and studied (Fig. 1), of which 22 (46%) belonged to BA9 genotype and five (10%) to BA10. The remaining 21 (44%) sequences clustered together with a bootstrap value of 100% showing a maximum pairwise distance (p-distance) between members of 0.006 and an average divergence within group (p-distance) of 0.004 base differences per site. Therefore, according to the criterion used to define novel genotypes by Venter *et al.* [10], because these sequences clustered together with a bootstrap value over 70% and showed a maximum intra-group p-distance <0.07, they would belong to a novel genotype not previously described, which is named in this study as BA13 to follow on from the nomenclature used so far. This novel genotype also belongs to the BA genetic group, because it carries the 60-nucleotide duplication in the HVR-2 that characterizes it. Moreover, it shows the lowest genetic distance to BA9 sequences, more particularly to BA9-B (mean p-distance 0.0475 base differences per site). The whole predicted G protein of strains belonging to the novel genotype is defined by some key amino acid substitutions relative to the first described BA sequences, which were found in the cytoplasmic domain (A10T), in HVR-1 (K103N and A131E) and in HVR-2 (K233I, T255A, D263G, I281V, Q284R and P291L). In spite of the high similarity between strains within this novel genotype, the possibility that they formed part of a nosocomial outbreak was ruled out because the corresponding respiratory samples were collected from patients attending seven different hospital wards during a 4-month period.

## Discussion

The co-circulation of both HRSV groups has been reported in Catalonia during the last two seasons with a great predominance of HRSV-B [14]. Among the HRSV-B group, BA has been the most prevalent genotype. After its emergence in 1999 in Buenos Aires (Argentina) [15], the BA genotype spread worldwide and became predominant in most countries—showing over time a great diversification into at least 13 different genotypes (from BA1 to BA12 and CB-B) [16]. The BA genotype is defined by a common 60-nucleotide duplication in the HVR-2 that is also carried by all circulating HRSV-B strains characterized in this

study throughout the 2014–2015 season in Catalonia, including those strains belonging to the novel genotype. As we recently reported in Catalonia [14], BA9 was the predominant HRSV-B genotype during the 2013–2014 season, distinguishing up to three genetic subgroups (BA9-A, BA9-B and BA9-C). During the 2014–2015 season, strains belonging to BA9-A and BA10 genotypes remained similar to or slightly evolved from strains of the previous season. However, almost half of the characterized sequences fell within the novel genotype that we describe in this study, which have probably evolved from 2013–2014 BA9-B strains because they showed the lowest genetic distance compared to each other. These results reinforce the idea that the predicted viral G protein sequence is continuously evolving, acquiring sometimes amino acid substitution that might result in the appearance of novel genotypes over time. These substitutions might also result in new antigenic features that help the virus to spread among the population season after season. This genetic diversity would be driven by the host immune response, which acts as an evolutionary selective pressure. Furthermore, these changes in the antigenic features become a challenge in the development of future vaccines to prevent infection. For the next HRSV vaccine to be most effective, its antigen recognition should be the highest possible. Therefore, the present study reports the identification of a novel BA genotype in Catalonia during the last season and highlights the importance of continuous monitoring of the genetic diversity of circulating HRSV strains worldwide.

## Funding

This work was partially supported by Plan Nacional de I + D + I 2008–2011 and by Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio Español de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015); by Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio Español de Economía y Competitividad (grant FIS PI14/01838); and by the European Regional Development Fund (ERDF).

## Transparency Declaration

The authors declare no conflict of interest.

**FIG. 1.** Phylogenetic tree of BA genotypes based on HVR-2 sequences from HRSV-B strains. The sequences of the present study are marked with black points and sequences previously studied from 2013–2014 season are marked in black triangles. Sequences were previously collapsed to haplotypes, and the numbers of represented sequences are shown in brackets. Amino acid mutations within the HVR-2 and in other G protein domains are marked in black and in grey, respectively.

Clinical Microbiology and Infection © 2015 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved. *CMI*, 22, 97.e5–97.e8

## Ethical approval

Institutional Review Board approval (PRAG78/2014) was obtained from the Hospital Universitari Vall d'Hebron Clinical Research Ethics Committee.

## References

- [1] Faghihloo E, Yavarian J, Jandaghi NZ, Shadab A, Azad TM. Genotype circulation pattern of human respiratory syncytial virus in Iran. *Infect Genet Evol* 2014;22:130–3.
- [2] de-Paris F, Beck C, de Souza Nunes L, Machado AB, Paiva RM, da Silva Menezes D, et al. Evaluation of respiratory syncytial virus group A and B genotypes among nosocomial and community-acquired pediatric infections in southern Brazil. *Virol J* 2014;11(1):36.
- [3] Tapia LI, Shaw CA, Aideyan LO, Jewell AM, Dawson BC, Haq TR, et al. Gene sequence variability of the three surface proteins of human respiratory syncytial virus (HRSV) in Texas. *PLoS One* 2014;9(3):e90786.
- [4] Peret TC, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, et al. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect Dis* 2000;181(6):1891–6.
- [5] Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 9):2221–9.
- [6] Agenbach E, Tiemessen CT, Venter M. Amino acid variation within the fusion protein of respiratory syncytial virus subtype A and B strains during annual epidemics in South Africa. *Virus Genes* 2005;30(2):267–78.
- [7] Shobugawa Y, Saito R, Sano Y, Zaraket H, Suzuki Y, Kumaki A, et al. Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. *J Clin Microbiol* 2009;47(8):2475–82.
- [8] Baek YH, Choi EH, Song MS, Pascua PN, Kwon HI, Park SJ, et al. Prevalence and genetic characterization of respiratory syncytial virus (RSV) in hospitalized children in Korea. *Arch Virol* 2012;157(6):1039–50.
- [9] Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A, Patel SN, et al. Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS One* 2012;7(3):e32807.
- [10] Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 9):2117–24.
- [11] Blanc A, Delfraro A, Frabasile S, Arbiza J. Genotypes of respiratory syncytial virus group B identified in Uruguay. *Arch Virol* 2005;150(3):603–9.
- [12] Choudhary ML, Anand SP, Wadhwa BS, Chadha MS. Genetic variability of human respiratory syncytial virus in Pune, Western India. *Infect Genet Evol* 2013;20:369–77.
- [13] Almajhdi FN, Farrag MA, Amer HM. Group B strains of human respiratory syncytial virus in Saudi Arabia: molecular and phylogenetic analysis. *Virus Genes* 2014;48(2):252–9.
- [14] Gimferrer L, Campins M, Codina MG, Martin MeC, Fuentes F, Esperalba J, et al. Molecular epidemiology and molecular characterization of respiratory syncytial viruses at a tertiary care university hospital in Catalonia (Spain) during the 2013–2014 season. *J Clin Virol* 2015;66:27–32.
- [15] Trento A, Viegas M, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS, et al. 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(2):975–84.
- [16] Dapat IC, Shobugawa Y, Sano Y, Saito R, Sasaki A, Suzuki Y, et al. New genotypes within respiratory syncytial virus group B genotype BA in Niigata, Japan. *J Clin Microbiol* 2010;48(9):3423–7.

# 5. DISCUSIÓN

---



## 5. DISCUSIÓN

---

La infección respiratoria aguda es una patología muy frecuente a lo largo de la vida, y especialmente significativa a nivel clínico durante la infancia. Su alta recurrencia en los primeros años de vida genera una alta demanda asistencial tanto en los servicios de atención primaria como en los servicios hospitalarios. Existe un gran número de virus causantes de infección respiratoria, los cuales presentan diferencias en cuanto a su prevalencia, su estacionalidad, su epidemiología, y su importancia clínica. En esta larga lista de virus respiratorios a destacar como agentes causales de enfermedad respiratoria, además de los VG, MPVH, AdvH, EV y RVH, hay que destacar el VRSH.

Desde su descubrimiento en 1956, el VRSH ha sido ampliamente reconocido como una importante causa de infección respiratoria en la población, especialmente en la pediátrica [19]. En la población atendida en nuestro hospital la tasa de detección del VRSH ha sido de un 20% del total de muestras positivas por virus respiratorios. El VRSH ha sido, el tercer virus respiratorio más prevalente en la población atendida en un hospital terciario como el nuestro, por detrás de los VGA y VGB, y el RVH.

Es bien sabido que, la coinfección, o mejor dicho codetección con otros virus respiratorios, se ha descrito ampliamente en trabajos presentados sobre circulación de virus respiratorios. En nuestro trabajo, en un 11% de las muestras confirmadas para el VRSH se detectaron otros virus respiratorios, siendo las coinfecciones con RVH, BoVH, y MPVH las más frecuentes. Este porcentaje es ligeramente inferior a aquel observado en otros estudios [117, 118]. No obstante, el porcentaje de estas codetecciones probablemente esté subestimado puesto que aproximadamente un 23% de las muestras fueron analizadas exclusivamente con pruebas de diagnóstico rápidas, que suelen estar orientadas a la detección urgente de VRSH y/o los VG principalmente durante las epidemias anuales. Aunque el papel de las coinfecciones y su asociación con la gravedad es motivo de estudio, los resultados hasta ahora obtenidos parecen no ser concluyentes. Mientras en algunos trabajos las coinfecciones se han asociado con una mayor gravedad [119, 120], en otros no se han visto diferencias [121-123], o incluso se han observado una menor gravedad [121]. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con otros virus respiratorios más asociados a enfermedad respiratoria leve, como sucede con el RVH, en el caso del VRSH por sí mismo ya tiene una relación directa con enfermedad de tracto respiratorio

inferior en el paciente pediátrico (bronquiolitis sobretodo, pero también bronquitis o neumonía), por lo que el papel de estas codetecciones no sería tan relevante.

Es característico del VRSH, así como de los VG, la marcada estacionalidad de su circulación en forma de brotes epidémicos anuales durante los meses más fríos. De forma general, en los países con un clima templado, su circulación se inicia a finales de otoño y termina a finales de primavera, coincidiendo durante este periodo con la epidemia de los VG [116, 124]. En nuestro hospital, y podríamos generalizarlo a nuestra área geográfica, el VRSH se ha detectado cada temporada aproximadamente desde octubre hasta mayo, con picos máximos de detección entre las semanas 50 y 53, no observando diferencias significativas entre las temporadas estudiadas. La epidemia del VRSH siempre ha precedido al brote epidémico de los VG que, de forma general, se ha iniciado siete semanas después de las primeras detecciones del VRSH. Esta estacionalidad es similar a la registrada en otras regiones españolas y en otros países europeos [116], tal como se puede observar en los datos aportados por los servicios de vigilancia autonómico (Plan de Información Diaria de la Infecciones Respiratorias Agudas en Cataluña), nacional (Sistema de Vigilancia de la Gripe en España) y europeo (European Influenza Surveillance Network). Es importante destacar, que dada la elevada prevalencia del VRSH en la población menor de cinco años, su circulación durante un periodo tan corto de tiempo, y su gravedad clínica asociada sobre todo en los niños más pequeños, existe una gran demanda asistencial especialmente en los servicios hospitalarios pediátricos, y también en los servicios de atención primaria durante los meses de invierno.

Durante las cinco temporadas de estudio se ha podido observar una diferencia significativa en cuanto al número de detecciones entre las dos primeras temporadas y las tres últimas, con un incremento aproximadamente del 50%. Este incremento puede ser debido a diferentes factores. Por un lado, durante este periodo de tiempo se ha incrementado la utilización de los métodos moleculares en detrimento de los métodos basados en detección de antígeno para la detección de los virus respiratorios. De este modo, se ha mejorado sustancialmente la sensibilidad en la detección, especialmente en el paciente adulto, tal como se comentará más adelante. Por otro lado, desde la temporada 2012-2013 se ha estimulado el interés en el estudio de los virus respiratorios, ya sea compartiendo la información disponible de nuestro hospital mediante boletines informativos semanales, o bien iniciando la colaboración conjunta de Microbiología con otros servicios del hospital en proyectos de investigación competitivos y no competitivos. Probablemente por este mayor interés, se ha incrementado el número de muestras recibidas, elevando así el número de detecciones a lo largo de las últimas temporadas.

El objetivo final es, paulatinamente, generar un conocimiento cada vez más preciso de la circulación de todos los virus respiratorios, sin centrarse únicamente en el VRSH y los VG. De este modo, se tendrá un conocimiento más preciso de la circulación no solo del VRSH, sino de todos los virus respiratorios.

El VRSH no tiene el mismo impacto en todos los grupos de edad, siendo la población pediátrica la más susceptible a la infección [125, 126]. En nuestros resultados se puede observar como la mayoría (68%) de los casos confirmados para el VRSH son niños menores de cinco años, de los cuales un 76% son menores de dos años. Es bien sabido que gran parte de las manifestaciones clínicas de la infección causadas por el VRSH, son en gran medida, a consecuencia de la respuesta inmunológica del huésped. En la población pediátrica, y especialmente en los menores de dos años, que es cuando suele darse la primoinfección, la respuesta inmunitaria causa una inflamación exacerbada dada la inmadurez del sistema inmunitario. La inflamación, junto con la producción de moco, y el pequeño diámetro de los conductos pulmonares pueden causar una obstrucción de las vías respiratorias, agravando así el cuadro clínico [127, 128]. Esta mayor gravedad especialmente en los casos más jóvenes requiere muchas veces de asistencia médica, no solo en atención primaria sino también hospitalaria. Por otro lado, el comportamiento de los niños, su temprana escolarización cuando el sistema inmune es todavía inmaduro, y la elevada capacidad de transmisión del VRSH a través de las secreciones respiratorias contribuyen a convertir la población menor de cinco años en la más susceptible.

En la etapa adulta, de forma general, la infección por el VRSH acostumbra a ser leve o incluso subclínica. Sin embargo, existe un creciente interés por el papel de este virus como causa de IRA en el paciente adulto [129-131], sobretodo a partir de la segunda mitad de la epidemia anual. Nuestro trabajo resulta valioso en este aspecto frente a otros realizados sólo en poblaciones pediátricas, ya que para su realización se han estudiado muestras de todos los grupos de edad. De este modo, aunque la población pediátrica se mantiene como la población más afectada, se puede describir la importancia del VRSH también en la población adulta. En nuestro trabajo se observa un incremento a lo largo de las cinco temporadas de la tasa de detección del VRSH en el paciente adulto, especialmente en los mayores de 65 años. Esta tendencia podría ser debida a características intrínsecas del propio virus, como la adquisición de nuevas características antigénicas que permitieran una mayor tasa de reinfección de los casos con exposiciones previas a este virus. Sin embargo, aunque algunas diferencias se han podido observar en las principales glicoproteínas de la envuelta viral, tal como más adelante comentamos, no es posible determinar si han existido cambios en el reconocimiento antigénico al no realizar una caracterización fenotípica de estos cambios. Sin embargo, esta tendencia

podría también explicarse por un incremento en el rendimiento y la sensibilidad de la detección del VRSH por el uso de técnicas moleculares para su detección. Como es bien sabido, en el paciente adulto la carga viral de cualquier virus respiratorio es inferior a la observada en el paciente pediátrico. Además, los adultos, especialmente los mayores de 65 años, presentan una menor hidratación del tracto respiratorio superior, por lo que, en el caso de obtener muestras mediante el uso de una torunda, disminuye el rendimiento de la recogida de la muestra. Así, cualquier incremento en la sensibilidad de la técnica diagnóstica empleada puede aumentar los niveles de detección del VRSH, así como de otros virus respiratorios en el paciente adulto, especialmente en el anciano. Este incremento en la población adulta, sobretodo en la segunda mitad de la epidemia anual, que coincide con el inicio de la temporada de gripe, puede ser debido a que a partir de la temporada 2014-2015 se empezaron a emplear métodos moleculares multiplex como técnicas de detección rápida que detectan el VRSH y los VG de forma simultánea. Así, el hecho de que el final de la epidemia del VRSH coincida con el inicio de la de los VG, probablemente ha contribuido también a una mayor detección del VRSH en adultos de forma casual. Estos resultados, por lo tanto, aportan datos más ajustados sobre el impacto real de la infección por el VRSH en la población adulta, quizás hasta ahora subestimado. No obstante, es importante tener en cuenta que las muestras están tomadas de pacientes que han requerido hospitalización o han sido atendidos en urgencias con criterios suficientes para ser hospitalizados, de modo que la tasa de infección de la población adulta en la comunidad podría ser más elevada ya que en la mayor parte de los casos sin factores de riesgo la infección por VRSH cursa con una sintomatología muy leve o incluso asintomática en el adulto.

En los resultados expuestos existe una distribución heterogénea de los casos en cuanto al sexo. En efecto, el número de casos en hombres fue ligeramente mayor que en mujeres durante todas las temporadas. En otros estudios similares, uno de ellos realizado a partir del estudio de los datos de la red centinela en Cataluña, se observaron tendencias similares [132, 133]. Así, este desequilibrio podría ser debido a factores del huésped intrínsecos al sexo [134]. Un estudio en el que se analizaba el desarrollo fetal intrauterino demostró que los fetos de sexo femenino presentaban índices de maduración pulmonar superiores a la de los de sexo masculino [135]. Sin embargo, hay estudios que demuestran que hormonas sexuales como el estrógeno, la progesterona o la dehidroepiandrosterona disminuyen el nivel de secreción de citoquinas [136, 137]. Estos estudios sugieren que los hombres tienen una función inmunológica superior a la de las mujeres. Otro estudio en el que se analizaba el ratio de afectación por infecciones respiratorias en ambos sexos determinó que, en menores de 15 años el número de hombres afectados era superior al de las mujeres, pero que a partir de esa edad las mujeres pasaban a

ser el grupo más afectado. Esta inversión se justificaba por la aparición de las hormonas sexuales alrededor de los 15 años, que como se ha comentado anteriormente, afectarían a los niveles de secreción de citoquinas [138]. Por tanto, hay un gran número de factores del huésped ligados al sexo implicados con la respuesta inmunitaria que se reflejan en una mayor o menor incidencia de las infecciones respiratorias. Sin embargo, parece que ninguno de los estudios es suficientemente concluyente.

Es conocida la cocirculación variable de virus pertenecientes a ambos grupos, el VRSH-A y el VRSH-B, con un reemplazo del grupo predominante de forma cíclica. Algunos autores han descrito una circulación bienial en sus trabajos, es decir, un grupo es mayoritario en dos temporadas consecutivas y en la tercera hay un cambio de predominio, volviendo en la temporada siguiente a ser predominante el primer grupo predominante, y así sucesivamente [104, 111, 114, 139]. Este patrón de circulación se ajustaría mucho a la teoría que sustenta que la circulación de los distintos grupos está sujeta al estado inmunitario poblacional. En este sentido, una parte de la población podría no estar expuesta a uno de los dos grupos, que en temporadas posteriores podría ser el predominante, pero con un grado de inmunoprotección incompleto, y por tanto más susceptible a la enfermedad por el VRSH. En nuestro trabajo se ha detectado una cocirculación de virus pertenecientes a ambos grupos durante todas las temporadas estudiadas, aunque contrariamente a lo observado en los estudios anteriormente citados, el VRSH-B ha sido el grupo predominante en todas las temporadas excepto en la temporada 2015-2016. A diferencia de lo hemos observado en un periodo de cinco temporadas, muchos trabajos describen un mayor predominio del VRSH-A en el conjunto de las temporadas estudiadas, siendo el VRSH-A el que circula en dos temporadas consecutivas [98, 112, 140, 141]. Este predominio se ha sido atribuido tanto a una mayor capacidad de divergencia genética del VRSH-A, como a una elevada antigenicidad grupo específica del VRSH-B [111]. Estas diferencias en la literatura podrían ser atribuibles a diferencias propias del diseño de los estudios, como las cohortes de pacientes estudiadas, la situación geográfica, el periodo de estudio, etcétera. El carácter variable e impredecible es un rasgo característico de la circulación de los virus respiratorios. Por ejemplo en nuestro país, en un estudio sobre la circulación del VRSH en Madrid en el periodo comprendido entre 2010 y 2015, se observó un predominio del VRSH-B en la temporada 2013-2014, al igual que en el nuestro, sin embargo en la temporada siguiente 2014-2015, el grupo predominante fue el VRSH-A, mientras en Barcelona fue VRSH-B. Dada la escasez de trabajos de vigilancia del VRSH en periodos muy largos de tiempo, con caracterización de los virus circulantes a nivel de grupo, es muy complicado poder sacar conclusiones sobre cuál de los dos grupos es más predominante, cual el que tiene mayor capacidad para adquirir divergencia

genética, así como para describir con la mejor exactitud un patrón de circulación por grupo genético.

No solo existe una alternancia en el predominio de un grupo u otro, sino también dentro de los distintos grupos a nivel de genotipo. Aunque las técnicas de secuenciación han permitido describir un gran número de genotipos dentro de los dos grupos genéticos, no todos siguen circulando, habiendo en efecto un reemplazo constante de los genotipos circulantes por parte de otros nuevos en el transcurso de las epidemias. En un periodo de cinco temporadas, pertenecientes al grupo VRSH-A, sólo se han detectado virus de los genotipos NA1 y ON1. Sin embargo, mientras que para el NA1 solo se detectó una cepa en la temporada 2013-2014, y otra en la temporada 2014-2015, el ON1 ha sido claramente el genotipo predominante durante todas las temporadas. El genotipo NA1, fue detectado por primera vez en Niigata (Japón) en el 2004, cuando los genotipos predominantes eran el GA2 y el GA5. El genotipo NA1 fue circulando cada vez más hasta que en el 2010 ya había desplazado casi por completo a los genotipos GA2 y GA5, convirtiéndose en el genotipo predominante [142, 143]. Posteriormente, en el 2012, se describió en Ontario (Canadá) el genotipo ON1 [144]. Del mismo modo que el NA1, el genotipo ON1 fue gradualmente distribuyéndose en todo el mundo y, actualmente es el genotipo predominante a nivel global tal como se puede ver en los resultados presentados en este trabajo. Por lo que se refiere al VRSH-B, las cepas caracterizadas en este estudio pertenecen a tres genotipos, el BA10, el BA13 y el BA9, siendo este último el más prevalente. El genotipo BA10 fue detectado durante las tres primeras temporadas, aunque en un número muy reducido de cepas. Por otro lado, el genotipo BA13 fue detectado únicamente durante la temporada 2014-2015, y aunque fue representado por un número relativamente importante de cepas, no fué detectado en temporadas posteriores. Sin embargo, el genotipo BA9, del mismo modo que el ON1, fue el genotipo predominante a lo largo de las cinco temporadas. El genotipo BA se describió por primera vez en Buenos Aires (Argentina) en 1999 [145], y desde entonces se ha distribuido globalmente pasando a ser el más prevalente, y desplazando así otros genotipos más antiguos, principalmente el GB2. Con el tiempo, el genotipo BA se fue diversificando y diferenciándose hasta en 13 genotipos distintos dentro de BA. El genotipo BA9 se describió por primera vez en Niigata (Japón) durante la temporada 2006-2007 y se convirtió en el genotipo predominante a partir de la temporada 2009-2010 hasta ahora [146]. Por lo tanto, los cinco años de vigilancia han permitido observar para el VRSH-A y el VRSH-B el reemplazo de dos genotipos (NA1 y BA10) previamente predominantes por dos genotipos (ON1 y BA9) más recientes. Esta distribución es similar a la observada globalmente, lo cual refuerza la idea de que los genotipos del VRSH se extienden y circulan de forma similar en todo el mundo [145, 147]. Esta emergencia

de nuevos genotipos, que no siempre deben perdurar durante diferentes temporadas, ha podido ser observada con la circulación de un nuevo genotipo, el BA13, sólo durante la temporada 2014-2015. De forma similar, otros autores también han descrito la aparición de nuevos genotipos que han emergido a partir del BA [126, 148-150] y del ON1 [151] en los últimos años, aunque, del mismo modo que el BA13, su aparición ha sido esporádica y no han prevalecido en las siguientes temporadas. La aparición de genotipos como el BA13, que circulan esporádicamente durante una temporada en un área geográfica determinada, nos indica que el predominio de un determinado genotipo no impide la aparición de nuevas variantes que puedan circular de forma relativamente importante en una temporada.

El análisis filogenético ha permitido distinguir diversos linajes dentro de los genotipos más predominantes, al igual que se ha podido ver en otros trabajos [151-154]. Para los VRSH-A se han podido diferenciar hasta seis linajes diferentes, con la particularidad que las cepas de cada temporada están distribuidas de forma homogénea entre éstos. Sin embargo, para los VRSH-B se puede ver una distribución heterogénea de las cepas en sus tres linajes durante las distintas temporadas. En efecto, durante las temporadas 2013-2014 y 2014-2015 circularon principalmente los virus pertenecientes a los linajes 1 y 2, mientras que, en las últimas tres temporadas, la mayor parte de los virus pertenecían al linaje 3. Así, el árbol filogenético del VRSH-B muestra una forma no balanceada con una fuerte tendencia direccional hacia el linaje 3, mientras el árbol filogenético del VRSH-A muestra una distribución muy balanceada, quizás debido a una menor presión evolutiva. Lo más probable es que los linajes aquí descritos sigan evolucionando temporada tras temporada hasta convertirse en nuevos genotipos, tal como pudimos observar con la aparición del genotipo BA13, o bien hasta su extinción.

La descripción de un nuevo genotipo en el presente trabajo, la del BA13, junto con las recientemente realizadas por otros autores [155-157], ha servido para evidenciar el vacío existente en cuanto a un criterio para la definición de nuevos genotipos, ya que no existe un consenso global. Esta definición se fundamenta principalmente en el valor de bootstrap y en el valor medio de la p-distancia del cluster genético a clasificar. Aunque el valor de bootstrap igual o superior al 70% parece estar ampliamente aceptado, existen una gran variabilidad en cuanto al valor de la p-distancia utilizado. Distintos autores como Venter *et al.* [155], Trento *et al.* [156], o Agoti *et al.* [157], han sugerido un valor de p-distancia en función de distintos criterios. Hasta ahora, el criterio más extendido y el que se ha usado para la definición del genotipo BA13, ha sido el propuesto por Venter *et al.* Sin embargo, recientemente Trento *et al.* sugirió un nuevo criterio basado en considerar como punto de corte la mayor p-distancia intragenotípica

observada para los genotipos ya descritos [156]. Con este criterio Trento *et al.* analizó las p-distancias de todas las secuencias disponibles para el VRSH-A en las bases de datos públicas, de forma que considerando 0,049 como punto de corte (mayor p-distancia intragenotípica correspondiente al genotipo GA1), reclasificó los genotipos NA1, NA2, NA4 y ON1 dentro del genotipo GA2. Aunque conceptualmente, este criterio pudiera ser más robusto, también tiene una serie de limitaciones. Una de ellas es que, el genotipo ON1, como se comentará más adelante, contiene la duplicación de 72 nucleótidos que supone un cambio genético muy importante que repercute directamente en el tamaño, estructura y, por tanto, seguramente función de la proteína resultante. Sin embargo, los programas de inferencia filogenética no tienen en cuenta estas posiciones nucleotídicas al considerarlos como no informativos. Por ello, es imprescindible desarrollar nuevos métodos que contemplen inserciones o deleciones, además de tener en consideración la estructura molecular y función de las proteínas para obtener representaciones filogenéticas más próximas a la realidad [158, 159]. Otra limitación de este criterio propuesto por Trento *et al.* podría ser la escasa cantidad de secuencias del genotipo GA1 disponible en bases de datos dada la escasez de trabajos de epidemiología molecular en el momento en que este genotipo era predominante, lo que podría haber afectado al punto de corte utilizado.

La proteína G, al ser la proteína viral con mayor variabilidad, motivo por el cual es la principal herramienta utilizada en los estudios de epidemiología molecular, es aquella que presenta una mayor diversidad entre cepas. Más allá de la deriva genética por acumulación de mutaciones puntuales al azar, una de las mayores fuentes de variabilidad de la proteína G procede de su capacidad para introducir duplicaciones en su ectodominio. Un gran número de estudios han descrito la aparición de pequeñas inserciones de entre tres y nueve nucleótidos en la RHV-2 de la proteína G [149, 160], tal como se ha observado en el presente trabajo. Sin embargo, la mayor parte de las cepas descritas portadoras de una duplicación, circularon de forma esporádica. Como se ha comentado anteriormente, en el año 1999 y en el 2012, se describieron los genotipos ON1 y BA que se caracterizaban por tener una duplicación de 72 y 60 nucleótidos en la RHV-2 de la proteína G, respectivamente. La circulación de ambos se fue describiendo en distintas regiones del mundo, hasta convertirse en los genotipos predominantes. El mecanismo por el que estas grandes duplicaciones otorgan una ventaja evolutiva a estas cepas no está del todo esclarecido. Sin embargo, estos residuos aminoacídicos añadidos podrían modificar significativamente las características antigénicas de la proteína G, permitiendo al virus evadirse del reconocimiento por los anticuerpos neutralizantes presentes en la población como consecuencia de infecciones previas. Por otro lado, estas duplicaciones podrían tener algún

efecto en la unión del virus a la célula huésped de tal forma que mejoraran su *fitness* virológico [147]. Sin embargo, hay estudios en los que se ha evaluado *in vitro* la capacidad infectiva de virus recombinantes carentes de la proteína G, que han demostrado que aún sin esta proteína, el virus es capaz de unirse a las células e infectarlas [161]. Además, se han descrito infecciones en pacientes inmunodeprimidos en las que el VRSH ha sufrido una delección completa del gen que codifica para la proteína G [162]. Aun no presentando la proteína G en superficie, y coincidiendo con los resultados observados *in vitro*, el virus mantiene su capacidad infectiva. Por todo esto, más allá de sus funciones de adhesión con la membrana de la célula huésped, la proteína G probablemente juegue un papel inmunomodulador muy importante, que *in vitro* o en pacientes inmunodeprimidos posiblemente no resulta ser determinante. En este sentido, el predominio de los virus con una duplicación estaría más justificado por la variabilidad antigénica adquirida que por cambios en la proteína que incrementen su *fitness* biológico. En esta misma línea, en estudios de caracterización del MPVH detectados durante los años 2016 y 2017 en nuestra área geográfica, también pertenecientes a la familia *Pneumoviridae*, se describieron unas variantes con unas duplicaciones de 180 y 111 nucleótidos respectivamente, en su proteína G [163, 164], que con el tiempo se han convertido en genotipos predominantes. Por lo tanto, esta adquisición de duplicaciones en la proteína G parece no ser un evento puntual sino una estrategia evolutiva compartida entre los principales miembros de la familia *Pneumoviridae*. De hecho, se cree que estas duplicaciones se originan a raíz de las estructuras secundarias formadas por el ARN viral. Aunque estas estructuras no deberían formarse ya que el ARN viral está unido a la proteína N, tal vez, en regiones en las que la proteína N se desune por error podrían formarse estas estructuras secundarias haciendo que la polimerasa, erróneamente, copie dos veces una misma secuencia [165]. Si este fuera el mecanismo por el que estos virus adquieren las duplicaciones, lo más probable es que este evento genético se repita de nuevo con el tiempo.

Más allá de las duplicaciones, también existe un mecanismo que conlleva un cambio en el tamaño de la proteína, la introducción de codones de terminación prematuros. Estos, al igual que en nuestros estudios, han sido ampliamente descritos [111]. Los virus, por su pequeño tamaño tienen un genoma muy limitado en cuanto a su longitud, el cual deben optimizar al máximo para que ocupe el tamaño justo y necesario dentro de la partícula [166]. En un trabajo de ingeniería genética en el que se estudiaba la capacidad para incorporar fragmentos nucleotídicos en el genoma del virus de la hepatitis A, probaron que cuanto más grande era el fragmento introducido, más inestable era la partícula vírica resultante [166]. Por tanto, la incorporación de duplicaciones relativamente grandes en el genoma del VRSH (y del MPVH) podría afectar de algún modo a la estabilidad de la partícula vírica. Es posible, por tanto, que la

adquisición de codones prematuros fuese un mecanismo compensatorio de estas duplicaciones. Es decir, para compensar la introducción de un fragmento genético tan importante, el virus, mediante la introducción de codones de terminación prematuros, iría devolviendo a la proteína su tamaño original. Tal vez de ese modo, acortando el tamaño de la proteína, el virus asegura la estabilidad de la partícula y le permite al mismo tiempo adquirir nuevamente duplicaciones, y así, ir también modificando sus características antigénicas. Además, se ha visto que la adquisición de estos codones de terminación repercute directamente en la antigenicidad de la proteína, convirtiéndose así en un mecanismo más de variabilidad del VRSH [167].

La proteína F, contrariamente a la proteína G, presenta un elevado grado de conservación. De hecho, los grupos genéticos VRSH-A y VRSH-B presentan entre sí una similitud de un 91% a nivel aminoacídico para la proteína F [168, 169]. La proteína F es la mayor diana de la respuesta inmune protectora frente a una infección por el VRSH, y los anticuerpos generados contra ella confieren protección contra ambos grupos [170, 171]. En contraste, la proteína G desencadena una respuesta inmunitaria más leve, y los anticuerpos producidos contra ella solo confieren protección grupo específica [113]. La proteína F, probablemente por su estructura y función, está mucho más conservada que la proteína G. Por todo ello, la proteína F es la principal diana elegida para el desarrollo de vacunas y tratamientos de profilaxis para el VRSH [172].

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, la variabilidad intra-grupo ( $p$ -distancia) a nivel nucleotídico para la proteína F completa ha sido significativamente inferior que en la observada para la proteína G, lo cual también se ha observado en otros trabajos [173-175]. Sin embargo, se observan ligeras diferencias entre los diferentes grupos para esta variabilidad intra-grupo, y tanto la proteína G como la proteína F del VRSH-B han mostrado ser superiores a las del VRSH-A, de forma similar a otros trabajos [176], sugiriendo que el VRSH-B podría tener una mayor capacidad evolutiva. A pesar de que el número de cepas estudiadas es más limitado para los genotipos no predominantes durante las últimas cinco temporadas, tanto en los datos presentados por H. Chi *et al.* [176] como en el nuestro, el grupo genético que más ha predominado ha sido el que ha presentado una mayor variabilidad en su proteína F. Se conoce que el gen que codifica para la proteína L muestra un grado de similitud entre grupos muy elevado, por lo que la ARN polimerasa ARN dependiente resultante probablemente tenga una tasa de mutación muy similar entre ambos [8, 177], de modo que pueden existir determinados factores no conocido que sean el origen de estas diferencias entre ambos grupos para introducir más o menos cambios en su secuencia.

Por otro lado, la presión selectiva ejercida sobre la proteína F ha sido examinada mediante el cálculo del ratio dN/dS. Aunque la proteína F completa de ambos grupos no ha mostrado estar bajo una presión selectiva positiva ( $dN/dS < 1$ ), el ratio dN/dS de la proteína F del VRSH-B ha sido mayor que el del VRSH-A. La anotación de los cambios aminoacídicos observados en las secuencias codificantes de la proteína F del presente trabajo ha permitido observar que su distribución no es del todo homogénea en el caso del VRSH-B, a diferencia de lo observado para el VRSH-A. Esta mayor diversidad genética (p-distancia intra-grupo) del VRSH-B dirigida por una mayor presión selectiva (dN/dS), acompañada de una mayor heterogeneidad en los cambios en las diferentes regiones antigénicas, posiblemente ha tenido como consecuencia el mayor predominio de VRSH-B observado en cuatro de las cinco temporadas. Esta presión selectiva, probablemente ejercida por la respuesta preexistente en la comunidad adquirida por las diferentes epidemias anuales, pero no en el individuo (recordemos que el VRSH está principalmente afectando a niños menores de dos años), es el motor evolutivo que conduce al virus a incorporar cambios que le otorgan algún tipo de ventaja evolutiva. Por un lado, estos cambios podrían repercutir en el grado de variabilidad antigénica del virus, de modo que el virus sea capaz de evadir el reconocimiento por parte del sistema inmunitario, o también podrían repercutir en el *fitness* virológico, manteniéndose en circulación y poco a poco convirtiéndose en predominante, a la espera de la emergencia de nuevas variantes con nuevas características antigénicas que los acaben reemplazando.

La mayor parte de las mutaciones no sinónimas encontradas en la proteína F se han encontrado especialmente concentradas en los dominios PS y pep27, aunque también en los dominios HRC, HRA, TM y CT, de forma similar a los cambios observados en otros trabajos [173, 178]. La proteína F del VRSH es la única de los *Pneumoviridae* que requiere ser proteolizada por furinas en dos puntos para llevar a cabo su función. El péptido pep27 es el producto que se desecha en ese corte, por lo que parece no tener ninguna función específica en la proteína F. Hasta ahora se pensaba que el corte por furinas en estos dos puntos era un proceso postranscripcional. Pero recientemente se describió que el segundo punto de corte por furina no se da hasta que el virus infecta la célula y es internalizado por macropinocitosis. Una vez dentro de la vesícula, se da ese segundo corte que activará la proteína que fusionará ambas membranas permitiendo a la nucleoproteína del virus penetrar en el citoplasma [179]. Siendo esta la secuencia de proteólisis de la proteína F, el pep27 estaría en la superficie de los virus por lo que quedaría expuesto al sistema inmunitario del huésped. En un estudio de Fuentes *et al.* [86], se demostró que el pep27 era una región fuertemente antigénica reconocida por sueros de individuos previamente infectados por el VRSH. Por tanto, los cambios en esta región, tal y como se comentará más

adelante, pueden tener un impacto directo en el reconocimiento antigénico del VRSH. Además, al no tener ninguna función específica en la proteína activa, puede tolerar un mayor número de cambios. Por otro lado, el PS es el encargado de direccionar a la proteína F al RE tras su síntesis. Probablemente, al no presentar una secuencia específica de direccionamiento al RE, sino solo una secuencia de naturaleza hidrofóbica [180], su grado de conservación es menor, siempre y cuando no se pierda esta naturaleza.

Las regiones en las que se han encontrado un menor número de cambios aminoacídicos son las regiones heptádicas repetidas que conforman el tallo de la proteína, y, por tanto, esenciales para el mantenimiento de su estructura. La mayor parte de estas regiones están conformadas por hélices alpha altamente estables [3]. Un estudio reciente de Rocklin *et al.* [181], ha demostrado lo mucho que influye la incorporación de cambios aminoacídicos en la estructura de una hélice alpha, lo que nos lleva a pensar que cambios en estas regiones podrían alterar gravemente la estructura de la proteína.

La anotación de las secuencias permite observar como un alto porcentaje de las mutaciones aminoacídicas encontradas están presentes en más de un 95% de las cepas estudiadas. Sin embargo, es importante señalar que las cepas de referencia utilizadas para esta anotación, cepas A2 (VRSH-A) y B1 (VRSH-B), son cepas aisladas en 1961 y 1991, respectivamente. Por lo tanto, muchos de estos cambios observados probablemente fueron adquiridos y fijados hace ya mucho tiempo. Pero estos cambios no dejan de ser relevantes puesto que la mayor parte de vacunas en desarrollo se elaboran en base a la secuencia prototipo A2 [182-184], no incorporando estos cambios que sí están presentes en los virus circulantes. De este modo, la efectividad de la vacuna podría estar comprometida de no actualizar la proteína F utilizada en la composición de la vacuna. La vigilancia virológica del VRSH tiene que ir en paralelo al desarrollo de una vacuna que se espera, pueda comenzar a administrarse, en un periodo entre cinco y diez años según la OMS. Por un lado, permitirá caracterizar las variantes circulantes actualmente, de modo que se puedan conocer sus características genéticas y antigénicas, y por otro lado generará un conocimiento previo fundamental para el seguimiento desde el inicio en la administración de esta vacuna, para así, entre otros objetivos, poder monitorizar la efectividad vacunal temporada tras temporada.

La capacidad de reinfección del VRSH podría atribuirse tanto a una respuesta inmunitaria deficiente por parte del huésped, como a la variabilidad en regiones antigénicas del virus. Nuestro trabajo se ha enfocado en el estudio de la variabilidad en regiones antigénicas con el

fin de asociarla al predominio de un determinado grupo genético, o bien al recambio de genotipo o linaje observado temporada tras temporada. Dado que la proteína F es la mayor diana de la respuesta inmune protectora frente a una infección, se ha relacionado muchas veces el recambio constante de genotipos con cambios adquiridos en esta proteína en regiones determinantes de las características antigénicas [113, 170, 171]. Aunque exista un alto grado de conservación en la proteína F, estudios previos han demostrado que la introducción de un solo cambio aminoacídico en una región antigénica es capaz de disminuir o anular por completo la afinidad de los anticuerpos dirigidos contra ellas [87]. Nuestros resultados muestran que para el VRSH-A no existen cambios evidentes en regiones antigénicas específicas de un genotipo u otro. Además, la mayor parte de cambios observados están presentes casi en la totalidad de las cepas. Como se ha comentado anteriormente, al estar usando una cepa de referencia antigua, estos cambios probablemente ya estén fijados en la población viral circulante. Curiosamente, las únicas diferencias que se detectan entre linajes no son mutaciones sino reversiones al aminoácido *wild type*. En efecto, para los linajes 5 y 6 del genotipo ON1, en los dominios I y II, un cierto porcentaje de secuencias están adquiriendo las mutaciones S276N y I348V. Para el VRSH-B, en cambio, excepto por un cambio (F45L) en el dominio MPE8, todos los cambios no son una reversión al fenotipo *wild type*, sino que son mutaciones nuevas. Además, los cambios parecen estar distribuidos de forma más heterogénea entre linajes y genotipos que para los VRSH-A. De hecho, los genotipos BA10 y BA13 tienen un mayor número de cambios en el dominio antigénico pep27, mientras que el BA9 tiene con más frecuencia cambios en los dominios  $\alpha 2\alpha 3\beta 3\beta 4$ , dominio I y MPE8. Además, dentro de los linajes del genotipo BA9, también se pueden distinguir diferencias. Se ha demostrado que un único cambio en una región antigénica puede influenciar el grado de neutralización de los anticuerpos en diversos virus como el virus de la enfermedad mano-pie-boca [185], la hepatitis B [186], el virus de la leucemia de células T [187], el VIH [188] o el VG [189]. Por ello, podríamos extrapolar, que un solo cambio en una región antigénica del VRSH podría tener un efecto directo en su antigenicidad pudiéndose así evadir del reconocimiento del sistema inmunitario.

En un estudio realizado por Tapia *et al.* en el que se analizaba la variabilidad de la proteína F, se observó que no existía variabilidad en las regiones antigénicas expuestas en la conformación post-F (dominio I, II y IV) de las cepas estudiadas [173]. Además, observaron que el dominio antigénico pre-F  $\emptyset$  tenía un alto grado de variabilidad. Por ello, propusieron los dominios antigénicos post-F como dianas en el desarrollo de vacunas y descartaron el dominio  $\emptyset$ . Sin embargo, en nuestro estudio, los resultados para estas regiones han sido opuestos, ya que hemos encontrado una cierta variabilidad entre las cepas estudiadas para los dominios post-F y un alto grado de conservación para el dominio  $\emptyset$ . Estos resultados destacan la importancia de

mantener una vigilancia activa de la proteína F puesto que, como hemos visto, el grado de conservación en las regiones antigénicas no parece ser estable a lo largo del tiempo.

Más allá del análisis de la variabilidad de la proteína F, también se estudió la existencia de cambios que puedan afectar a la efectividad tanto del único tratamiento profiláctico en uso, el palivizumab, como a la de otros tratamientos y vacunas en desarrollo. Por lo que se refiere a la región diana del palivizumab, se detectó una variante perteneciente al genotipo ON1 durante la temporada 2013-2014 portadora de la mutación K272M, previamente caracterizada como mutación que confiere resistencia al palivizumab [190]. Por otro lado, en la posición 276 el VRSH-A se caracteriza por tener una asparagina (N) y el VRSH-B por tener una serina (S) [191]. En las muestras analizadas, todas las cepas de VRSH-A tienen la mutación N276S excepto algunas de los linajes 5 y 6 del genotipo ON1 que parece que están revertiendo al aminoácido *wild type*. En las cepas del VRSH-B, en cambio, el aminoácido *wild type* está muy conservado excepto en algunas secuencias del linaje 3 del genotipo BA9 que tienen la mutación S276N. Inicialmente, Adam *et al.* describieron la mutación N276S en el VRSH-A como una mutación que podría conferir una resistencia parcial al palivizumab [192]. Más adelante, sin embargo, se analizó el efecto de las mutaciones N276S y S276N para el VRSH-A y el VRSH-B respectivamente y se concluyó que no conferirían resistencia a palivizumab [191]. Por tanto, conocedores que los pacientes con factores de riesgo con tratamiento con palivizumab (datos de la Red de Vigilancia Hospitalaria de VRSH en el Área Metropolitana de Barcelona 2015-2018), podemos afirmar que la prevalencia de variantes portadoras de mutaciones asociadas a resistencia que han sido detectadas principalmente en pacientes no tratados es muy baja a lo largo de cinco temporadas de vigilancia. De hecho, son pocos los trabajos que describen la escasa circulación de variantes del VRSH resistentes al palivizumab en la población. Dada la elevada efectividad de este tratamiento profiláctico [193] es poco frecuente detectar casos de VRSH entre los pacientes tratados, mientras que las mutaciones detectadas en pacientes no tratados y por ello sin presión selectiva por el fármaco emergen de forma espontánea.

Más allá de las mutaciones de resistencia al palivizumab, se han analizado las regiones dianas de tratamiento profilácticos, antivirales y vacunas en desarrollo. Actualmente, existen 60 vacunas, 18 inmunoglobulinas y 27 antivirales en fases clínicas y preclínicas [1, 194]. Aunque existe una información muy limitada sobre las regiones en las que se unen las inmunoglobulinas o antivirales, o la composición de las vacunas, algunos estudios ya han determinado cambios en la proteína F que podrían afectar a la efectividad de estos fármacos [195-199]. Hasta donde sabemos, nuestro trabajo es de los pocos que ha estudiado estas regiones en las cepas

circulantes del VRSH. Aunque se han encontrado cambios en algunas regiones usadas como subunidades víricas para vacunas o en regiones diana de antivirales o inmunoglobulinas, ninguna se corresponde con las que confieren una disminución o falta de efectividad. Sin embargo, debemos ser conscientes que la información disponible sobre las regiones diana de los tratamientos en desarrollo, así como los cambios que generan resistencia a ellos es limitada. Además, al no haber pacientes tratados en la población, todavía no se ha ejercido una presión selectiva por lo que, la emergencia de cambios que generen resistencia es poco probable. Tal como ya hemos mencionado anteriormente, este conocimiento no solo sirve para estudiar posibles variantes que podrían generar resistencia frente a los nuevos fármacos en desarrollo, sino que permitirá en un futuro monitorizar la circulación de nuevas variantes que sean seleccionadas a partir de una nueva presión selectiva ejercida por estos nuevos tratamientos o vacunas, y que podrían condicionar su efectividad.

En relación con la vigilancia del VRSH, desde la temporada 2006-2007 la información disponible en nuestro país se ha basado en datos aportados por el Sistema de Vigilancia de la Gripe en España (SVGE<sup>\*</sup>). Sin embargo, al no tratarse de una red centinela diseñada para la vigilancia del VRSH sino de los VG, al no tener en cuenta aspectos importantes como una definición de caso específica para el VRSH, o al obtener los datos exclusivamente de la asistencia primaria y no hospitalaria, acaba aportando una información que no va más allá de la descripción del patrón temporal de circulación. En Cataluña, la información sobre la circulación del VRSH es la obtenida a partir (i) de la red de vigilancia centinela de los VG y de otros virus respiratorios (Plan de Información Diaria de las Infecciones Respiratorias Agudas en Cataluña, PIDIRAC<sup>†</sup>), coordinada por la Agencia de Salud Pública de Cataluña (Generalitat de Cataluña), pero que presenta los mismos problemas citados anteriormente, o bien (ii) de los datos del Sistema de Notificación Microbiológica de Cataluña, perteneciente a la Red de Vigilancia Epidemiológica de Cataluña (XVEC), pero que aporta resultados epidemiológicos a medio plazo. Sin embargo, los resultados de PIDIRAC difieren en cuanto a los niveles de detección en comparación con los observados en nuestro hospital, ya que según datos del PIDIRAC, aproximadamente un 7% de los casos confirmados de infección respiratoria vírica son causados por el VRSH, mientras que en este trabajo el VRSH representa un 20% de las muestras positivas para virus respiratorios. Por esta necesidad de realizar una vigilancia más ajustada del VRSH, la OMS está implementando el

---

\* <https://vgripe.isciii.es>

† [http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/home\\_canal\\_salut/professionals/temes\\_de\\_salut/vigilancia\\_epidemiologica/documents/arxiu/spfi.pdf](http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/home_canal_salut/professionals/temes_de_salut/vigilancia_epidemiologica/documents/arxiu/spfi.pdf)

Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS), diseñado para la vigilancia mundial de los virus de la gripe durante más de 60 años, para una prueba piloto de vigilancia del VRSH durante un periodo de tres años (2017-2019). La finalidad de este proyecto es proporcionar una mejor comprensión de la patogenia por este virus, de su presentación clínica, de su variable estacionalidad entre países o regiones geográficas, y de la carga de atención sanitaria asociada. Todo el trabajo de esta tesis doctoral se ha realizado desde el pensamiento unánime de que es necesario iniciar y potenciar la vigilancia virológica, y también clínica, del VRSH, especialmente en un hospital terciario como el nuestro, con una alta carga asistencial pediátrica. Pero en Cataluña, la infección por el VRSH es causa de 2.500 y 3.000 ingresos hospitalarios anuales por bronquiolitis, de los cuales un 18-20% requerirán de ingreso en la unidad de cuidados intensivos pediátrica. Así, estas tareas de vigilancia no deben ser implementadas a nivel individual, sino colectivo. Por ello, a partir de la temporada 2015-2016 se inició la Red de Vigilancia Hospitalaria del VRSH en el Área Metropolitana de Barcelona<sup>‡</sup>, con la participación a fecha de hoy de cinco hospitales pediátricos (Hospital Universitario Vall d'Hebron y H. de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona; H. Universitario Sant Joan de Déu de Esplugues de Llobregat; H. Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona, y la Corporació Sanitària Parc Taulí de Sabadell). La finalidad de esta red es disponer de una información semanal actualizada de la detección del VRSH en los pacientes atendidos a nivel hospitalario, juntamente con la información clínica de los casos hospitalizados y las características virológicas de los virus detectados. De este modo, disponemos de un modelo predictivo de la actividad viral con umbrales de alerta, suficientemente precoces, para la gestión y activación eficaz de los recursos sanitarios necesarios durante la corta pero intensa epidemia anual, y de unos ajustados para iniciar la administración del palivizumab a los pacientes de alto riesgo una semana antes del inicio de la epidemia del VRSH [200]. También, permite identificar y estudiar aquellos casos de mayor gravedad en la enfermedad. Por último, permite monitorizar la gran diversidad genética de los virus circulantes para detectar de forma precoz la emergencia, dispersión y predominio de variantes virales con nuevas características genéticas que pueden alterar su antigenicidad, tropismo, virulencia o bien la resistencia al palivizumab, además de generar un conocimiento valioso para el desarrollo de futuros tratamientos terapéuticos o de profilaxis.

---

<sup>‡</sup> <https://hospital.vallhebron.com/ca/actualitat/publicacions/informes-setmanals-de-vrs>

# 6. CONCLUSIONES

---



## 6. CONCLUSIONES

---

1. Además de una elevada prevalencia del VRSH en el paciente pediátrico, ampliamente conocida, también observamos un fuerte impacto en la población adulta, sobretodo en los pacientes mayores de 65 años, más especialmente durante la segunda mitad de la epidemia anual. Probablemente la importancia clínica de la infección por el VRSH en esta población haya sido subestimada hasta ahora.
2. Parecen haber factores asociados al sexo que determinan la mayor susceptibilidad a la enfermedad por el VRSH en los individuos de sexo masculino. Estos parecen influir especialmente en los primeros años de vida, cuando la prevalencia del VRSH es más elevada.
3. Este trabajo ha permitido describir la estacionalidad del VRSH en nuestra área geográfica, definiendo el inicio, la duración y los picos de máxima actividad. Esta información recogida durante diferentes temporadas en nuestro centro, junto con la de otros hospitales pediátricos, ha estimulado la creación de una red de vigilancia hospitalaria para una mejor gestión de los recursos asistenciales, entre otros objetivos.
4. Aunque se observó la cocirculación de virus pertenecientes a ambos grupos genéticos, existe una alternancia en el predominio de uno sobre otro que podría estar determinada por el estado inmunitario poblacional. El predominio del VRSH-B en cuatro de las cinco temporadas estudiadas podría justificarse por la mayor capacidad de este grupo para adquirir una mayor diversidad genética en las dos glicoproteínas de la envuelta (G y F), especialmente en regiones antigénicas previamente caracterizadas.
5. Durante estas últimas cinco temporadas se ha completado el reemplazo de antiguos genotipos predominantes por otros nuevos (ON1 Y BA9), tal como se ha podido observar en otras áreas geográficas. También, se ha podido observar la circulación de un nuevo genotipo (BA13), aunque fuera durante una sola temporada, además de variantes portadoras de pequeñas inserciones en la proteína G. Estos hallazgos evidencian la variable cocirculación de diferentes genotipos, su reemplazo, y la adquisición de nuevas características genéticas.
6. La secuencia completa de la proteína F presenta un alto grado de conservación, seguramente por la relevancia de la estructura terciaria en su funcionalidad, aunque con

unas pocas mutaciones encontradas en las regiones antigénicas que podrían explicar la mayor circulación de los genotipos pertenecientes al VRSH-BVRSH-B.

7. Existe una muy baja prevalencia de variantes virales genéticamente resistentes al palivizumab en la población estudiada. Esta baja prevalencia es debida a que no existe en la población no tratada una presión selectiva que condicione la selección y emergencia de variantes portadoras de mutaciones asociadas a resistencia.
8. A pesar de que la información disponible de los dominios proteicos utilizados para el diseño de futuras vacunas o tratamientos antivirales es muy limitada, no hemos encontrado cambios genéticos en aquellas regiones conocidas. Sin embargo, es posible que al no haberse administrado todavía a la población, no hayan ejercido una presión selectiva. La información aportada en este trabajo permite por un lado monitorizar los cambios acumulados en estas regiones para los virus actualmente en circulación, y por otro, será valiosa para llevar a cabo tareas de vigilancia virológica en un futuro.
9. Las observaciones de esta tesis remarcan de nuevo la importancia de la vigilancia virológica, y también clínica, durante las epidemias del VRSH, ya que cambios genéticos de los virus en circulación pueden condicionar el fenotipo de estas variantes afectando a su antigenicidad, pero también a su tropismo o virulencia. Esta monitorización será especialmente relevante en un futuro cuando nuevas vacunas o antivirales sean administrados en la población, ya que condicionarán la evolución y circulación de las poblaciones virales, tanto a nivel individual y poblacional.

# 7. BIBLIOGRAFÍA

---



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Mazur, N.I., et al., *Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics*. *Lancet Respir Med*, 2015. **3**(11): p. 888-900.
2. Tan, L., et al., *The comparative genomics of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: genetic variability and molecular evolutionary dynamics*. *J Virol*, 2013. **87**(14): p. 8213-26.
3. Swanson, K.A., et al., *Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(23): p. 9619-24.
4. Bawage, S.S., et al., *Recent advances in diagnosis, prevention, and treatment of human respiratory syncytial virus*. *Adv Virol*, 2013. **2013**: p. 595768.
5. Cane, P.A., D.A. Matthews, and C.R. Pringle, *Analysis of relatedness of subgroup A respiratory syncytial viruses isolated worldwide*. *Virus Res*, 1992. **25**(1-2): p. 15-22.
6. Canedo-Marroquín, G., et al., *Modulation of Host Immunity by Human Respiratory Syncytial Virus Virulence Factors: A Synergic Inhibition of Both Innate and Adaptive Immunity*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. **7**: p. 367.
7. McLellan, J.S., W.C. Ray, and M.E. Peeples, *Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013. **372**: p. 83-104.
8. Collins, P.L., R. Fearn, and B.S. Graham, *Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013. **372**: p. 3-38.
9. Liljeroos, L., et al., *Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(27): p. 11133-8.
10. BLOUNT, R.E., J.A. MORRIS, and R.E. SAVAGE, *Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1956. **92**(3): p. 544-9.
11. CHANOCK, R., B. ROIZMAN, and R. MYERS, *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**(3): p. 281-90.
12. Hall, C.B., *Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(25): p. 1917-28.
13. Simoes, E.A., *Respiratory syncytial virus infection*. *Lancet*, 1999. **354**(9181): p. 847-52.
14. Mlinaric-Galinovic, G. and D. Varda-Brkic, *Nosocomial respiratory syncytial virus infections in children's wards*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2000. **37**(4): p. 237-46.
15. Falsey, A.R., et al., *Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(17): p. 1749-59.
16. Domachowske, J.B. and H.F. Rosenberg, *Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment*. *Clin Microbiol Rev*, 1999. **12**(2): p. 298-309.
17. Roberts, S.R., R.W. Compans, and G.W. Wertz, *Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells*. *J Virol*, 1995. **69**(4): p. 2667-73.
18. Jaovisidha, P., et al., *Respiratory syncytial virus stimulates neutrophil degranulation and chemokine release*. *J Immunol*, 1999. **163**(5): p. 2816-20.
19. McNamara, P.S. and R.L. Smyth, *The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in childhood*. *Br Med Bull*, 2002. **61**: p. 13-28.
20. Laham, F.R., et al., *Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy*. *J Infect Dis*, 2004. **189**(11): p. 2047-56.
21. Hickling, T.P., et al., *A recombinant trimeric surfactant protein D carbohydrate recognition domain inhibits respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo*. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(11): p. 3478-84.

22. Johnson, T.R., et al., *NK T cells contribute to expansion of CD8(+) T cells and amplification of antiviral immune responses to respiratory syncytial virus*. J Virol, 2002. **76**(9): p. 4294-303.
23. Fishaut, M., D. Tubergen, and K. McIntosh, *Cellular response to respiratory viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity*. J Pediatr, 1980. **96**(2): p. 179-86.
24. Connors, M., et al., *Pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of CD4+ T cells*. J Virol, 1992. **66**(12): p. 7444-51.
25. Parrott, R.H., et al., *Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex*. Am J Epidemiol, 1973. **98**(4): p. 289-300.
26. Harsten, G., et al., *Serum antibodies against respiratory tract viruses: a prospective three-year follow-up from birth*. J Laryngol Otol, 1989. **103**(10): p. 904-8.
27. Singleton, R., et al., *Inability to evoke a long-lasting protective immune response to respiratory syncytial virus infection in mice correlates with ineffective nasal antibody responses*. J Virol, 2003. **77**(21): p. 11303-11.
28. Shay, D.K., et al., *Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996*. JAMA, 1999. **282**(15): p. 1440-6.
29. Collaborators, G.L., *Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. Lancet Infect Dis, 2017. **17**(11): p. 1133-1161.
30. Glezen, W.P., et al., *Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus*. Am J Dis Child, 1986. **140**(6): p. 543-6.
31. FDA, *Guidance for industry: bioanalytical method validation*. 2001.
32. Ralston, S.L., et al., *Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis*. Pediatrics, 2014. **134**(5): p. e1474-502.
33. Meissner, H.C., et al., *Immunoprophylaxis with RespiGam*. Pediatrics, 2004. **113**(3 Pt 1): p. 629.
34. Diseases, C.o.I., *From the American Academy of Pediatrics: Policy statements--Modified recommendations for use of palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infections*. Pediatrics, 2009. **124**(6): p. 1694-701.
35. *Guía de Práctica Clínica sobre Bronquiolitis Aguda*, in GUÍAS DE PRÁCTICA CLÍNICA EN EL SNS. MINISTERIO DE SANIDAD Y POLÍTICA SOCIAL.
36. Kim, H.W., et al., *Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine*. Am J Epidemiol, 1969. **89**(4): p. 422-34.
37. Balfour-Lynn, I.M., D.R. Girdhar, and C. Aitken, *Diagnosing respiratory syncytial virus by nasal lavage*. Arch Dis Child, 1995. **72**(1): p. 58-9.
38. Eugene-Ruellan, G., et al., *Detection of respiratory syncytial virus A and B and parainfluenzavirus 3 sequences in respiratory tracts of infants by a single PCR with primers targeted to the L-polymerase gene and differential hybridization*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(3): p. 796-801.
39. Rima, B., et al., *ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae*. J Gen Virol, 2017.
40. Van Regenmortel, M.H., et al., *A proposal to change existing virus species names to non-Latinized binomials*. Arch Virol, 2010. **155**(11): p. 1909-19.
41. Harmon, S.B. and G.W. Wertz, *Transcriptional termination modulated by nucleotides outside the characterized gene end sequence of respiratory syncytial virus*. Virology, 2002. **300**(2): p. 304-15.
42. Bukreyev, A., B.R. Murphy, and P.L. Collins, *Respiratory syncytial virus can tolerate an intergenic sequence of at least 160 nucleotides with little effect on transcription or replication in vitro and in vivo*. J Virol, 2000. **74**(23): p. 11017-26.

43. Swedan, S., et al., *Multiple functional domains and complexes of the two nonstructural proteins of human respiratory syncytial virus contribute to interferon suppression and cellular location.* J Virol, 2011. **85**(19): p. 10090-100.
44. Bitko, V., et al., *Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth.* J Virol, 2007. **81**(4): p. 1786-95.
45. Teng, M.N., 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**(19): p. 9317-21.
46. Whitehead, S.S., et al., *Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees.* J Virol, 1999. **73**(4): p. 3438-42.
47. Tawar, R.G., et al., *Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus.* Science, 2009. **326**(5957): p. 1279-83.
48. Castagné, N., et al., *Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain.* J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 6): p. 1643-53.
49. Satake, M. and S. Venkatesan, *Nucleotide sequence of the gene encoding respiratory syncytial virus matrix protein.* J Virol, 1984. **50**(1): p. 92-9.
50. Mitra, R., et al., *The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments.* J Virol, 2012. **86**(8): p. 4432-43.
51. Gan, S.W., et al., *The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels.* J Biol Chem, 2012. **287**(29): p. 24671-89.
52. Carter, S.D., et al., *Direct visualization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus reveals the structural basis for membrane permeability.* FEBS Lett, 2010. **584**(13): p. 2786-90.
53. Fuentes, S., et al., *Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein.* J Virol, 2007. **81**(15): p. 8361-6.
54. Bukreyev, A., et al., *Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse.* J Virol, 1997. **71**(12): p. 8973-82.
55. Jin, H., et al., *Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo.* Virology, 2000. **273**(1): p. 210-8.
56. Karron, R.A., et al., *Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13961-6.
57. Fearn, R. and P.L. Collins, *Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription.* J Virol, 1999. **73**(7): p. 5852-64.
58. Blondot, M.L., et al., *Structure and functional analysis of the RNA- and viral phosphoprotein-binding domain of respiratory syncytial virus M2-1 protein.* PLoS Pathog, 2012. **8**(5): p. e1002734.
59. Cheng, X., et al., *Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication.* J Virol, 2005. **79**(22): p. 13943-52.
60. Liuzzi, M., et al., *Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase.* J Virol, 2005. **79**(20): p. 13105-15.
61. Noton, S.L., et al., *The respiratory syncytial virus polymerase has multiple RNA synthesis activities at the promoter.* PLoS Pathog, 2012. **8**(10): p. e1002980.
62. Collins, P.L. and G. Mottet, *Oligomerization and post-translational processing of glycoprotein G of human respiratory syncytial virus: altered O-glycosylation in the presence of brefeldin A.* J Gen Virol, 1992. **73** ( Pt 4): p. 849-63.

63. Wertz, G.W., M. Krieger, and L.A. Ball, *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**(11): p. 4767-76.
64. Gorman, J.J., et al., *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**(6): p. 1308-15.
65. Feldman, S.A., R.M. Hendry, and J.A. Beeler, *Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 6610-7.
66. García-Beato, R., et al., *Host cell effect upon glycosylation and antigenicity of human respiratory syncytial virus G glycoprotein*. Virology, 1996. **221**(2): p. 301-9.
67. Escribano-Romero, E., et al., *The soluble form of human respiratory syncytial virus attachment protein differs from the membrane-bound form in its oligomeric state but is still capable of binding to cell surface proteoglycans*. J Virol, 2004. **78**(7): p. 3524-32.
68. Jentoft, N., *Why are proteins O-glycosylated?* Trends Biochem Sci, 1990. **15**(8): p. 291-4.
69. Melero, J.A., et al., *Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein*. J Gen Virol, 1997. **78 ( Pt 10)**: p. 2411-8.
70. Johnson, P.R., et al., *The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(16): p. 5625-9.
71. Martínez, I., J. Dopazo, and J.A. Melero, *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 ( Pt 10)**: p. 2419-29.
72. García-Beato, R. and J.A. Melero, *The C-terminal third of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein is partially resistant to protease digestion and is glycosylated in a cell-type-specific manner*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 4): p. 919-27.
73. Hendricks, D.A., K. McIntosh, and J.L. Patterson, *Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus*. J Virol, 1988. **62**(7): p. 2228-33.
74. Polack, F.P., et al., *The cysteine-rich region of respiratory syncytial virus attachment protein inhibits innate immunity elicited by the virus and endotoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(25): p. 8996-9001.
75. Srinivasakumar, N., P.L. Ogra, and T.D. Flanagan, *Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay*. J Virol, 1991. **65**(8): p. 4063-9.
76. Walsh, E.E. and J. Hruska, *Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein*. J Virol, 1983. **47**(1): p. 171-7.
77. González-Reyes, L., et al., *Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9859-64.
78. Zimmer, G., L. Budz, and G. Herrler, *Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31642-50.
79. Chambers, P., C.R. Pringle, and A.J. Easton, *Sequence analysis of the gene encoding the fusion glycoprotein of pneumonia virus of mice suggests possible conserved secondary structure elements in paramyxovirus fusion glycoproteins*. J Gen Virol, 1992. **73 ( Pt 7)**: p. 1717-24.
80. Zhao, X., et al., *Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14172-7.

81. Collins, P.L., Y.T. Huang, and G.W. Wertz, *Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(24): p. 7683-7.
82. Kwakkenbos, M.J., et al., *Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming*. Nat Med, 2010. **16**(1): p. 123-8.
83. McLellan, J.S., et al., *Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody*. Science, 2013. **340**(6136): p. 1113-7.
84. Corti, D., et al., *Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 439-43.
85. Gilman, M.S., et al., *Characterization of a Prefusion-Specific Antibody That Recognizes a Quaternary, Cleavage-Dependent Epitope on the RSV Fusion Glycoprotein*. PLoS Pathog, 2015. **11**(7): p. e1005035.
86. Fuentes, S., et al., *Antigenic Fingerprinting following Primary RSV Infection in Young Children Identifies Novel Antigenic Sites and Reveals Unlinked Evolution of Human Antibody Repertoires to Fusion and Attachment Glycoproteins*. PLoS Pathog, 2016. **12**(4): p. e1005554.
87. López, J.A., et al., *Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6922-8.
88. López, J.A., et al., *Location of a highly conserved neutralizing epitope in the F glycoprotein of human respiratory syncytial virus*. J Virol, 1990. **64**(2): p. 927-30.
89. Arbiza, J., et al., *Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus*. J Gen Virol, 1992. **73 ( Pt 9)**: p. 2225-34.
90. Costello, H.M., et al., *Targeting RSV with vaccines and small molecule drugs*. Infect Disord Drug Targets, 2012. **12**(2): p. 110-28.
91. Tayyari, F., et al., *Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus*. Nat Med, 2011. **17**(9): p. 1132-5.
92. Dickens, L.E., P.L. Collins, and G.W. Wertz, *Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus*. J Virol, 1984. **52**(2): p. 364-9.
93. Kuo, L., et al., *Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus*. J Virol, 1996. **70**(10): p. 6892-901.
94. COATES, H.V., L. KENDRICK, and R.M. CHANOCK, *Antigenic differences between two strains of respiratory syncytial virus*. Proc Soc Exp Biol Med, 1963. **112**: p. 958-64.
95. WULFF, H., P. KIDD, and H.A. WENNER, *RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS: OBSERVATIONS ON ANTIGENIC HETEROGENEITY*. Proc Soc Exp Biol Med, 1964. **115**: p. 240-3.
96. Doggett, J.E. and D. Taylor-Robinson, *Serological studies with respiratory syncytial virus*. Arch Gesamte Virusforsch, 1965. **15**(5): p. 601-8.
97. Anderson, L.J., et al., *Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies*. J Infect Dis, 1985. **151**(4): p. 626-33.
98. Mufson, M.A., et al., *Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus*. J Gen Virol, 1985. **66 ( Pt 10)**: p. 2111-24.
99. Gimenez, H.B., et al., *Antigenic variation between human respiratory syncytial virus isolates*. J Gen Virol, 1986. **67 ( Pt 5)**: p. 863-70.
100. García-Barreno, B., et al., *Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins*. J Virol, 1989. **63**(2): p. 925-32.
101. Hendry, R.M., L.T. Pierik, and K. McIntosh, *Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups over six consecutive outbreaks: 1981-1987*. J Infect Dis, 1989. **160**(2): p. 185-90.

102. Storch, G.A., C.S. Park, and D.E. Dohner, *RNA fingerprinting of respiratory syncytial virus using ribonuclease protection. Application to molecular epidemiology*. J Clin Invest, 1989. **83**(6): p. 1894-902.
103. Cristina, J., 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**(1): p. 126-34.
104. Cane, P.A., D.A. Matthews, and C.R. Pringle, *Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(1): p. 1-4.
105. Peret, T.C., et al., *Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community*. J Gen Virol, 1998. **79 ( Pt 9)**: p. 2221-9.
106. Peret, T.C., et al., *Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America*. J Infect Dis, 2000. **181**(6): p. 1891-6.
107. Haynes, A.K., et al., *Respiratory syncytial virus circulation in seven countries with Global Disease Detection Regional Centers*. J Infect Dis, 2013. **208 Suppl 3**: p. S246-54.
108. Yusuf, S., et al., *The relationship of meteorological conditions to the epidemic activity of respiratory syncytial virus*. Epidemiol Infect, 2007. **135**(7): p. 1077-90.
109. Broberg, E.K., et al., *Seasonality and geographical spread of respiratory syncytial virus epidemics in 15 European countries, 2010 to 2016*. Euro Surveill, 2018. **23**(5).
110. Mullins, J.A., et al., *Substantial variability in community respiratory syncytial virus season timing*. Pediatr Infect Dis J, 2003. **22**(10): p. 857-62.
111. Zlateva, K.T., et al., *Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(9): p. 3022-30.
112. Arbiza, J., A. Delfraro, and S. Frabasile, *Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001--a review*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005. **100**(3): p. 221-30.
113. Cane, P.A., *Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus*. Rev Med Virol, 2001. **11**(2): p. 103-16.
114. Hall, C.B., et al., *Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children*. J Infect Dis, 1990. **162**(6): p. 1283-90.
115. Scott, P.D., et al., *Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya*. J Med Virol, 2004. **74**(2): p. 344-54.
116. Broberg, E.K., et al., *Seasonality and geographical spread of respiratory syncytial virus epidemics in 15 European countries, 2010 to 2016*. Euro Surveill, 2018. **23**(5).
117. Kabego, L., et al., *Human respiratory syncytial virus: prevalence, viral co-infections and risk factors for lower respiratory tract infections in children under 5 years of age at a general hospital in the Democratic Republic of Congo*. J Med Microbiol, 2018. **67**(4): p. 514-522.
118. Robledo-Aceves, M., et al., *Risk factors for severe bronchiolitis caused by respiratory virus infections among Mexican children in an emergency department*. Medicine (Baltimore), 2018. **97**(9): p. e0057.
119. Waner, J.L., *Mixed viral infections: detection and management*. Clin Microbiol Rev, 1994. **7**(2): p. 143-51.
120. Goka, E.A., et al., *Single, dual and multiple respiratory virus infections and risk of hospitalization and mortality*. Epidemiol Infect, 2015. **143**(1): p. 37-47.
121. Martin, E.T., et al., *Epidemiology of multiple respiratory viruses in childcare attendees*. J Infect Dis, 2013. **207**(6): p. 982-9.
122. Brand, H.K., et al., *Infection with multiple viruses is not associated with increased disease severity in children with bronchiolitis*. Pediatr Pulmonol, 2012. **47**(4): p. 393-400.

123. Zhang, G., et al., *High incidence of multiple viral infections identified in upper respiratory tract infected children under three years of age in Shanghai, China*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44568.
124. Jepsen, M.T., et al., *Incidence and seasonality of respiratory syncytial virus hospitalisations in young children in Denmark, 2010 to 2015*. Euro Surveill, 2018. **23**(3).
125. Esposito, S., et al., *Characteristics and Their Clinical Relevance of Respiratory Syncytial Virus Types and Genotypes Circulating in Northern Italy in Five Consecutive Winter Seasons*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0129369.
126. Bayrakdar, F., et al., *Genetic variability human respiratory syncytial virus subgroups A and B in Turkey during six successive epidemic seasons, 2009-2015*. J Med Virol, 2018. **90**(3): p. 456-463.
127. Johnson, J.E., et al., *The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection*. Mod Pathol, 2007. **20**(1): p. 108-19.
128. Aherne, W., et al., *Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children*. J Clin Pathol, 1970. **23**(1): p. 7-18.
129. Kwon, Y.S., et al., *Risk of mortality associated with respiratory syncytial virus and influenza infection in adults*. BMC Infect Dis, 2017. **17**(1): p. 785.
130. Katsurada, N., et al., *The impact of virus infections on pneumonia mortality is complex in adults: a prospective multicentre observational study*. BMC Infect Dis, 2017. **17**(1): p. 755.
131. Kodama, F., D.A. Nace, and R.L.P. Jump, *Respiratory Syncytial Virus and Other Noninfluenza Respiratory Viruses in Older Adults*. Infect Dis Clin North Am, 2017. **31**(4): p. 767-790.
132. Li, X., et al., *Viral etiologies and epidemiology of patients with acute respiratory infections based on sentinel hospitals in Gansu Province, Northwest China, 2011-2015*. J Med Virol, 2018.
133. Antón, A., et al., *Virological surveillance of influenza and other respiratory viruses during six consecutive seasons from 2006 to 2012 in Catalonia, Spain*. Clin Microbiol Infect, 2016. **22**(6): p. 564.e1-9.
134. Avitsur, R., et al., *Behavioral effects of interleukin-1 beta: modulation by gender, estrus cycle, and progesterone*. Brain Behav Immun, 1995. **9**(3): p. 234-41.
135. Klein, J.M. and H.C. Nielsen, *Sex-specific differences in rabbit fetal lung maturation in response to epidermal growth factor*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1133**(2): p. 121-6.
136. Verthelyi, D., *Sex hormones as immunomodulators in health and disease*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(6): p. 983-93.
137. Verthelyi, D. and D.M. Klinman, *Sex hormone levels correlate with the activity of cytokine-secreting cells in vivo*. Immunology, 2000. **100**(3): p. 384-90.
138. Jensen-Fangel, S., et al., *Gender differences in hospitalization rates for respiratory tract infections in Danish youth*. Scand J Infect Dis, 2004. **36**(1): p. 31-6.
139. Galiano, M.C., et al., *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**(5): p. 2266-73.
140. Park, E., et al., *Molecular and clinical characterization of human respiratory syncytial virus in South Korea between 2009 and 2014*. Epidemiol Infect, 2017. **145**(15): p. 3226-3242.
141. Coggins, W.B., E.J. Lefkowitz, and W.M. Sullender, *Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(12): p. 3552-7.
142. Ohno, A., et al., *Genetic characterization of human respiratory syncytial virus detected in hospitalized children in the Philippines from 2008 to 2012*. J Clin Virol, 2013. **57**(1): p. 59-65.

143. Khor, C.S., et al., *Displacement of predominant respiratory syncytial virus genotypes in Malaysia between 1989 and 2011*. Infect Genet Evol, 2013. **14**: p. 357-60.
144. Eshaghi, A., et al., *Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32807.
145. Trento, A., et al., *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**(2): p. 975-84.
146. Dapat, I.C., et al., *New genotypes within respiratory syncytial virus group B genotype BA in Niigata, Japan*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(9): p. 3423-7.
147. Trento, A., et al., *Ten years of global evolution of the human respiratory syncytial virus BA genotype with a 60-nucleotide duplication in the G protein gene*. J Virol, 2010. **84**(15): p. 7500-12.
148. Ábrego, L.E., et al., *Genetic variability of human respiratory syncytial virus group B in Panama reveals a novel genotype BA14*. J Med Virol, 2017. **89**(10): p. 1734-1742.
149. Gaynard, A., et al., *Genetic characterization of respiratory syncytial virus highlights a new BA genotype and emergence of the ON1 genotype in Lyon, France, between 2010 and 2014*. J Clin Virol, 2018. **102**: p. 12-18.
150. Bashir, U., et al., *Molecular detection and characterization of respiratory syncytial virus B genotypes circulating in Pakistani children*. Infect Genet Evol, 2017. **47**: p. 125-131.
151. Hirano, E., et al., *Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1*. Infect Genet Evol, 2014. **28**: p. 183-91.
152. Song, J., et al., *Emergence of BA9 genotype of human respiratory syncytial virus subgroup B in China from 2006 to 2014*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 16765.
153. Duvvuri, V.R., et al., *Genetic diversity and evolutionary insights of respiratory syncytial virus A ON1 genotype: global and local transmission dynamics*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14268.
154. Tabatabai, J., et al., *Novel respiratory syncytial virus (RSV) genotype ON1 predominates in Germany during winter season 2012-13*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e109191.
155. Venter, M., et al., *Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 9): p. 2117-24.
156. Trento, A., et al., *Conservation of G-Protein Epitopes in Respiratory Syncytial Virus (Group A) Despite Broad Genetic Diversity: Is Antibody Selection Involved in Virus Evolution?* J Virol, 2015. **89**(15): p. 7776-85.
157. Agoti, C.N., et al., *Successive Respiratory Syncytial Virus Epidemics in Local Populations Arise from Multiple Variant Introductions, Providing Insights into Virus Persistence*. J Virol, 2015. **89**(22): p. 11630-42.
158. Wilke, C.O., *Bringing molecules back into molecular evolution*. PLoS Comput Biol, 2012. **8**(6): p. e1002572.
159. Posada, D., *Phylogenetic models of molecular evolution: next-generation data, fit, and performance*. J Mol Evol, 2013. **76**(6): p. 351-2.
160. Sullender, W.M., et al., *Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses*. J Virol, 1991. **65**(10): p. 5425-34.
161. Batonick, M. and G.W. Wertz, *Requirements for Human Respiratory Syncytial Virus Glycoproteins in Assembly and Egress from Infected Cells*. Adv Virol, 2011. **2011**.
162. Venter, M., et al., *Identification of deletion mutant respiratory syncytial virus strains lacking most of the G protein in immunocompromised children with pneumonia in South Africa*. J Virol, 2011. **85**(16): p. 8453-7.
163. Piñana, M., et al., *Novel human metapneumovirus with a 180-nucleotide duplication in the G gene*. Future Microbiol, 2017. **12**: p. 565-571.

164. Saikusa, M., et al., *A novel 111-nucleotide duplication in the G gene of human metapneumovirus*. *Microbiol Immunol*, 2017. **61**(11): p. 507-512.
165. Trento, A., 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**(Pt 11): p. 3115-20.
166. Cuervo, A., M.I. Daudén, and J.L. Carrascosa, *Nucleic acid packaging in viruses*. *Subcell Biochem*, 2013. **68**: p. 361-94.
167. Rueda, P., et al., *Premature stop codons in the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses resistant to neutralization by monoclonal antibodies*. *J Virol*, 1991. **65**(6): p. 3374-8.
168. Johnson, P.R., 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**(10): p. 3163-6.
169. Johnson, P.R. and P.L. Collins, *The fusion glycoproteins of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B: sequence conservation provides a structural basis for antigenic relatedness*. *J Gen Virol*, 1988. **69 ( Pt 10)**: p. 2623-8.
170. Taylor, G., et al., *Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus infection in mice*. *Immunology*, 1984. **52**(1): p. 137-42.
171. Walsh, E.E., J.J. Schlesinger, and M.W. Brandriss, *Protection from respiratory syncytial virus infection in cotton rats by passive transfer of monoclonal antibodies*. *Infect Immun*, 1984. **43**(2): p. 756-8.
172. Melero, J.A., V. Mas, and J.S. McLellan, *Structural, antigenic and immunogenic features of respiratory syncytial virus glycoproteins relevant for vaccine development*. *Vaccine*, 2017. **35**(3): p. 461-468.
173. Tapia, L.I., et al., *Gene sequence variability of the three surface proteins of human respiratory syncytial virus (HRSV) in Texas*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e90786.
174. Tan, L., et al., *Genetic variability among complete human respiratory syncytial virus subgroup A genomes: bridging molecular evolutionary dynamics and epidemiology*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e51439.
175. Schobel, S.A., et al., *Respiratory Syncytial Virus whole-genome sequencing identifies convergent evolution of sequence duplication in the C-terminus of the G gene*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 26311.
176. Chi, H., et al., *Molecular epidemiology and phylodynamics of the human respiratory syncytial virus fusion protein in northern Taiwan*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e64012.
177. Ren, L., et al., *Molecular characterization of human respiratory syncytial virus subtype B: a novel genotype of subtype B circulating in China*. *J Med Virol*, 2015. **87**(1): p. 1-9.
178. Kim, Y.K., E.H. Choi, and H.J. Lee, *Genetic variability of the fusion protein and circulation patterns of genotypes of the respiratory syncytial virus*. *J Med Virol*, 2007. **79**(6): p. 820-8.
179. Krzyzaniak, M.A., et al., *Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(4): p. e1003309.
180. Martín, D., et al., *Sequence elements of the fusion peptide of human respiratory syncytial virus fusion protein required for activity*. *J Gen Virol*, 2006. **87**(Pt 6): p. 1649-58.
181. Rocklin, G.J., et al., *Global analysis of protein folding using massively parallel design, synthesis, and testing*. *Science*, 2017. **357**(6347): p. 168-175.
182. Piedra, P.A., et al., *Immunogenicity of a new purified fusion protein vaccine to respiratory syncytial virus: a multi-center trial in children with cystic fibrosis*. *Vaccine*, 2003. **21**(19-20): p. 2448-60.
183. Karron, R.A., et al., *Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants*. *J Infect Dis*, 2005. **191**(7): p. 1093-104.

184. Smith, G., et al., *Respiratory syncytial virus fusion glycoprotein expressed in insect cells form protein nanoparticles that induce protective immunity in cotton rats*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50852.
185. Hernández, J., et al., *Generation of a subtype-specific neutralization epitope in foot-and-mouth disease virus of a different subtype*. J Gen Virol, 1992. **73 ( Pt 1)**: p. 213-6.
186. Howard, C.R., *The structure of hepatitis B envelope and molecular variants of hepatitis B virus*. J Viral Hepat, 1995. **2**(4): p. 165-70.
187. Blanchard, S., et al., *Amino acid changes at positions 173 and 187 in the human T-cell leukemia virus type 1 surface glycoprotein induce specific neutralizing antibodies*. J Virol, 1999. **73**(11): p. 9369-76.
188. Takahashi, H., et al., *A single amino acid interchange yields reciprocal CTL specificities for HIV-1 gp160*. Science, 1989. **246**(4926): p. 118-21.
189. Terajima, M., et al., *High-yield reassortant influenza vaccine production virus has a mutation at an HLA-A 2.1-restricted CD8+ CTL epitope on the NS1 protein*. Virology, 1999. **259**(1): p. 135-40.
190. Bates, J.T., et al., *Escape from neutralization by the respiratory syncytial virus-specific neutralizing monoclonal antibody palivizumab is driven by changes in on-rate of binding to the fusion protein*. Virology, 2014. **454-455**: p. 139-44.
191. Zhu, Q., et al., *Natural polymorphisms and resistance-associated mutations in the fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV): effects on RSV susceptibility to palivizumab*. J Infect Dis, 2012. **205**(4): p. 635-8.
192. Adams, O., et al., *Palivizumab-resistant human respiratory syncytial virus infection in infancy*. Clin Infect Dis, 2010. **51**(2): p. 185-8.
193. Simon, A., et al., *Use of Palivizumab in Germany - Report from the German Synagis™ Registry 2009 - 2016*. Klin Padiatr, 2018.
194. Higgins, D., C. Trujillo, and C. Keech, *Advances in RSV vaccine research and development - A global agenda*. Vaccine, 2016. **34**(26): p. 2870-2875.
195. Detalle, L., et al., *Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection*. Antimicrob Agents Chemother, 2016. **60**(1): p. 6-13.
196. Sun, Z., et al., *Respiratory syncytial virus entry inhibitors targeting the F protein*. Viruses, 2013. **5**(1): p. 211-25.
197. Douglas, J.L., et al., *Inhibition of respiratory syncytial virus fusion by the small molecule VP-14637 via specific interactions with F protein*. J Virol, 2003. **77**(9): p. 5054-64.
198. Razinkov, V., et al., *RFI-641 inhibits entry of respiratory syncytial virus via interactions with fusion protein*. Chem Biol, 2001. **8**(7): p. 645-59.
199. Morton, C.J., et al., *Structural characterization of respiratory syncytial virus fusion inhibitor escape mutants: homology model of the F protein and a syncytium formation assay*. Virology, 2003. **311**(2): p. 275-88.
200. Carbonell-Estrany, X., *Prevención de la infección por virus respiratorio sincitial (VRS)*. J. Figueras-Aloy, Editor. 2008, Asociación Española de Pediatría, Sociedad Española de Neonatología Potocolos de Neonatología.
201. Calderón, A., et al., *Genetic variability of respiratory syncytial virus A in hospitalized children in the last five consecutive winter seasons in Central Spain*. J Med Virol, 2017. **89**(5): p. 767-774.

# 8. MATERIAL ANEXO

---



## 8. MATERIAL ANEXO

---

### **Tercer trabajo: Vigilancia virológica del virus respiratorio sincitial humano de los grupos A y B en un hospital terciario en Cataluña (España) durante cinco temporadas consecutivas (2013-2018).**

**Título original:** “Virological surveillance of human respiratory syncytial virus A and B at a tertiary hospital in Catalonia (Spain) during five consecutive seasons (2013-2018)”

**Autores: Authors:** Laura Gimferrer<sup>1</sup>, Jorgina Vila<sup>3</sup>, Maria Piñana<sup>1</sup>, Cristina Andrés<sup>1</sup>, José Angel Rodrigo<sup>2</sup>, Paula Peremiquel-Trillas<sup>2</sup>, María Gema Codina<sup>1</sup>, María del Carmen Martín<sup>1</sup>, Juliana Esperalba<sup>1</sup>, Francisco Fuentes<sup>1</sup>, Susana Rubio<sup>1</sup>, Magda Campins<sup>2</sup>, Tomàs Pumarola<sup>1</sup> and Andrés Antón<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Virus Respiratorios, Departamento de Microbiología, Hospital Universitario Vall d’Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Preventiva y Epidemiología, Hospital Universitario Vall d’Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

<sup>3</sup> Unidad de enfermedades infecciones pediátricas e inmunodeficiencias, Hospital Universitario Vall d’Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

**Autor de correspondencia:**

Tomàs Pumarola

Respiratory Viruses Unit – Microbiology Department

Hospital Universitari Vall d’Hebron

Vall d’Hebron Research Institute

Universitat Autònoma de Barcelona

Passeig Vall d’Hebron 119-129

Barcelona, SPAIN

E-mail: virusrespiratoris@vhebron.net

**RESUMEN:****Antecedentes y objetivos:**

El VRSH es una de las causas más comunes de ITRI que causa epidemias con un patrón estacional muy definido durante los meses de invierno. Existen dos grupos, VRSH-A y VRSH-B, definidos en base a sus características antigénicas y genéticas y diferentes genotipos dentro de ambos. En el presente estudio se han estudiado la prevalencia, la diversidad genética de los VRSH aislados en los pacientes atendidos durante cinco temporadas consecutivas (2013-2018) en el HUVH.

**Métodos:**

Se recogieron muestras respiratorias de pacientes atendidos en el HUVH para la detección de virus respiratorios. Para aquellas muestras positivas para el VRSH, se investigó el grupo genético (VRSH-A y -B) al que pertenecían mediante una RT-RCP (Allplex respiratory panel), usada también como método de diagnóstico o mediante una RT-RCP específica para la proteína N. El análisis filogenético de las secuencias de RHV-2 del gen G se realizaron a partir de un muestreo representativo de cepas pertenecientes a ambos grupos. La amplificación por RCP, la secuenciación y el análisis filogenético de las secuencias de RHV-2 se llevaron a cabo como se describió en los dos trabajos anteriores. Además, se evaluó la distancia genética (p-distancia) y el ratio de cambios no sinónimos y sinónimos (dN/dS) mediante el programa MEGA v7.

**Resultados:**

Los virus que se detectaron de forma más frecuente fueron el VGA y VGB (38%), el RVH (26%) y el AdvH (6%). Con respecto al VRSH, se confirmaron un 20% de positivos, de los cuales, un 11% se encontraron en coinfección con otros virus, principalmente con RVH (44%), BoVH (15%) y AdvH (14%). De los pacientes positivos para el VRSH, un 52% eran menores de 2 años, un 16% tenían entre 2 y 4 años, un 5% tenían entre 5 y 14 años, un 10% tenían entre 15 y 64 años y un 17% eran mayores de 64 años. En cuanto al sexo, la proporción hombre: mujer fue 1:1.2. Las epidemias comenzaron entre las semanas 39 y 42 y finalizaron entre las semanas 16 y 18, con picos máximos entre las semanas 50 y 53. Ambos grupos circularon, aunque siendo el VRSH-B el predominante en 4 de las 5 temporadas del estudio. El análisis filogenético del VRSH-A mostró que un 99% de las cepas pertenecía al genotipo ON1, y un 1% al genotipo NA1. Para el VRSH-B un 91% de las cepas pertenecía al genotipo BA9, un 6% al genotipo BA13 y un 3% al genotipo BA10. Los análisis filogenéticos también revelaron seis linajes dentro de ON1 y tres dentro de BA9. El análisis de la p-distancia mostró que el VRSH-B tenía una mayor variabilidad genética

(0.043) que el VRSH-A (0.030). Además, el ratio dN/dS fue 1,09 para secuencias de VRSH-A y 2,35 para secuencias de VRSH-B.

### **Conclusiones:**

En el presente estudio, el VRSH ha sido el tercer virus respiratorio más detectado. La población pediátrica ha sido la más afectada, aunque se ha detectado un incremento de los casos en la población adulta en las últimas temporadas. Este cambio de tendencia probablemente se origine en la implementación de ensayos multiplex rápidos que detectan el VRSH además del VG. Este hallazgo evidencia que probablemente la infección por el VRSH en la población adulta está subestimada. Por otro lado, la tasa de detección de VRSH en hombres es ligeramente más alta que en las mujeres por lo que podrían existir factores relacionados con el sexo que podrían explicar esta distribución desigual.

El VRSH se detectó de octubre a marzo y siempre antes de la epidemia de VG. El VRSH-B fue predominante durante todas las temporadas excepto para la 2015-2016. La mayoría de los virus caracterizados se clasificaron en genotipos ON1 y BA9, lo que confirma su prevalencia también en nuestra área geográfica. El árbol filogenético del VRSH-B mostró una fuerte tendencia direccional, en contraste, el árbol del VRSH-A tiene una filogenia más equilibrada mostrando así una menor presión selectiva. El VRSH-B ha mostrado una diversidad genética mayor que VRSH-A que podría influir en características antigénicas o virales que podrían favorecer su predominio. En resumen, el presente estudio describe la diversidad genética del VRSH en Cataluña.

**ARTÍCULO:**

**TITLE:** Virological surveillance of human respiratory syncytial virus A and B at a tertiary hospital in Catalonia (Spain) during five consecutive seasons (2013-2018)

**RUNNING TITLE:** Virological surveillance of HRSV in Catalonia.

**INTRODUCTION:**

Since human respiratory syncytial virus (HRSV) discovery in 1956 (1), it has been recognised as one of the most common viral causes of acute respiratory tract infection (2). Primary infection usually occurs during childhood, mainly during the first two years of life. Although reinfections are common throughout life, infants and immunocompromised patients suffer the most clinically significant infections. Thus, the clinical manifestations in the general population range from mild non-specific symptoms or subclinical to severe respiratory illness, such as bronchiolitis, bronchitis or pneumonia (3). It has been estimated that HRSV causes annually over 33.8 million lower respiratory tract infections (LRTI) worldwide (4), which result in approximately 1% to 3% of infants requiring hospitalization in developed countries (2), becoming a substantial medical and economic burden for paediatric health services. HRSV exhibits a seasonal pattern of circulation, with annual epidemics during autumn and winter months in temperate climates, and during the rainy season in tropical climates.

HRSV is an enveloped, non-segmented, negative-sense, single-stranded RNA virus, whose genome (15 kb) encodes for 11 proteins. Recently, it has been renamed Human orthopneumovirus, and reclassified into the Orthopneumovirus genus (5). Two different groups (HRSV-A and HRSV-B) are distinguished based on antigenic features that are explained by a genetic divergence of 65% between them (6). Among the viral proteins, the transmembrane glycoprotein (G), which is responsible for the attachment with the cell receptor, has two hypervariable regions (HVR-1 and HVR-2) in its ectodomain that contain immune epitopes recognised by neutralizing antibodies (7). It is precisely the selective pressure exerted by the herd immunity that drives the G protein to a continuous evolution, and indeed, it converts it into the most HRSV variable protein. Given the high variability of the G protein, this is the main tool used for the study of the HRSV evolution. So far, up to 15 genotypes have been described for HRSV-A and 28 for HRSV-B. In the present study the genetic diversity and the epidemiology features of HRSV cases attended during five consecutive seasons (2013-2018) at the Hospital

Universitari Vall d'Hebron (HUVH), a tertiary hospital in Barcelona (Catalonia, Spain), have been studied.

#### **MATERIALS AND METHODS:**

From October 2013 (week 40/2013) to March 2018 (week 09/2018), upper (nasopharyngeal aspirates or swabs) and lower (bronchoalveolar lavages, bronchoaspirates and tracheal aspirates) respiratory tract specimens from patients attended at the HUVH were collected for laboratory-confirmation of respiratory viruses. Specimens were processed within the first 24 hours upon reception. The detection of HRSV was performed either by using immunochromatography (Binax Now RSV Card, Allere Scarborough Inc, USA), direct immunofluorescence (D3 Ultra 8™ DFA Respiratory Virus Screening & Identification kit, Diagnostic HYBRIDS, USA) or real-time multiplex RT-PCR (Anyplex™ II RV16 Detection or Allplex™ Respiratory Panel assays, Seegene, South Korea). Rapid molecular (GeneXpert Flu or Flu/RSV XC, Cepheid, USA) or immunofluorescent (Sofia RSV FIA, Quidel, USA) assays were also performed in the 24/7-emergency laboratory. Total nucleic acids were extracted using NucliSENS easyMAG (BioMérieux, France) according to the manufacturer's instructions. For HRSV-positive samples the group (HRSV-A or -B) was determined by Seegene's Allplex RT-PCR assay, or by a nucleoprotein-specific real-time RT-PCR assay as previously described (8) until the 2014-2015 season. Since the 2015-2016 season the previous HRSV-B probe (5'-CTTCCCTTCTAAYCTGGACATA-3') was re-designed because of a lost of specificity. Phylogenetic analyses of HVR-2 sequences of the G gene were performed from a representative sampling of strains, which included at least four strains per week and group when available. PCR amplification, sequencing and phylogenetic analysis of the HVR-2 sequences were carried out as previously described (9). To reduce redundancy of equal sequences, a collapse of the sequences to haplotypes was carried out with ALignment Transformation EnviRonment program (10). For the phylogenetic analyses, reference sequences from previous epidemiological studies were downloaded from GeneBank (Supplementary Table 1). In addition, mean pairwise distances (p-distance) and the ratio (dN/dS) of substitution rates at non-synonymous (dN) per synonymous (dS) site for the determination of selective pressure were calculated using MEGA v7 (11). Institutional Review Board approval (PR\_AG\_78/2014) was obtained from the HUVH Clinical Research Ethics Committee.

#### **RESULTS:**

A total of 31,692 specimens from 24,581 patients were collected, of which 14,637 (46%) from 12,120 (49%) patients were laboratory-confirmed for one (91%) or more respiratory viruses (9%). The most frequently detected respiratory viruses were influenza A and B viruses (38%), rhinovirus (26%), HRSV (20%) and adenovirus (6%), and the less detected (<5%) were metapneumovirus (HMPV), parainfluenza 1-4 virus, coronaviruses OC43, 229E and NL63, bocavirus and enterovirus. The 20% of positive samples for HRSV represents in absolute terms a total of 2,918 specimens from 2,451 (20%) patients were laboratory-confirmed. HRSV was co-detected with other respiratory viruses in 262 (11%) specimens, of which rhinovirus (115; 44%), human bocavirus (51; 15%) and adenovirus (36; 14%) were the most frequent. From the 2,451 HRSV laboratory-confirmed patients (median age: 1,5 years and IQR: 0–33 years), 1,277 (52%) were younger than 2 years old, 395 (16%) were between 2-4 years old, 124 (5%) were between 5-14 years old, 235 (10%) were between 15-64 years old and 420 (17%) were older than 64 years old. However, the distribution of HRSV cases by age groups (Supplementary Figure 2) was variable along the study, and while 0-2 years-old children remained as the most prevalent during the study period, an increase of HRSV detection rate from 6% (2013-2014) to 27% (2017-2018) in adult population during the last seasons was also reported. In addition, as seen in Supplementary Figure 2, there is an unequal distribution in the number of cases by age within the seasons themselves. Although the population under 2 years remains the most affected, there is an increase in adult cases in the second half of the season, coinciding with the onset of the influenza epidemic.

Regarding the sex distribution, the overall male:female ratio was 1:1.2 (Table 1). Moreover, as shown in Figure 1, seasonal HRSV epidemics usually started on autumn (week 42) before the annual influenza epidemics and finished on spring (week 15), with detection peaks between weeks 50 and 53. Both HRSV-A (962; 40%) and HRSV-B (1.299; 53%) co-circulated every season at variable levels. The HRSV-B was the predominant genetic group in four out of the five studied seasons, while the HRSV-A was the most detected only during the 2015-2016 season. Few cases of HRSV-A/B co-detection (13; 1%) were reported, in addition to 177 (7%) viruses whose genetic group could not be determined likely due to the low viral load in respiratory specimen. Phylogenetic analysis of 295 HRSV-A sequences showed that all strains (293; 99%) belonged to ON1 genotype, and two (1%) to NA1 genotype. As well, phylogenetic analysis of 340 HRSV-B sequences showed that 310 (91%) fell within BA9 genotype, 21 (6%) within BA13 genotype (12), and 9 (3%) within BA10 genotype. Phylogenetic analyses also revealed several lineages into the most prevalent genotypes (ON1 and BA9), six into ON1 clade and three into BA9 (Figure 2). The molecular characterisation of deduced amino acid sequences found several premature stop codons and a 3-nucleotide insertion that change the expected length of the translated protein.

The analysis of intra-group genetic divergence showed that HRSV-B had a higher genetic variability (mean p-distance of 0.043) than HRSV-A (mean p-distance of 0.030), which has been variable between seasons as shown in Figure 3. Moreover, the dN/dS ratio was higher (2.35) for HRSV-B sequences than for HRSV-A sequences (1.09). HRSV-A and HRSV-B amino acid sequences alignment are shown in Supplementary Table 2.

The nucleotide sequences of the present study were submitted to GeneBank database under the accession numbers MH129071 to MH129514.

#### **DISCUSSION:**

In our geographical area HRSV epidemics has occurred every season from October to March at varying levels, and always previous to the influenza epidemics, similar to the seasonality reported in other Spanish regions and European countries (14). The high detection rate of HRSV, only preceded by influenza viruses and rhinovirus, reflects the great importance as a pathogen in the community, particularly among the paediatric population. Given the high HRSV prevalence and its circulation for a few months, this virus causes a very important imbalance in the annual care burden of the health care centers, particularly in emergency rooms, hospitalisation wards and intensive care units of paediatric services. In addition to the clinical significance in infants and children, an increase in the HRSV detection rate in the adult population has been reported in the last seasons, especially among elderly patients (>64 years) as shown in Supplementary Figure 1. Although this trend could be partially related to changes in the antigenic features of the most recent circulating viruses, the most reliable explanation might be the implementation of rapid multiplex assays able to detect HRSV in addition to influenza in a single run, much more during the influenza epidemics (as seen in Supplementary Figure 2) that are coincidental with the end of HRSV epidemics. This finding evidences the underestimation of the HRSV in respiratory infections among the adult population in the past. HRSV detection rate in males is overall higher than in females (Table 1), as previously reported in Catalonia (15). These differences by sex has been also observed for other respiratory virus infections (16). There might be sex-related factors to explain this different distribution between males and females, such as the levels of sex hormones among others, which might determine a major or minor susceptibility to disease.

HRSV has been co-detected with other respiratory viruses in a more than 10% of samples. Nevertheless, this number has been probably underestimated since about 23% of the studied specimens were only laboratory-confirmed by rapid detection tests in the emergency laboratory that only detects HRSV or influenza, but not other respiratory viruses. However, the role of co-

detections in clinical overcomes is still controversial, and while some studies did not associate co-infections with higher severity (17), others did it (18).

The molecular characterisation of HRSV has lead to describe the co-circulation of both genetic groups, but above all, HRSV-B has predominated during all seasons except for the 2015-2016 season. This shift in the predominant group might be a viral mechanism to bypass the pre-existing herd immune response (19, 20). Despite no published data supports the idea that a higher severity of HRSV disease occurred during the 2015-2016 epidemic in comparison to the previous and latter seasons, this is a common opinion by paediatricians and Health authorities in Catalonia, which is coincidental with the predominance of HRSV-A. In fact, in the literature HRSV-A has been mostly associated with greater severity than HRSV-B [23]. Although the available clinical studies are not enough conclusive to consider the association of a particular genetic group to a higher severity, it is considered that other host (genetic and immunological) and environmental factors might be also associated with.

Since this virus is related to a high burden in the community every season and associated with a high severity in infants, a hospital-based surveillance network for HRSV in Catalonia was created together with other Catalan paediatric hospitals since the 2015-2016 season (all reports available at: <https://hospital.vallhebron.com/ca/actualitat/publicacions/informes-setmanals-de-vrs>) to monitor in real-time the virological and clinical features throughout the HRSV epidemics.

Several studies reported the acquisition of little insertions in the ectodomain of the G gene (21, 22), most of which did not prevailed in the following seasons, as occurred in one characterised strain of the present study that was carrying a novel 3-nucleotide insertion. In 2003, the first important duplication (60-nt) acquired in the same region was reported in HRSV-B strains, thus giving place to the BA genotype (23). Similarly, for HRSV-A, ON1 genotype carrying a 72-nt duplication was described in 2012. Since the emergence of both BA and ON1 genotypes, they spread worldwide and became predominant replacing the previous ones (24). Most of the characterised viruses in the present study were classified into ON1 and BA9 genotype, which confirms the current absolute predominance in our geographical area over a few strains belonging to minor genotypes. Interestingly, the acquisition of a 180-nt duplication has been seen in the G glycoprotein ectodomain of HMPV strains, which also belong to Pneumoviridae family (25). These duplications, as well as the premature stop codons that were also found in some strains evidence the ability of these HRSV and HMPV proteins to accept changes in their lengths (26). Probably, the modification of G glycoprotein length has evolutionary advantages, which explain the emergence and spreading of genotypes with this feature.

Interestingly, the detected genotypes here reported seem to coincide in their proportions in the different areas of the globe annually. However, with respect to the group, a very variable distribution of the predominant one is observed in different regions annually, even among nearby regions. This difference in the group predominance between areas was evidenced, for instance, in the 2012-2013 season where in Madrid, in contrast to Barcelona, the HRSV-A was the predominant group).

Phylogenetic analysis also distinguished several lineages within both ON1 (HRSV-A) and BA9 (HRSV-B) genotypes, as reported by other authors (27-30). The acquisition of random point mutations by genetic drift is the main evolutionary mechanism that drives towards the differentiation of several genetic lineages, as here reported. Although up to six different lineages have been distinguished within ON1 genotype, none has been predominant in the several seasons. In contrast, a variable distribution of the three different BA9 lineages over time has been observed (lineages 1 and 2 has been mainly detected during the 2013-2014 and 2014-2015 seasons, while lineage 3 mainly circulated during the last three seasons). In fact, HRSV-B tree showed a tendency on strong directional selection being an unbalanced tree, in contrast, HRSV-A tree have a more balanced phylogeny showing less selection pressure (Figure 2). Moreover, based on the differences in the mean genetic divergence, HRSV-B genetic group have showed to have a higher genetic diversity than HRSV-A. This variability could contribute in changes on antigenic features or other viral characteristics, and indeed favoring the predominance in four out of the five studied seasons, surely under evolutionary selective pressures. Probably, some of these ON1 and BA9 lineages may evolve to new genotypes in a near future as occurred with the BA13 genotype (BA13) (12), which was only detected during the 2014-2015 season in Catalonia, as well as many authors described other novel genotypes that also evolved from BA (22, 31-33) and ON1 (28) in the recent years.

Regarding the current genetic HRSV classification, there is a lack of universal criterion for the genotype definition. Some authors (34-36) have already suggested different criteria for this classification, which is mainly focused on the mean p-value distance of a genetic cluster, but they are very variable depending on the used methodology for its calculation. Also, the development of reliable models that jointly consider insertions and deletions in protein-coding sequences as well as the features of their structure and function becomes indispensable to obtain more realistic phylogenetic studies (37, 38)

In summary, the present study describes the genetic diversity of circulating HRSV strains in Southern Europe (Barcelona, Spain) during the last five epidemiological seasons, contributing with recent virological data. In addition, it highlights the importance of a continuous surveillance of HRSV in order to detect and to monitor not only the new genotypes on circulation, but also

those variants with new viral features that could alter the antigenicity and the severity of disease.

#### CONFLICT OF INTEREST

Funding: This work was partially supported by Plan Nacional de I+D+i 2008-2011 and by Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio Español de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0003); by Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio Español de Economía y Competitividad (grant FIS PI14/01838); and European Regional Development Fund (ERDF).

Competing interests: The authors declare no conflict of interest.

Ethical approval: Institutional Review Board approval (PR\_AG\_78/2014) was obtained from the Hospital Universitari Vall d'Hebron Clinical Research Ethics Committee.

#### BIBLIOGRAPHY:

1. BLOUNT RE, MORRIS JA, SAVAGE RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956;92(3):544-9.
2. Langley GF, Anderson LJ. Epidemiology and prevention of respiratory syncytial virus infections among infants and young children. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(6):510-7.
3. Slovic A, Ivancic-Jelecki J, Ljubin-Sternak S, Galinović GM, Forcic D. A molecular epidemiological study of human respiratory syncytial virus in Croatia, 2011-2014. *Infect Genet Evol.* 2016;44:76-84.
4. Mazur NI, Martín-Torres F, Baraldi E, Fauroux B, Greenough A, Heikkinen T, et al. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics. *Lancet Respir Med.* 2015;3(11):888-900.
5. Rima B, Collins P, Easton A, Fouchier R, Kurath G, Lamb RA, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *J Gen Virol.* 2017.
6. Johnson TR, Graham BS. Contribution of respiratory syncytial virus G antigenicity to vaccine-enhanced illness and the implications for severe disease during primary respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23(1 Suppl):S46-57.
7. 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 ( Pt 10):2411-8.
8. Gunson RN, Collins TC, Carman WF. Real-time RT-PCR detection of 12 respiratory viral infections in four triplex reactions. *J Clin Virol.* 2005;33(4):341-4.
9. Gimferrer L, Campins M, Codina MG, Martín MeC, Fuentes F, Esperalba J, et al. Molecular epidemiology and molecular characterization of respiratory syncytial viruses at a tertiary care university hospital in Catalonia (Spain) during the 2013-2014 season. *J Clin Virol.* 2015;66:27-32.
10. Glez-Peña D, Gómez-Blanco D, Reboiro-Jato M, Fdez-Riverola F, Posada D. ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Web Server issue):W14-8.
11. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870-4.

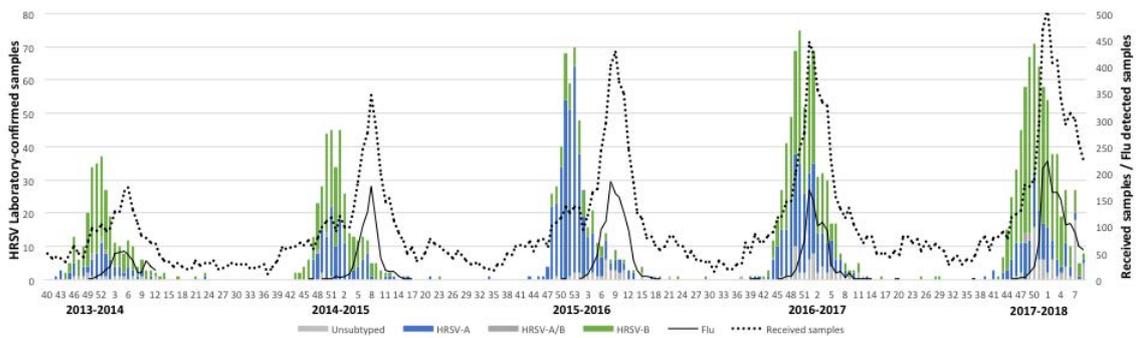
12. Gimferrer L, Andrés C, Campins M, Codina MG, Rodrigo JA, Melendo S, et al. Circulation of a novel human respiratory syncytial virus Group B genotype during the 2014-2015 season in Catalonia (Spain). *Clin Microbiol Infect.* 2015.
13. McNamara PS, Smyth RL. The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in childhood. *Br Med Bull.* 2002;61:13-28.
14. Broberg EK, Waris M, Johansen K, Snacken R, Penttinen P, European Influenza Surveillance Network. Seasonality and geographical spread of respiratory syncytial virus epidemics in 15 European countries, 2010 to 2016. *Euro Surveill.* 2018;23(5).
15. Antón A, Marcos MA, Torner N, Isanta R, Camps M, Martínez A, et al. Virological surveillance of influenza and other respiratory viruses during six consecutive seasons from 2006 to 2012 in Catalonia, Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(6):564.e1-9.
16. Li X, Li J, Meng L, Zhu W, Liu X, Yang M, et al. Viral etiologies and epidemiology of patients with acute respiratory infections based on sentinel hospitals in Gansu Province, Northwest China, 2011-2015. *J Med Virol.* 2018.
17. Petrarca L, Nenna R, Frassanito A, Pierangeli A, Leonardi S, Scagnolari C, et al. Acute bronchiolitis: Influence of viral co-infection in infants hospitalized over 12 consecutive epidemic seasons. *J Med Virol.* 2018;90(4):631-8.
18. Harada Y, Kinoshita F, Yoshida LM, Minh IN, Suzuki M, Morimoto K, et al. Does respiratory virus coinfection increase the clinical severity of acute respiratory infection among children infected with respiratory syncytial virus? *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(5):441-5.
19. Seki K, Tsutsumi H, Ohsaki M, Kamasaki H, Chiba S. Genetic variability of respiratory syncytial virus subgroup a strain in 15 successive epidemics in one city. *J Med Virol.* 2001;64(3):374-80.
20. Agoti CN, Mwiwuri AG, Sande CJ, Onyango CO, Medley GF, Cane PA, et al. Genetic relatedness of infecting and reinfecting respiratory syncytial virus strains identified in a birth cohort from rural Kenya. *J Infect Dis.* 2012;206(10):1532-41.
21. Sullender WM, Mufson MA, Anderson LJ, Wertz GW. Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J Virol.* 1991;65(10):5425-34.
22. Gaymard A, Bouscambert-Duchamp M, Pichon M, Frobert E, Vallee J, Lina B, et al. Genetic characterization of respiratory syncytial virus highlights a new BA genotype and emergence of the ON1 genotype in Lyon, France, between 2010 and 2014. *J Clin Virol.* 2018;102:12-8.
23. 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(Pt 11):3115-20.
24. Katzov-Eckert H, Botosso VF, Neto EA, Zanotto PM, consortium V. Phylodynamics and dispersal of HRSV entails its permanence in the general population in between yearly outbreaks in children. *PLoS One.* 2012;7(10):e41953.
25. Piñana M, Vila J, Gimferrer L, Valls M, Andrés C, Codina MG, et al. Novel human metapneumovirus with a 180-nucleotide duplication in the G gene. *Future Microbiol.* 2017;12:565-71.
26. Zlateva KT, Vijgen L, Dekeersmaeker 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(9):3022-30.
27. Song J, Wang H, Shi J, Cui A, Huang Y, Sun L, et al. Emergence of BA9 genotype of human respiratory syncytial virus subgroup B in China from 2006 to 2014. *Sci Rep.* 2017;7(1):16765.
28. Hirano E, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Yoshida LM, Kuroda M, Noda M, et al. Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. *Infect Genet Evol.* 2014;28:183-91.
29. Duvvuri VR, Granados A, Rosenfeld P, Bahl J, Eshaghi A, Gubbay JB. Genetic diversity and evolutionary insights of respiratory syncytial virus A ON1 genotype: global and local transmission dynamics. *Sci Rep.* 2015;5:14268.

30. Tabatabai J, Prifert C, Pfeil J, Grulich-Henn J, Schnitzler P. Novel respiratory syncytial virus (RSV) genotype ON1 predominates in Germany during winter season 2012-13. *PLoS One*. 2014;9(10):e109191.
  31. Ábrego LE, Delfraro A, Franco D, Castillo J, Castillo M, Moreno B, et al. Genetic variability of human respiratory syncytial virus group B in Panama reveals a novel genotype BA14. *J Med Virol*. 2017;89(10):1734-42.
  32. Bayrakdar F, Kocabas CN, Altas AB, Kavuncuoglu HG, Cosgun Y, Misirlioglu ED, et al. Genetic variability human respiratory syncytial virus subgroups A and B in Turkey during six successive epidemic seasons, 2009-2015. *J Med Virol*. 2018;90(3):456-63.
  33. Bashir U, Nisar N, Mahmood N, Alam MM, Sadia H, Zaidi SS. Molecular detection and characterization of respiratory syncytial virus B genotypes circulating in Pakistani children. *Infect Genet Evol*. 2017;47:125-31.
  34. Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *J Gen Virol*. 2001;82(Pt 9):2117-24.
  35. Trento A, Ábrego L, Rodríguez-Fernández R, González-Sánchez MI, González-Martínez F, Delfraro A, et al. Conservation of G-Protein Epitopes in Respiratory Syncytial Virus (Group A) Despite Broad Genetic Diversity: Is Antibody Selection Involved in Virus Evolution? *J Virol*. 2015;89(15):7776-85.
  36. Agoti CN, Otieno JR, Ngama M, Mwihuri AG, Medley GF, Cane PA, et al. Successive Respiratory Syncytial Virus Epidemics in Local Populations Arise from Multiple Variant Introductions, Providing Insights into Virus Persistence. *J Virol*. 2015;89(22):11630-42.
  37. Wilke CO. Bringing molecules back into molecular evolution. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(6):e1002572.
  38. Posada D. Phylogenetic models of molecular evolution: next-generation data, fit, and performance. *J Mol Evol*. 2013;76(6):351-2.
-

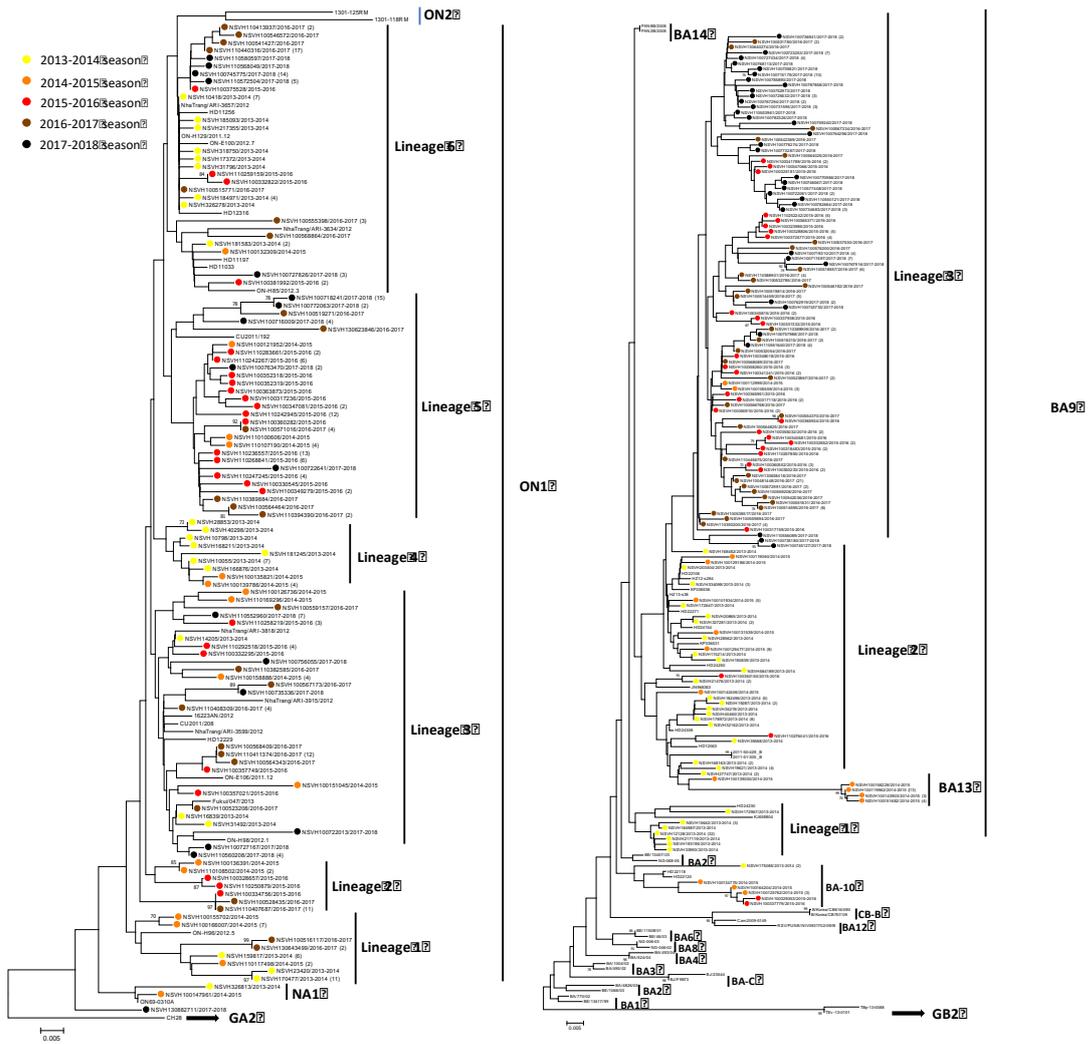
FIGURES AND TABLES:

**Table 1:** Number of tested and positive patient samples tested by season by age and gender.

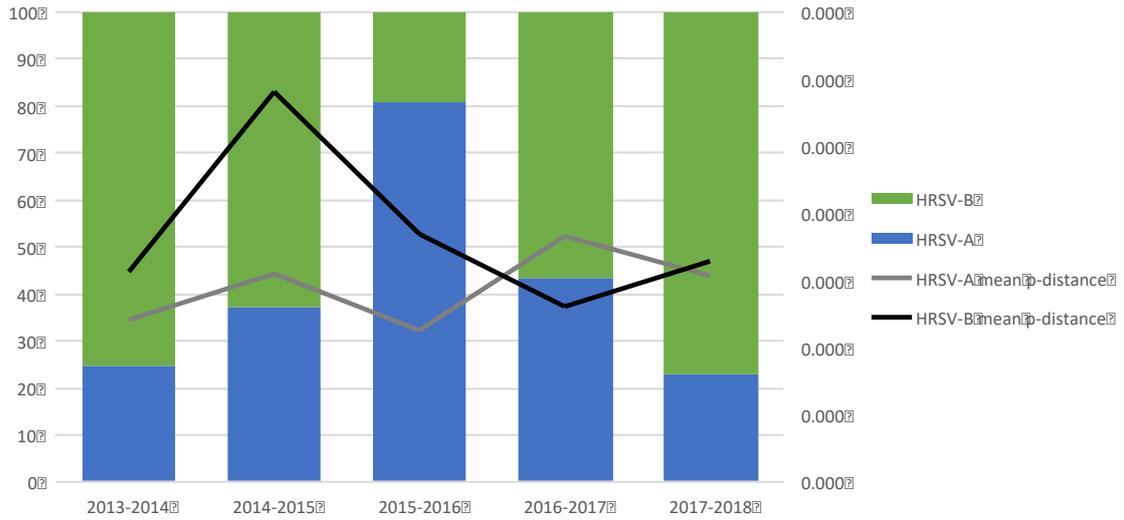
Season	2013-2014	2014-2015	2015-2016	2016-2017	2017-2018	Total
Collected samples	2342	4321	5836	5868	6014	24581
HRSV positive samples	285 (12%)	359 (8%)	488 (8%)	642 (11%)	677 (11%)	2451 (10%)
Coinfections	11 (4%)	15 (4%)	57 (12%)	74 (12%)	105 (16%)	262 (11%)
Sex (M:F)	1:1.4	1:1.5	1:1.3	1:1	1:1.1	1:1.2
Age group						
<2 years	207 (73%)	237 (66%)	271 (51%)	293 (46%)	269 (40%)	1277 (52%)
2-4 years	50 (18%)	63 (17%)	82 (17%)	103 (16%)	97 (14%)	395 (16%)
5-14 years	8 (3%)	13 (4%)	29 (6%)	36 (6%)	38 (5%)	124 (5%)
14-64 years	14 (5%)	29 (8%)	47 (10%)	66 (10%)	79 (12%)	235 (10%)
>65 years	6 (1%)	17 (5%)	59 (12%)	144 (22%)	194 (29%)	420 (17%)



**Figure 1:** Weekly distribution of HRSV-A, HRSV-B groups and influenza (Flu) cases detected from week 40/2013 to week 06/2018 (2013-2018 seasons).



**Figure 2:** Phylogenetic trees of HVR-2 sequences from HRSV-A (A) and HRSV-B (B) strains. The sequences of the present study are marked with points of a given color depending on the season as indicated in the legend. Sequences were previously collapsed to haplotypes, and the number of represented sequences are shown in brackets.

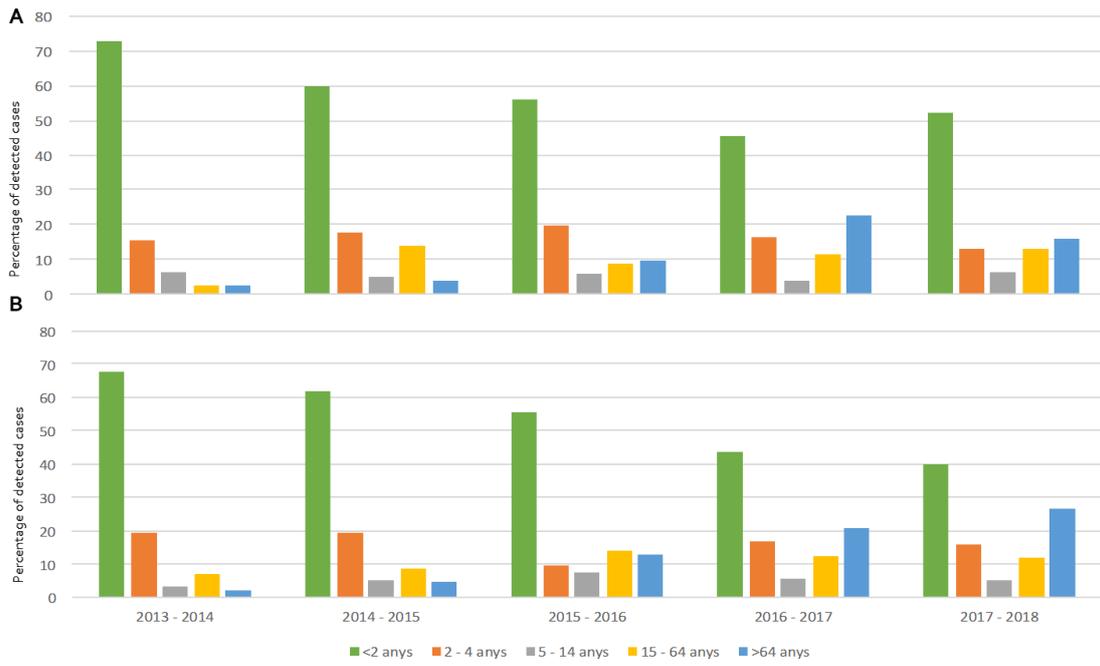


**Figure 3:** HRSV-A and HRSV-B mean distance and variability between seasons. The detection of both HRSV-A and HRSV-B groups is expressed in percentages among the total group's samples (excluding HRSV-A/B co-infections and ungrouped sequences). The mean p-distance is calculated among all strains sequences analyzed each season from both HRSV groups.

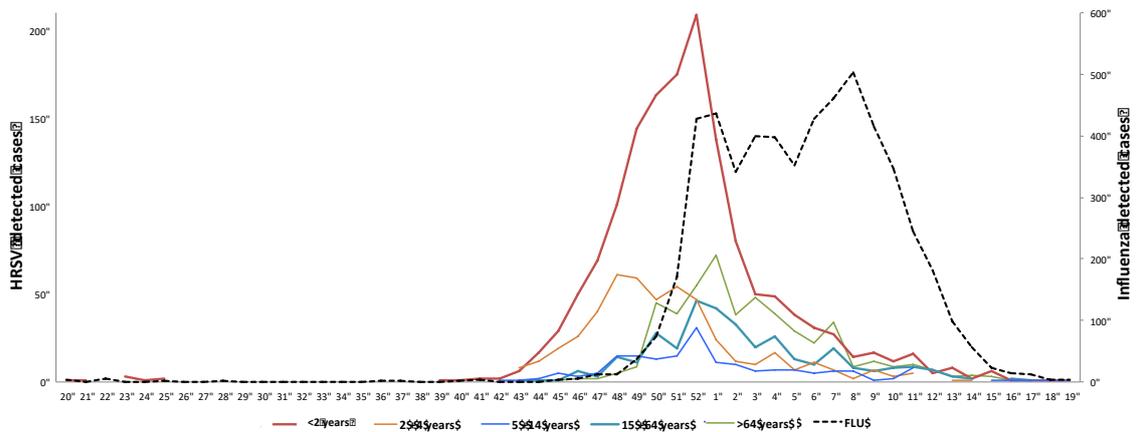
## SUPPLEMENTARY TABLES AND FIGURES:

**Supplementary Table 1:** List of reference HRSV-A and HRSV-B strains included the phylogenetic analyses sorted by collection date.

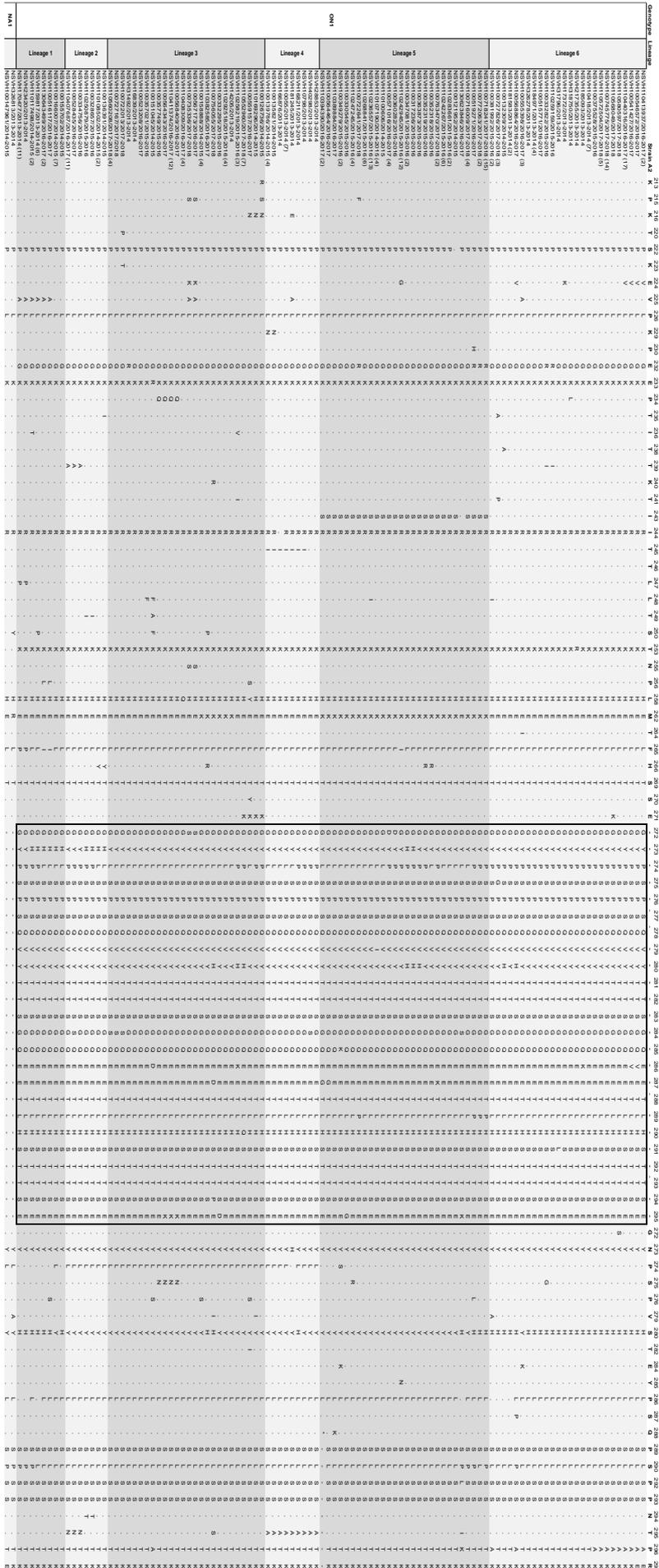
HRSV group	Strain name	Country	Collection date	GeneBank accession no.	
<b>A</b>	1301-118RM	Italy	2013	KC858255	
	1301-125RM	Italy	2013	KC858256	
	16223AN/2012	Italy	2013	JX988443	
	CH28	USA	1998	AF065256	
	CU2011/192	Thailand	2011	KC342434	
	CU2011/208	Thailand	2011	KC342441	
	Fukui/047/2013	Japan	2013	AB978325	
	HD11033	Germany	2012	KJ710405	
	HD11197	Germany	2013	KJ710400	
	HD11256	Germany	2013	KJ710396	
	HD12229	Germany	2013	KJ710375	
	HD12316	Germany	2013	KJ710365	
	NhaTrang/ARI-3599/2012	Vietnam	2012	KX946242	
	NhaTrang/ARI-3634/2012	Vietnam	2012	KX946250	
	NhaTrang/ARI-3657/2012	Vietnam	2012	KX946256	
	NhaTrang/ARI-3818/2012	Vietnam	2012	KX946308	
	NhaTrang/ARI-3915/2012	Vietnam	2012	KX946338	
	ON69-0310A	Canada	2010	JN257697	
	ON-E100/2012.7	Canada	2012	KP321984	
	ON-E106/2011.12	Canada	2011	KP321981	
	ON-H129/2011.12	Canada	2011	KP321982	
	ON-H85/2012.3	Canada	2012	KP321989	
	ON-H96/2012.5	Canada	2012	KP321988	
	ON-H98/2012.1	Canada	2012	KP321986	
	<b>B</b>	2011-50-429_B	France	2011	MF510895
		2011-51-305_B	France	2011	MF510897
		BA/4826/03	Spain	2003	DQ227389
BE/13457/03		Belgium	2003	AY751087	
HD12063		Germany	2012	KJ710407	
HD22106		Germany	2013	KJ710409	
HD22118		Germany	2013	KJ710410	
HD22120		Germany	2013	KJ710411	
HD22271		Germany	2013	KJ710412	
HD24154		Germany	2013	KJ710414	
HD24230		Germany	2013	KJ710416	
HD24250		Germany	2013	KJ710417	
HD24308		Germany	2013	KJ710420	
HZ12-s284		China	2013	KP336540	
HZ13-s38		China	2013	KP336534	
V10-2230104		China	2009	JN968353	
SH09121706BA9		China	2009	KJ658804	
HZ13-s45		China	2013	KP336531	
HZ13-s55		China	2013	KP336536	
NG-064-06		Japan	2006	AB470482	
NG-068-05	Japan	2005	HM459864		
NG-112-06	Japan	2006	HM459872		
PAN2B/2008	Panama	2008	KF300952		
PAN8B/2008	Panama	2008	KX371868		
TEv-13-0101	Japan	2013	KM873486		



**Supplementary figure 1:** HRSV positive samples shown by age group and season for HRSV-A (A) and for HRSV-B (B). Values are shown in percentages



**Supplementary figure 2:** The total positive cases of HRSV (by age group) and influenza viruses per week during the five studied seasons is shown.



**Supplementary Table 1:** Deduced amino acid alignments of the HVR-2 G protein from HRSV-A (A) and HRSV-B (B) groups. Only amino acid positions with a nonsynonymous mutation are shown. Alignments are shown relative to the sequence of the prototype strain A2 (GenBank accession number M11486) and HRSV-B genotype GB1 strain CH10b (GenBank accession number AF065250). In panel A the duplicated 24-amino acid region in HRSV-A virus and in panel B the duplicated 20-amino acid region in HRSV-B viruses are indicated by black rectangles.

# 8. MATERIAL ANEXO

BAG

Lineage 1	Lineage 2	Lineage 3
NH1001	NH1001	NH1001
NH1002	NH1002	NH1002
NH1003	NH1003	NH1003
NH1004	NH1004	NH1004
NH1005	NH1005	NH1005
NH1006	NH1006	NH1006
NH1007	NH1007	NH1007
NH1008	NH1008	NH1008
NH1009	NH1009	NH1009
NH1010	NH1010	NH1010
NH1011	NH1011	NH1011
NH1012	NH1012	NH1012
NH1013	NH1013	NH1013
NH1014	NH1014	NH1014
NH1015	NH1015	NH1015
NH1016	NH1016	NH1016
NH1017	NH1017	NH1017
NH1018	NH1018	NH1018
NH1019	NH1019	NH1019
NH1020	NH1020	NH1020
NH1021	NH1021	NH1021
NH1022	NH1022	NH1022
NH1023	NH1023	NH1023
NH1024	NH1024	NH1024
NH1025	NH1025	NH1025
NH1026	NH1026	NH1026
NH1027	NH1027	NH1027
NH1028	NH1028	NH1028
NH1029	NH1029	NH1029
NH1030	NH1030	NH1030
NH1031	NH1031	NH1031
NH1032	NH1032	NH1032
NH1033	NH1033	NH1033
NH1034	NH1034	NH1034
NH1035	NH1035	NH1035
NH1036	NH1036	NH1036
NH1037	NH1037	NH1037
NH1038	NH1038	NH1038
NH1039	NH1039	NH1039
NH1040	NH1040	NH1040
NH1041	NH1041	NH1041
NH1042	NH1042	NH1042
NH1043	NH1043	NH1043
NH1044	NH1044	NH1044
NH1045	NH1045	NH1045
NH1046	NH1046	NH1046
NH1047	NH1047	NH1047
NH1048	NH1048	NH1048
NH1049	NH1049	NH1049
NH1050	NH1050	NH1050
NH1051	NH1051	NH1051
NH1052	NH1052	NH1052
NH1053	NH1053	NH1053
NH1054	NH1054	NH1054
NH1055	NH1055	NH1055
NH1056	NH1056	NH1056
NH1057	NH1057	NH1057
NH1058	NH1058	NH1058
NH1059	NH1059	NH1059
NH1060	NH1060	NH1060
NH1061	NH1061	NH1061
NH1062	NH1062	NH1062
NH1063	NH1063	NH1063
NH1064	NH1064	NH1064
NH1065	NH1065	NH1065
NH1066	NH1066	NH1066
NH1067	NH1067	NH1067
NH1068	NH1068	NH1068
NH1069	NH1069	NH1069
NH1070	NH1070	NH1070
NH1071	NH1071	NH1071
NH1072	NH1072	NH1072
NH1073	NH1073	NH1073
NH1074	NH1074	NH1074
NH1075	NH1075	NH1075
NH1076	NH1076	NH1076
NH1077	NH1077	NH1077
NH1078	NH1078	NH1078
NH1079	NH1079	NH1079
NH1080	NH1080	NH1080
NH1081	NH1081	NH1081
NH1082	NH1082	NH1082
NH1083	NH1083	NH1083
NH1084	NH1084	NH1084
NH1085	NH1085	NH1085
NH1086	NH1086	NH1086
NH1087	NH1087	NH1087
NH1088	NH1088	NH1088
NH1089	NH1089	NH1089
NH1090	NH1090	NH1090
NH1091	NH1091	NH1091
NH1092	NH1092	NH1092
NH1093	NH1093	NH1093
NH1094	NH1094	NH1094
NH1095	NH1095	NH1095
NH1096	NH1096	NH1096
NH1097	NH1097	NH1097
NH1098	NH1098	NH1098
NH1099	NH1099	NH1099
NH1100	NH1100	NH1100



## **Cuarto trabajo: Estudio de la variabilidad genética de la proteína de fusión y de los patrones de circulación del virus respiratorio sincitial humano en España (2013-2018)**

**Título original:** “Genetic variability of the fusion protein and circulation patterns of the respiratory syncytial virus in Spain (2013-2018) “

**Autores:** Laura Gimferrer<sup>1</sup>, Maria Piñana<sup>1</sup>, Cristina Andrés<sup>1</sup>, Gemma Chavarria-Miró<sup>1</sup>, María Gema Codina<sup>1</sup>, Jordi Saura<sup>1</sup>, María del Carmen Martín<sup>1</sup>, Juliana Esperalba<sup>1</sup>, Francisco Fuentes<sup>1</sup>, Susana Rubio<sup>1</sup>, Tomàs Pumarola<sup>1</sup>, and Andrés Antón<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Virus Respiratorios, Departamento de Microbiología, Hospital Universitario Vall d’Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

**Autor de correspondencia:**

Tomàs Pumarola  
Respiratory Viruses Unit – Microbiology Department  
Hospital Universitari Vall d’Hebron  
Vall d’Hebron Research Institute  
Universitat Autònoma de Barcelona  
Passeig Vall d’Hebron 119-129  
Barcelona, SPAIN  
E-mail: virusrespiratoris@vhebron.net

**RESUMEN:****Antecedentes:**

El VRSH es el principal agente vírico causante de ITRI en la población pediátrica. Hasta ahora, no se han aprobado terapias ni vacunas eficaces contra el VRSH, aunque existen muchos grupos trabajando en su desarrollo. La proteína F es la proteína viral con más capacidad antigénica y por ello, la más estudiada para el desarrollo de una vacuna. Sin embargo, se sabe poco sobre la diversidad genética de la proteína F y su papel en la circulación del grupo o genotipo viral. Por otro lado, aunque se han estudiado mutaciones que pueden otorgar resistencia a los fármacos en desarrollo, no se sabe si estas variantes víricas están circulando en la población. En el presente estudio, se ha estudiado la variabilidad genética de la secuencia de la proteína F para ambos grupos genéticos.

**Métodos:**

Desde octubre del 2013 hasta marzo del 2018, se recogieron muestras respiratorias de pacientes atendidos en el HUVH. Se seleccionó un número representativo de muestras entre los virus caracterizados en los trabajos pertenecientes a distintos genotipos. La amplificación de la proteína F se realizó mediante una RT-RCP y posteriormente se secuenció como se ha descrito en los anteriores trabajos. Las secuencias de nucleótidos se ensamblaron y editaron usando el programa MEGA v.7. Además, se calculó la p-distancia y el ratio dN/dS mediante el programa MEGA v .7.

**Resultados:**

Se analizaron un total de 228 secuencias (105 para VRSH-A y 123 para VRSH-B) de la temporada 2013-2014 a la temporada 2017-2018. Las secuencias de la proteína F mostraron una p-distancia de 0,0063 (VRSH -A) y de 0,0128 (VRSH -B), y un ratio dN/dS de 0,077 (VRSH -A) y 0,165 (VRSH-B). Las regiones con el mayor número de cambios no sinónimos fueron dominios que forman la subunidad F2 (PS, pep27 y HRC) los encontrados en el C-terminal (TM y TC). Los cambios no sinónimos y la frecuencia en que se han encontrado por grupos, genotipos y linajes en las regiones antigénicas se han analizado. No existen diferencias notables en cuanto a la distribución de mutaciones en regiones antigénicas entre los genotipos o linajes del VRSH-A, en comparación con las secuencias de VRSH-B que mostraron una distribución más heterogénea. En efecto, las cepas BA10 y BA13 tienen más mutaciones en el dominio pep27, mientras que las cepas BA9 las tienen en las regiones  $\alpha 2\alpha 3\beta 3\beta 4$  y MPE8.

**Conclusiones:**

El VRSH-B ha mostrado una mayor variabilidad que el VRSH-A. Esta mayor variabilidad, probablemente le haya permitido establecerse como el grupo predominante durante estas temporadas. Aunque según el ratio dN/dS no existe una presión selectiva en ninguno de los grupos, parece que el del VRSH-B es mayor. Además, se han detectado sustituciones no sinónimas en varios dominios de la proteína F, especialmente en los dominios SP, pep27, HRC, TM y CT. Las regiones restantes, al tener un papel estructural importante, probablemente no pueden sufrir cambios sin que repercuta en la funcionalidad de la proteína. Por lo que se refiere a los cambios en regiones antigénica, y dada la distribución heterogénea entre los distintos genotipos del VRSH-B, se podría pensar que, efectivamente estos cambios podrían permitir al virus eludir el estado inmune poblacional, reemplazando así genotipos previos. Además, se han encontrado dos mutaciones (N27D/K y K191R) relacionadas con una mayor capacidad fusogénica de la proteína F en algunas cepas del VRSH-B. Se cree que un aumento en la capacidad de fusión conduce a una mayor carga y excreción vírica, lo que podría estar asociado con una mayor gravedad.

**ARTÍCULO:**

**TITLE:** Genetic variability of the fusion protein and circulation patterns of the respiratory syncytial virus in Spain (2013-2018)

**RUNNING TITLE:** Epidemiological and clinical HRSV surveillance in Catalonia.

**INTRODUCTION:**

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is the major causative viral agent of acute respiratory tract infection in the paediatric population worldwide. It is estimated to cause up to 33 million lower respiratory tract infections in children annually [1, 2]. The adult population is also susceptible to suffer HRSV infection, but its course is much less clinically significant. In fact, reinfections are common throughout life since the immune response after an infection remains incomplete [3].

HRSV is an enveloped, single-stranded, negative-sense RNA virus that belongs to the Orthopneumovirus genus into the Pneumoviridae family [4]. Two antigenic and genetic groups (HRSV-A and HRSV-B), along with several genotypes have been described [5-7]. Both groups and multiple genotypes co-circulate during successive seasons. Although there is usually a major group and genotype in a given season, there is a constant turnover of the predominant viral variants [8]. Antigenic drift within both HRSV groups and this predominant variant turnover may jointly contribute to reinfections in individuals by the evasion of pre-existing immune status [9]. The G and F glycoproteins are the two major envelope proteins responsible for virus attachment and fusion with the targeted cell membrane, respectively, and act as major antigenic components. Accordingly, neutralizing antibodies that specifically bind the antigenic sites on the F and G glycoproteins mainly drive the protective immune response, exercising an important selection pressure on these regions, which is translated into the acquisition of point mutations [10]. Despite this selection pressure, the F glycoprotein presents a low variability in both HRSV groups, probably because of its structural complexity and functionality [11]. In contrast, the G glycoprotein can tolerate a larger number of point mutations becoming the most variable protein among the HRSV. Due to the high degree of conservation and antigenic capacity, the F glycoprotein is the main target for the development of vaccines [12]. Despite the efforts of the scientific community to develop a vaccine, there is currently none licensed vaccines to prevent the disease, yet. Fortunately, the vaccine is expected to be released in the coming years [13]. As of today, palivizumab, a humanized monoclonal antibody that binds the antigenic site A

(antigenic domain II) of the F glycoprotein, is the unique prophylaxis treatment for paediatric patients at high risk for severe HRSV disease [14].

Little is known about the genetic diversity of the F glycoprotein of recent circulating viral variants. The knowledge of the F glycoprotein variability will allow us to better understand the HRSV groups and genotypes circulation patterns, in one hand, and to monitor the existence of viral variants that could be genetic resistant to treatment or vaccines in development, in the other hand. The aim of the present study is to describe the genetic variability of the F glycoprotein of HRSV strains detected in respiratory samples collected in the Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH) of Barcelona (Spain) from 2014 to 2018.

#### **MATERIALS AND METHODS:**

From October 2013 (week 40/2013) to May 2018 (week 20/2018), upper (nasopharyngeal aspirates or swabs) and lower (bronchoalveolar lavages, bronchoaspirates and tracheal aspirates) respiratory tract specimens from patients attended at the HUVH were collected for laboratory-confirmation of respiratory viruses by molecular and antigen detection-based assays [15]. Phylogenetic classification of all laboratory-confirmed HRSV based on the hypervariable region 2 (HVR-2) sequences was carried out as previously described [15]. A representative number of strains belonging to the different genotypes were selected for the analysis of the whole F protein-coding sequence. Whole F gene amplification was performed in three overlapping PCR products by a one-step RT-PCR assay using One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Germany) with primers and under conditions showed in Table 1. PCR products were subsequently purified using Exo-SAP-IT (USB, Affymetrix Inc., California, USA) and sequenced by the ABI Prism Big Dye Terminator cycle sequencing kit v3.1 on the ABI PRISM 3130XL sequencer (Applied Biosystems, California, USA) using M13 primers (Table 1). Overlapping sequences were edited and assembled using MEGA v.7 software [16]. The deduced amino acid composition of the whole F sequence was annotated using MEGA v.7 relative to the homologous A2 (HRSV-A, GeneBank accession number: KJ155694) and B1 (HRSV-B, GeneBank accession number: AF013254.1) strains, respectively. The main regions of interest (A2 strain numbering) were the structural domains (signal peptide, SP, aa 1-22; heptad repeat C, HRC, aa 23-109; peptide 27, pep27, aa 110-136; fusion peptide, FP, aa 137-155; heptad repeat A, HRA, aa 156-214; heptad repeat B, HRB, aa 476-524; transmembrane, TM, aa 525-550; cytoplasmic tail, CT, aa 551-574) [17], pre-fusion antigenic sites (pep27: aa 109-136;  $\phi$ : aa 62-69, aa 196-210; MPE8: aa 44-50, aa 305-310;  $\alpha 2\alpha 3\beta 3\beta 4$ : aa 148-194), post-fusion antigenic sites (I: aa 380-400), and both pre- and post-fusion antigenic sites (II: aa 254-277; IV: aa 422-438) [18-24]. In addition, mean pairwise

distances (p-distance) and the ratio (dN/dS) of non-synonymous per synonymous substitutions for the determination of selective pressure were calculated using MEGA v.7.

## RESULTS:

During the last five seasons, a total of 2,451 laboratory-confirmed HRSV specimens were detected, which represent a 20% of the positively detected respiratory viruses. Based on the HVR-2 sequences (962 HRSV-A and 1,299 HRSV-B), the HRSV-B group was predominant during the studied period except for the 2015-2016 season. Although other genotypes (NA1, BA13 and BA10) were found, ON1 (HRSV-A) and BA9 (HRSV-B) were the major detected genotypes, but distinguishing several lineages. The whole F sequence from 105 HRSV-A and 123 HRSV-B strains were sequenced and characterised. Nucleotide F sequences showed a p-distance of 0,0063 (HRSV-A) and 0,0128 (HRSV-B), as well as a dN/dS ratio of 0,077 (HRSV-A) and 0,165 (HRSV-B). Non-synonymous changes in the different protein domains were found along the deduced amino acid F protein sequence of HRSV-A and HRSV-B strains but showing different frequencies (Figure 1). The highest frequencies of non-synonymous changes were located within the domains SP, pep27 and HRC and the C-terminus (TM and CT). Moreover, in comparison with homologous reference sequences, non-synonymous nucleotide substitutions were found in frequencies higher than the 5% of the total sequences in both pre-fusion and post-fusion antigenic regions (Table 2). No relevant differences were found in the distribution of the amino acid substitutions in the antigenic regions between HRSV-A genotypes or lineages, as well as these changes were found in similar frequencies on the antigenic regions (A122T and K124N in pep27; K66E in  $\phi$ ; V152I in  $\alpha 2\alpha 3\beta 3\beta 4$ ; S276N in II; and V384I in I), as seen in Table 2. However, HRSV-B sequences showed a more heterogeneous distribution of mutations into the antigenic regions (Q113H, L125P and V127A in pep27; F45L and I309N in MPE8; L172Q, S173L and K191R in  $\alpha 2\alpha 3\beta 3\beta 4$ ; S276N in II; K390Q in I; and N426H in IV). In fact, the characterised BA10 and BA13 strains have more mutations in the antigenic pep27 domain, while BA9 strains in the antigenic  $\alpha 2\alpha 3\beta 3\beta 4$  and MPE8 regions. Moreover, no mutations associated with resistance to palivizumab have been found in the antigenic domain II.

## DISCUSSION:

The F glycoprotein is the main target for the development of effective vaccines or prophylactic drugs to prevent the HRSV disease, since is the most conserved envelope protein [10]. Several studies have reported the high variability of the G protein, which is used to carry out molecular

epidemiological studies [15, 25, 26]. Nevertheless, little is known about the genetic F protein diversity of current circulating strains. In the present study, a large number of strains belonging to different genotypes and lineages of both genetic groups that circulated during the last five seasons has been characterised based on the whole F sequence.

The high degree of conservation of the protein F is probably explained by its conformational structure that plays an essential role. Conformational changes may alter in consequence its functionality. Despite this conserved nature, a few amino acid mutations have been described in this study (Figure 1). These changes were mainly found in the SP, pep27, HRC TM and CT domains, as similarly found in previous studies, probably because of its low implication in the structure maintenance [27]. Moreover, among these amino acid changes, a 21% have been found in a high frequency (>95%) among the studied strains. But it is important to note that reference strains used for the annotation, A2 (HRSV-A) and B1 (HRSV-B) strains, were isolated in 1961 and 1991, respectively. Hence, changes observed with frequencies above 95% were likely fixed during this long period of time. However, these changes are still relevant since most of the vaccine strains under development are based on the A2 prototype sequence [28, 29]. Based on the whole F protein sequence, in addition to a higher number of mutations and higher heterogeneity as commented above, HRSV-B strains showed a higher nucleotide intra-group divergence (p-distance) (0,0128 vs. 0,0063) and a higher dN/dS ratio (0,077 vs. 0,165) than HRSV-A, as previously described [30]. These differences between genetic groups to acquire genetic variability might explain the predominance of HRSV-B over HRSV-A in four out of the last five epidemiological seasons.

It has been largely supposed that the genotype turnover through seasons might be explained by the ability to induce reinfections due to either an incomplete host immune response against HRSV or to changes in the antigenic features or in other viral features of circulating HRSV strains [9]. Perhaps, these differences in protein F, or in other non-structural proteins not characterised in the present study, might alter the antigenicity or the viral biological fitness of circulating strains. Moreover, it has been shown that a unique amino acid change in antigenic regions are enough to decrease the antibody affinity [24]. The monitoring of circulating HRSV strains in our geographical area revealed a variable co-circulation of both groups, being ON-1 (HRSV-A) and BA9 (HRSV-B) the most prevalent genotypes. However, in this study no amino acid changes in antigenic regions of the F protein were found between HRSV-A genotype or lineages, whereas HRSV-B sequences showed a more heterogeneous distribution of the amino acid changes between the different genotypes and lineages. Since BA9 is currently the predominant genotype circulating in Catalonia, these differences in the  $\alpha 2\alpha 3\beta 3\beta 4$  and MPE8 antigenic regions might

have allowed this virus to by-pass the population immunity response, thus replacing previous genotypes as BA10 and BA13.

Despite the large number of strains studied, no mutations associated with genetic resistance to palivizumab or any other vaccine or treatment under development have been found. In a previous study realised in our group during the 2013-2014 season [15], the antigenic domain II was only studied, and the K272M mutation was found, which was previously described as a genetic resistant marker [31] to palivizumab. The prevalence of strains carrying amino acid substitutions associated with reduced susceptibility to palivizumab from non-treated patients is considered very low. In other geographical areas the information regarding this genetic resistance to developing drugs or their targeted regions is very limited or unavailable.

In a study conducted by Tapia *et al.* in which the variability of the F protein was analyzed, it was observed that there was a low variability in the post-F antigenic regions (domain I, II and IV), and a high degree of variability in the pre-F antigenic domain  $\emptyset$  between the strains studied [33]. Therefore, they proposed the post-F antigenic domains and discarded the  $\emptyset$  domain as targets for the development of vaccines. However, in our study, the results for these regions have been opposite, since we have found a certain variability between the strains studied for the post-F domains and a high degree of conservation for the  $\emptyset$  domain. These results highlight the importance of maintaining an active surveillance of the F protein since, as we have seen, the degree of conservation in the antigenic regions does not seem to be stable along time.

In summary, despite the conserved nature of the F glycoprotein some amino acid substitutions have been found in antigenic sites, in particular in HRSV-B viruses, which might partially explain the variable circulation of the several genetic groups and genotypes season after season. Virological surveillance should be strengthened worldwide in order to monitor the current circulation of viral variants with known and novel antigenic features, based not only in G but also in F protein-coding sequences, especially in the period when all international efforts are focused on the development of an effective vaccine.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

Funding: This work was partially supported by Plan Nacional de I+D+i 2008-2011 and by Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio Español de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0003); by Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio Español de Economía y Competitividad (grant FIS PI 14/01838); and European Regional Development Fund (ERDF).

Competing interests: The authors declare no conflict of interest.

Ethical approval: Institutional Review Board approval (PR\_AG\_78/2014) was obtained from the Hospital Universitari Vall d'Hebron Clinical Research Ethics Committee.

#### BIBLIOGRAPHY:

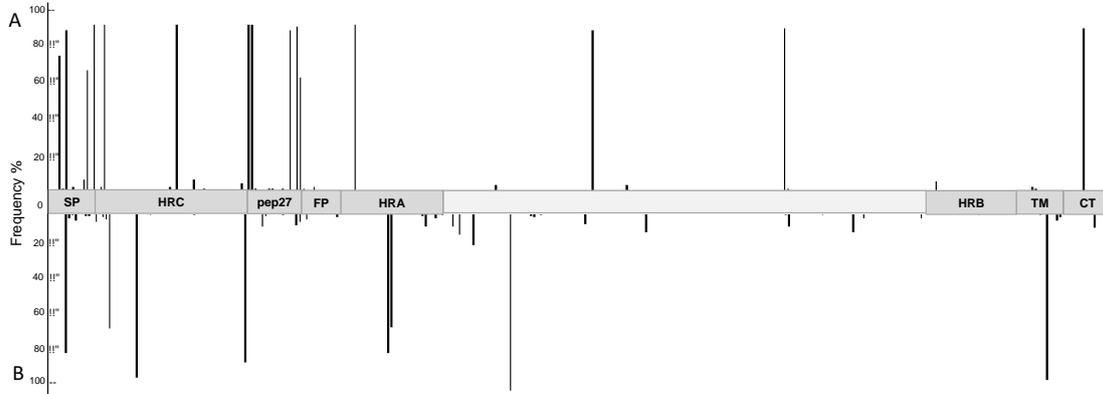
1. Nair, H., et al., Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 2010. 375(9725): p. 1545-55.
2. Mazur, N.I., et al., Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics. *Lancet Respir Med*, 2015. 3(11): p. 888-900.
3. Collins, P.L. and B.S. Graham, Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol*, 2008. 82(5): p. 2040-55.
4. Van Regenmortel, M.H., et al., A proposal to change existing virus species names to non-Latinized binomials. *Arch Virol*, 2010. 155(11): p. 1909-19.
5. Mufson, M.A., et al., Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, 1985. 66 (Pt 10): p. 2111-24.
6. Cui, G., et al., Genetic variation in attachment glycoprotein genes of human respiratory syncytial virus subgroups a and B in children in recent five consecutive years. *PLoS One*, 2013. 8(9): p. e75020.
7. Hirano, E., et al., Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. *Infect Genet Evol*, 2014. 28: p. 183-91.
8. Katzov-Eckert, H., et al., Phylodynamics and dispersal of HRSV entails its permanence in the general population in between yearly outbreaks in children. *PLoS One*, 2012. 7(10): p. e41953.
9. Cane, P.A., Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol*, 2001. 11(2): p. 103-16.
10. Melero, J.A., V. Mas, and J.S. McLellan, Structural, antigenic and immunogenic features of respiratory syncytial virus glycoproteins relevant for vaccine development. *Vaccine*, 2017. 35(3): p. 461-468.
11. Kimura, H., et al., Molecular evolution of the fusion protein (F) gene in human respiratory syncytial virus subgroup B. *Infect Genet Evol*, 2017. 52: p. 1-9.
12. Bates, J.T., et al., Immunogenicity and efficacy of alphavirus-derived replicon vaccines for respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in nonhuman primates. *Vaccine*, 2016. 34(7): p. 950-6.
13. Modjarrad, K., et al., WHO consultation on Respiratory Syncytial Virus Vaccine Development Report from a World Health Organization Meeting held on 23-24 March 2015. *Vaccine*, 2016. 34(2): p. 190-197.
14. Fenton, C., L.J. Scott, and G.L. Plosker, Palivizumab: a review of its use as prophylaxis for serious respiratory syncytial virus infection. *Paediatr Drugs*, 2004. 6(3): p. 177-97.
15. Gimferrer, L., et al., Molecular epidemiology and molecular characterization of respiratory syncytial viruses at a tertiary care university hospital in Catalonia (Spain) during the 2013-2014 season. *J Clin Virol*, 2015. 66: p. 27-32.
16. Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura, MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*, 2016. 33(7): p. 1870-4.
17. Sun, Z., et al., Respiratory syncytial virus entry inhibitors targeting the F protein. *Viruses*, 2013. 5(1): p. 211-25.
18. McLellan, J.S., et al., Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science*, 2013. 340(6136): p. 1113-7.
19. López, J.A., et al., Location of a highly conserved neutralizing epitope in the F glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Virol*, 1990. 64(2): p. 927-30.

20. Arbiza, J., et al., Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, 1992. 73 (Pt 9): p. 2225-34.
21. Corti, D., et al., Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature*, 2013. 501(7467): p. 439-43.
22. Gilman, M.S., et al., Characterization of a Prefusion-Specific Antibody That Recognizes a Quaternary, Cleavage-Dependent Epitope on the RSV Fusion Glycoprotein. *PLoS Pathog*, 2015. 11(7): p. e1005035.
23. Fuentes, S., et al., Antigenic Fingerprinting following Primary RSV Infection in Young Children Identifies Novel Antigenic Sites and Reveals Unlinked Evolution of Human Antibody Repertoires to Fusion and Attachment Glycoproteins. *PLoS Pathog*, 2016. 12(4): p. e1005554.
24. López, J.A., et al., Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J Virol*, 1998. 72(8): p. 6922-8.
25. Aamir, U.B., et al., Molecular characterization of circulating respiratory syncytial virus (RSV) genotypes in Gilgit Baltistan Province of Pakistan during 2011-2012 winter season. *PLoS One*, 2013. 8(9): p. e74018.
26. Trento, A., et al., Ten years of global evolution of the human respiratory syncytial virus BA genotype with a 60-nucleotide duplication in the G protein gene. *J Virol*, 2010. 84(15): p. 7500-12.
27. Kim, Y.K., E.H. Choi, and H.J. Lee, Genetic variability of the fusion protein and circulation patterns of genotypes of the respiratory syncytial virus. *J Med Virol*, 2007. 79(6): p. 820-8.
28. Piedra, P.A., et al., Immunogenicity of a new purified fusion protein vaccine to respiratory syncytial virus: a multi-center trial in children with cystic fibrosis. *Vaccine*, 2003. 21(19-20): p. 2448-60.
29. Smith, G., et al., Respiratory syncytial virus fusion glycoprotein expressed in insect cells form protein nanoparticles that induce protective immunity in cotton rats. *PLoS One*, 2012. 7(11): p. e50852.
30. Chi, H., et al., Molecular epidemiology and phylodynamics of the human respiratory syncytial virus fusion protein in northern Taiwan. *PLoS One*, 2013. 8(5): p. e64012.
31. Bates, J.T., et al., Escape from neutralization by the respiratory syncytial virus-specific neutralizing monoclonal antibody palivizumab is driven by changes in on-rate of binding to the fusion protein. *Virology*, 2014. 454-455: p. 139-44.
32. Pongrácz, J., E. Olveti, and B. Csaba, Antigen-specific lymphocyte clone elimination and reappearance in guinea pigs using 125I-labelled horse serum albumin. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1988. 87(3): p. 260-2.
33. Tapia, L.I., et al., Gene sequence variability of the three surface proteins of human respiratory syncytial virus (HRSV) in Texas. *PLoS One*, 2014. 9(3): p. e90786.

## FIGURES AND TABLES:

**Table 1: Primers and specific conditions used for PCR amplification of complete F protein-coding gene. The M13 primer sites used for the sequencing are market in bold**

HRSV group	Fragment	Primers	PCR conditions	Position (nt)	Length (bp)
A	1	PROTFA_F1: <b>TGTAAAACGACGGCCAGT</b> AYGACCAAATCAAACAGAATC	50 °C×30'–95 °C×15'– 45c:(95 °C×15'–53 °C×20'–72 °C×1'30'')–72 °C×10'	5576-5596	694
		PROTFA_R1: <b>CAGGAAACAGCTATG</b> ACCTGTTGATATGCTGCAGC		6253-6270	
	2	PROTFA_F2: <b>TGTAAAACGACGGCCA</b> GTCAACAAGGCTGTAGTC		6140-6158	899
		PROTFA_R2: <b>CAGGAAACAGCTATG</b> ACCGGTTCACTTTACATAGAGAC		7018-7039	
	3	PROTFA_F3: <b>TGTAAAACGACGGCCAGT</b> TACATCTCTAGGAGCYATTG		6843-6861	741
		PROTFA_R3: <b>CAGGAAACAGCTATG</b> ACCCAAGGATTCCTCTGTGACA		7566-7584	
B	1	PROTFB_F1: <b>TGTAAAACGACGGCCAGT</b> GTGATCCYTCGAAGCAAGAA	50 °C×30'–95 °C×15'– 45c:(95 °C×15'–53 °C×20'–72 °C×1'30'')–72 °C×10'	5625-5643	717
		PROTFB_R1: <b>CAGGAAACAGCTATG</b> ACCGCTGGAATTCTATACTGTTTC		6321-6342	
	2	PROTFB_F2: <b>TGTAAAACGACGGCCAGT</b> GCTGTAGTCACTATCAAATG		6198-6219	828
		PROTFB_R2: <b>CAGGAAACAGCTATG</b> ACCCAAGGATTCCTCTGTGACA		7005-7026	
	3	PROTFB_F3: <b>TGTAAAACGACGGCCA</b> GTCTATAGTGTATGCTATGGT		6903-6923	757
		PROTFB_R3: <b>CAGGAAACAGCTATG</b> ACCGACCTCTAATCTCAAATTTGC		7640-7660	



**Figure 1:** Frequency (%) of HRSV-A (A) and HRSV-B (B) variants carrying non-synonymous substitutions along the different F protein domains (SP: signal peptide, HRC: heptad-repeat C, pep27: 27-mer fragment, FP: fusion peptide, HRA: heptad-repeat A, HRB: heptad-repeat B, TM: transmembrane, CT: cytoplasm tail). Stripes showed the frequency and position of the mutations, in black for adult strains and red for pediatric strains.

**Table 2:** Frequency (%) of amino acid changes found in the antigenic regions of the F protein for both (HRSV-A and HRSV-B) groups, genotypes and lineages.

Group	Genotype	Lineage	Number of sequences	Antigenic sites																	
				p27 (109-136 aa)					σ (62-69, 196-210 aa)		MPER (44-50, 305-310 aa)		σ2σ3β4 (148-194 aa)				II (254-277 aa)		I (389-400 aa)		IV (422-438 aa)
				Q113H	A122T	K124N	L125P	V127A	K66E	F45L	I309N	V152I	L172Q	S173L	K191R	N276S	S276N	V384I	K390Q	N426H	
HRSV-A	ON1	6	18	-	84%	100%	-	-	100%	-	-	100%	-	-	-	89%	-	89%	-	-	
		5	42	-	100%	100%	-	-	100%	-	-	100%	-	-	-	95%	-	95%	-	-	
		4	4	-	100%	100%	-	-	100%	-	-	100%	-	-	-	100%	-	100%	-	-	
		3	17	-	100%	100%	-	-	100%	-	-	100%	-	-	-	100%	-	100%	-	-	
		2	14	-	100%	100%	-	-	100%	-	-	100%	-	-	-	100%	-	100%	-	-	
HRSV-B	NA1	1	9	-	78%	100%	-	-	100%	-	-	100%	-	-	-	100%	-	100%	-	-	
		1	1	-	100%	-	-	-	100%	-	-	100%	-	-	-	100%	-	100%	-	-	
		3	83	-	-	-	-	-	-	-	-	100%	-	-	-	100%	-	100%	-	-	
HRSV-B	BA9	2	18	1%	-	-	5%	-	-	100%	12%	-	95%	94%	12%	-	9%	-	8%	11%	
		1	3	-	-	-	-	-	-	100%	33%	-	-	-	-	-	-	-	-	12%	11%
		11	11	60%	-	-	10%	10%	-	-	90%	-	-	30%	10%	-	-	-	-	9%	27%
HRSV-B	BA10	6	6	33%	-	-	56%	44%	-	33%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11%	

### Material suplementario de primer trabajo (ver apartado 4.1):

**Table 2:** List of reference HRSV-A and HRSV-B strains included the phylogenetic analyses sorted by collection date.

HRSV group	Strain	Country	Collection date	Accession no.
<b>A</b>	NZA_89_03	New Zealand	1989	DQ171789
	RSB89-6190	UK	1990	X73352
	MON 1 90	Uruguay	1990	Z33494
	AL19452-2	USA	1990	AF233901
	NY20	USA	1990	AF233918
	CN1973	USA	1990	AF233904
	MO02	USA	1990	AF233910
	NZA_91_10	New Zealand	1991	DQ171790
	CH28	USA	1998	AF065256
	AL19376-1	USA	2000	AF233900
	CN2395	USA	2000	AF233905
	MO13	USA	2000	AF233911
	AL19471-5	USA	2000	AF233902
	NY108	USA	2000	AF233917
	SA97D669	South Africa	2001	AF348809
	NG-082-05	Japan	2005	AB470479
	NG-048-06	Japan	2006	AB603444
	ON69-0310A	Canada	2010	JN257697
	RSVA/GN435/11	Korea	2011	JX627336
	ON138-0111A	Canada	2011	JN257694
	RSV/Yokohama.JPN/P6562/2012	Japan	2012	AB761609
	RSV/PUNE/NIV1210989/12/A	India	2012	KF246638
	RSV/PUNE/NIV1212334/12/A	India	2012	KF246641
	<b>B</b>	Mon/15/90	Spain	1990
WV15291		USA	1991	M73542
CH10b		USA	1998	AF065250
BA/3018/98		Argentina	1998	AY672691
BE/13417/99		Belgium	1999	AY751131
MO35		USA	2000	AF233929
TX69208		USA	2000	AF233933
MO30		USA	2000	AF233928
BE/11508/01		Belgium	2001	AY751116
SA99V429		South Africa	2001	AF348813
Mon/6/01		Uruguay	2001	AY488803
SA0025		South Africa	2001	AF348825
SA98D1656		South Africa	2001	AF348826
SA98D1656		South Africa	2001	AF348821
SA99V1325		South Africa	2001	AF348822
NG-046-02		Japan	2002	AB603483
BA/495/02		Spain	2002	DQ227370
BA/1004/02		Spain	2002	DQ227376
BA/770/02		Spain	2002	DQ227373
NG-016-02		Japan	2002	AB175822
BE/13457/03		Belgium	2003	AY751087
BE/46/03		Belgium	2003	AY751110
NG-006-03		Japan	2003	AB175820
BE/1066/03		Belgium	2003	AY751123
BA/4826/03		Spain	2003	DQ227389
BA/100/04		Spain	2004	DQ227395
BA/524/04		Spain	2004	DQ227396
BA/493/04		Spain	2004	DQ227407
NG-068-05		Japan	2005	HM459864
H5598		China	2005	DQ270232
H5601		China	2005	DQ270233
NG-022-06		Japan	2006	HM459876
NG-064-06	Japan	2006	AB470482	

## 8. MATERIAL ANEXO

NG-112-06	Japan	2006	HM459872
1946/BKK/07	Thailand	2007	FJ490354
1936/BKK/07	Thailand	2007	FJ490355
BJ/F9279	China	2008	KC297483
B/Korea/CB616/09	Korea	2009	HQ699300
B/Korea/CB757/09	Korea	2009	HQ699304
Cam2009-5149	Cambodia	2009	JN119996
RSV/PUNE/NIV0931702/09/B	India	2009	KF246586
am2009-1013	Cambodia	2009	JN119979
Cam2009-2145	Cambodia	2009	JN119987

---



