

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**INCIDENCIA DE LAS INFECCIONES
RESPIRATORIAS VIRALES Y
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL
VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO**

**Master en Biotecnología del Medio Ambiente y la Salud por la
Universidad de Oviedo**

Miriam Gómez Novo

Julio 2015

JOSE ANTONIO BOGA RIVEIRO, investigador contratado del SNS adscrito al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Central de Asturias, y **FRANCISCO PARRA FERNÁNDEZ**, catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de fin de master ha sido realizado por **Miriam Gómez Novo** bajo su dirección en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Central de Asturias.

Para que surta los efectos oportunos, en Oviedo a 15 de Julio de 2015.



José Antonio Boga Riveiro

Francisco Parra Fernández

RESUMEN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son responsables de la mortalidad en todo el mundo y los virus son los principales agentes etiológicos que las causan. En la categoría de virus respiratorio (VR) se incluyen los Virus de la Gripe A y B, el Virus Sincitial Respiratorio, el Virus de Parainfluenza, Adenovirus, Coronavirus y Picornavirus (Rhinovirus y Enterovirus). En este estudio, analizamos la incidencia de los virus respiratorios en Asturias y, nos centramos en el Virus Sincitial Respiratorio y sus genotipos circulantes por ser la mayor causa de hospitalización por infección del tracto respiratorio en niños pequeños. La caracterización antigénica de la glicoproteína F de 104 muestras aisladas muestra que el subgrupo A es predominante, y que, durante el período analizado, el genotipo ON1, el más recientemente descrito, ya circula por nuestra región.

SUMMARY

Acute respiratory infections (ARI) are responsible for mortality worldwide and viruses are the main etiologic agents that cause them. In the category of respiratory virus (VR) include the Influenza A and B, Respiratory Syncytial Virus, Parainfluenza virus, Adenovirus, Coronavirus and Picornavirus (Rhinovirus and Enterovirus). In this study, we analyzed the incidence of respiratory viruses in Asturias and we focus on the circulation of Respiratory Syncytial Virus and its genotypes for being a main cause of hospitalization for respiratory tract infection in young children. Antigenic characterization of glycoprotein F of 104 isolates showed that the subgroup A is predominant, and that during the period analyzed, the genotype ON1, the more recently described, flowing through our region.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible sin el apoyo, la implicación y confianza del Dr. Jose Antonio Boga. Gracias por tu paciencia, dedicación, motivación y criterio. Has hecho fácil lo difícil. Ha sido un privilegio poder contar con tu guía y ayuda.

De igual forma me gustaría agradecer todo su esfuerzo a las personas que me sumergieron en el mundo de la Virología, transmitiéndome parte de sus conocimientos y animándome en cada momento a continuar. Por todo ello, muchas gracias al Dr. Santiago Melón, a la Dra. María de Oña y a la Dra. Marta Elena Álvarez-Argüelles.

Gracias a todo el personal técnico del Laboratorio, por estar siempre pendientes de mí y responder con una sonrisa y mucha paciencia a mis interminables dudas.

A Lía, Amanda, Samuel, Chiara, Luis, Ana Belén por hacer estos años inolvidables.

Juan, Susana, Carlos, Sandra, Bego, Mauri, Maite, Álvaro, Joni, no hay folios para escribir todo lo que os tengo que agradecer. Nunca encontraré la forma de daros las gracias por vuestro constante apoyo, confianza, y enorme paciencia, por ser los responsables de que quiera volver y los únicos capaces de aguantarme tantas horas. Éste ha sido un proyecto a nivel personal más que profesional y debo decir que ha sido una experiencia extraordinaria. Gracias por haberme acompañado.

A Paula, por ser amiga, compañera de piso, madre y hermana a la vez.

A Laura, Lara y Sandra por su apoyo incondicional desde tiempos inmemorables.

A Luisma, Patrick, Borja, Diego... porque creísteis en mí desde el minuto cero.

A mi familia, en especial a mi madre, a mi hermana y a mi cuñado, por vosotros llegué aquí, a vosotros os debo todo. Esto es por vosotros, esto es para vosotros.

A mi abuelo, porque sé que estará orgulloso de mí allá donde esté.

A Mario, por todo.

A las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo.

A todos ¡GRACIAS!

**“Las tristezas no se quedan para siempre
cuando caminamos en dirección a lo que siempre deseamos”
Paulo Coelho**

ABREVIATURAS

ADENO: Adenovirus

CORONA: Coronavirus

ENTERO: Enterovirus

Ex. Nasal: exudado nasal

Ex. Faríngeo: exudado faríngeo

Ex. Nasofaríngeo: exudado nasofaríngeo

IA: virus de la gripe tipo A

IB: virus de la gripe tipo B

IRVA: infección respiratoria de vías respiratorias altas

IRVB: infección respiratoria de vías respiratorias bajas

PARA: virus Parainfluenza

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

rpm: revoluciones por minuto

S. F.: síndrome febril

Taq polimerasa: polimerasa termorresistente

VSR: virus sincitial respiratorio

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Las infecciones respiratorias agudas (IRA).	2
1.2 Coinfecciones.	5
1.3 Virus Sincitial Respiratorio (VSR).	5
1.3.1 Patogenia y patología.	6
1.3.2 Tratamiento, prevención, control y vacunas.	7
1.3.3 Epidemiología molecular.	9
1.3.4 Caracterización Viral.	10
II. OBJETIVOS	13
III. PACIENTES, MUESTRAS Y MÉTODOS	15
3.1 Pacientes y muestras.	16
3.2 Métodos.	17
3.2.1 Diagnóstico viral.	17
3.2.1.1 Detección de antígeno en la muestra por Inmunofluorescencia.	17
3.2.1.2 Cultivo rápido en “Shell-vial” y convencional.	18
3.2.1.3 Diagnóstico basado en técnicas de amplificación genómica.	18
3.2.2 Caracterización del VSR.	20
3.2.2.1 Identificación del subgrupo de VSR (A y B).	20
3.2.2.2 Caracterización de genotipos de VSR A.	22
3.2.3 Análisis Estadístico.	23
IV. RESULTADOS	24
4.1 Epidemiología de los virus respiratorios en Asturias.	25
4.1.1 Análisis en función de la edad.	25
4.1.2 Análisis en función del sexo.	25
4.1.3 Análisis en función del lugar de procedencia.	26
4.1.4 Etiología viral.	27
4.1.5 Estacionalidad viral.	30
4.1.6 Infecciones mixtas.	32
4.1.7 Importancia del VSR en infecciones respiratorias.	34
4.1.7.1 Caracterización genotípica de cepas VSR A	38
V. DISCUSIÓN	39
VI. CONCLUSIONES	46
VII. BIBLIOGRAFÍA	48

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Representación esquemática de la estructura del VSR.	11
FIGURA 2. Mapa genético del VSR.	12
FIGURA 3. Micrografía en la que se observan células procedentes de un exudado faríngeo infectadas por VSR marcadas con un anticuerpo conjugado con fluoresceína.	17
FIGURA 4. Micrografía en la que se observan células en cultivo tipo “Shell-vial” infectadas por VSR marcadas con un anticuerpo conjugado con fluoresceína.	18
FIGURA 5. Perfiles térmicos usados en la RT-PCR y en la PCR de la RT-PCR anidada.	21
FIGURA 6. Influencia de la edad en la detección de virus respiratorios.	25
FIGURA 7. Influencia del sexo en la detección de virus respiratorios.	26
FIGURA 8. Influencia del área en la detección de virus respiratorios.	27
FIGURA 9. Porcentaje de pacientes con virus respiratorios.	28
FIGURA 10. Virus detectados en cada división de edad.	29
FIGURA 11. Clínica presentada en cada uno de los virus respiratorios.	30
FIGURA 12. Porcentaje de virus respiratorios detectados en cada una de las semanas en las que se llevó a cabo el estudio.	30
FIGURA 13. Estacionalidad de cada uno de los virus respiratorios.	31
FIGURA 14. Distribución de las infecciones mixtas en cada división de edad.	32
FIGURA 15. Virus encontrados en infecciones mixtas o como único patógeno.	33
FIGURA 16. Distribución de los subgrupos del VSR en las muestras positivas.	35
FIGURA 17. Distribución de los subgrupos del VSR en función del sexo.	35
FIGURA 18. Distribución de los subgrupos del VSR en función de la edad.	36
FIGURA 19. Clínica presentada por los pacientes según el subgrupo del VSR.	37
FIGURA 20. Estacionalidad de cada uno de los subgrupos del VSR.	37
FIGURA 21. Fragmento de una secuencia de VSR A.	38
FIGURA 22. Análisis filogenético de la cepa VSRA/Ast/2015 y de aislados representativos de diferentes genotipos de VSRA.	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales virus respiratorios, características y cuadros clínicos más frecuentes.	4
Tabla 2. Clínica presentada por los pacientes procedentes de las distintas áreas.	16
Tabla 3. Distribución de los pacientes según la edad y el sexo.	17
Tabla 4. Cebadores y sondas utilizados en la detección de virus respiratorios.	19
Tabla 5. Cebadores utilizados para la identificación de tipo de VSR mediante RT-PCR anidada.	20
Tabla 6. Cebadores y sonda para la identificación de tipo de VSR mediante PCR-RT.	21
Tabla 7. : Relación de cebadores utilizados para genotipar VSR A.	22
Tabla 8. Detección viral según el área.	26
Tabla 9. Virus detectados en cada división de edad.	28
Tabla 10. Virus detectados según la clínica.	29
Tabla 11. Distribución de las infecciones mixtas en cada división de edad.	32
Tabla 12. Virus encontrados en las infecciones mixtas y únicas.	33
Tabla 13. Combinaciones de virus más frecuentes en las infecciones mixtas.	34
Tabla 14. Distribución de los subgrupos del VSR en función del sexo.	35
Tabla 15. Distribución de los subgrupos del VSR en función de la edad.	36
Tabla 16. Clínica presentada por los pacientes según el subgrupo del VSR.	36

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Las infecciones respiratorias agudas (IRA).

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son la primera causa de morbilidad y una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo, especialmente, entre los 2 y 6 meses de vida.¹

Los virus son los principales agentes etiológicos de las IRAs, tanto en la patología adulta como en la infantil, responsables del 50 al 90% de estas infecciones.²

Una de las principales características clínicas de las infecciones respiratorias agudas es la inespecificidad de los síntomas: un mismo cuadro clínico puede estar causado por distintos agentes virales, y un virus concreto puede producir diferentes cuadros clínicos. Además, las IRA de etiología viral suelen presentar algunas características comunes, como son la existencia de un periodo de incubación relativamente corto, o mecanismos similares de transmisión. También es muy variable la gravedad de los síntomas de una IRA, que puede determinar la necesidad de atención médica primaria, en centros de salud y en otras ocasiones, de atención médica hospitalaria.

A pesar de encontrarse a lo largo de todo el año, las infecciones respiratorias agudas de origen viral tienden a tener una estacionalidad, presentándose principalmente en las épocas frías, en forma de brotes epidémicos de duración e intensidad variable³.

Las infecciones virales respiratorias son más frecuentes y graves en las edades más tempranas de la vida. Cuanto menor es la edad del paciente, mayor es la inmadurez del sistema inmunitario y mayor es la posibilidad de tener una primoinfección, (que tiende a ser más grave que la reinfección por el mismo virus). Los niños pueden presentar entre seis y ocho infecciones respiratorias al año, muchas de las cuales, sobre todo las que ocurren en el periodo de lactante, afectan a las vías respiratorias inferiores⁴.

El modo de adquisición de las infecciones virales respiratorias es similar para la mayoría de los virus. La fuente de contagio, en general es por vía directa, a través de secreciones respiratorias de un individuo enfermo o portador de una infección subclínica. Una vez que el virus alcanza la mucosa respiratoria, atraviesa las barreras defensivas locales (mucus, transporte ciliar, tos) se adsorbe y penetra en las células del

tejido superficial respiratorio, invade la submucosa y compromete los ganglios regionales. La infección se propaga por vecindad hacia las regiones colindantes, sin necesidad de paso a través de la sangre. El sistema diana es el aparato respiratorio. Esto explica su corto periodo de incubación (de 1 a 3 días) y su alta contagiosidad, ya que el virus se multiplica activamente en una puerta de entrada abierta hacia el exterior⁵.

Aunque no existe un consenso en cuanto al sitio anatómico que separa las infecciones respiratorias en vías altas y bajas, se acepta como infección respiratoria de vías altas a toda aquella patología que afecta al aparato respiratorio de laringe proximal (incluyendo región subglótica). Sin embargo, se debe de tener presente que muchas patologías respiratorias afectan tanto al tracto respiratorio superior como inferior en forma concomitante o secuencial. Dentro del grupo de las infecciones respiratorias de vías altas se pueden mencionar la otitis media aguda, sinusitis, resfriado común, faringoamigdalitis, faringitis, adenoiditis, laringitis obstructiva y epiglotitis. La laringotraqueobronquitis, traqueitis, bronquiolitis y neumonía adquirida en la comunidad son los cuadros más representativos de vías respiratorias bajas.

En la categoría de virus respiratorio (VR) se incluyen los Virus de la Gripe A y B (IA, IB); el Virus Sincitial Respiratorio (VSR), que es uno de los patógenos más importantes que causa infección en niños pequeños⁶ y, además, se ha demostrado que produce infecciones respiratorias graves en ancianos y pacientes inmunocomprometidos^{7, 8}; el Virus de Parainfluenza (VPI) tipos 1, 2 y 3; Adenovirus (ADV); Coronavirus (CoV); Picornavirus (Rhinovirus (RhV) y Enterovirus (EnV)). En la **Tabla 1** se describen las características de los virus respiratorios detectados y los principales cuadros clínicos que se asocian.

TABLA 1: Principales virus respiratorios, características y cuadros clínicos más frecuentes.

VIRUS	CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	CUADROS CLÍNICOS
Virus Sincitial Respiratorio (VSR)	Virus RNA Familia <i>Paramyxoviridae</i> Subfamilia <i>Pneumovirinae</i> Grupos A y B	Estacionalidad: noviembre a enero Edad: lactantes pequeños Bronquiolitis, sibilancias recurrentes, neumonías
Rhinovirus	Virus RNA Familia <i>Picornaviridae</i> Grupos A, B y C	Estacionalidad: septiembre y abril-mayo Responsable del 50% de las IRA a todas las edades. Lactantes: sibilancias
Adenovirus	Virus DNA Familia <i>Adenoviridae</i> 55 serotipos	Estacionalidad: invierno, primavera y comienzo del verano Edad: todas. Cuadros clínicos variados que afectan a múltiples órganos Infecciones respiratorias: fiebre faringoconjuntival, bronquiolitis, neumonías, síndromes febriles
Gripe	Virus RNA Familia <i>Orthomyxoviridae</i> Tipos A, B y C	Estacionalidad: invierno Edad: todas especialmente < 5 años Síndromes febriles. Gripe Lactantes: síndromes febriles, sibilancias recurrentes, bronquiolitis, neumonías. Convulsiones febriles
Parainfluenza	Virus RNA Familia <i>Paramyxoviridae</i> Género <i>Paramyxovirus</i> : tipos 1 y 3	Edad: < de 5 años Bronquiolitis y neumonía en lactantes
Metapneumovirus	Virus RNA Familia <i>Paramyxoviridae</i> Subfamilia <i>Pneumovirinae</i> Grupos A y B	Estacionalidad: febrero a abril Edad: 50% menores de 12 meses(en general < 2 años) Bronquiolitis, sibilancias Recurrentes
Coronavirus	Virus RNA Familia <i>Coronaviridae</i>	Responsables de un 15-30% de las IRA, Finales de invierno, principios de primavera Bronquiolitis, neumonía

1.2 Coinfecciones.

Un hallazgo bastante común en las infecciones víricas respiratorias es la relativa frecuencia con la que se observan las denominadas infecciones dobles, coinfecciones o infecciones por múltiples virus. La detección de dos o más agentes víricos en un mismo proceso respiratorio puede ser interpretada como infección doble (múltiple) de las células del tracto respiratorio, sin embargo, también debería contemplarse la posibilidad de que sólo uno de los virus sea el verdadero causante del síndrome y, el segundo (o el resto), refleje una colonización asintomática del tracto respiratorio. Por tanto, sería más preciso hablar de codetección o detección múltiple de virus en una misma muestra respiratoria. Las infecciones respiratorias atribuidas a más de un agente vírico no es un fenómeno que haya surgido con la generalización de las técnicas moleculares en los laboratorios de microbiología diagnóstica.

Una opción para tratar de determinar la verdadera implicación de un virus en la patología respiratoria podría ser la cuantificación del mismo, no obstante, debemos de ser conscientes de los problemas que plantea este tipo de muestras, muy variables en lo que respecta a localización, cantidad de muestra obtenida y homogeneidad de las mismas.

1.3 Virus Sincitial Respiratorio (VSR).

El Virus Sincitial Respiratorio (VSR) fue aislado por primera vez en 1955 a partir de las secreciones respiratorias de chimpancés que presentaban un cuadro respiratorio con estornudos, tos y producción de moco. Los investigadores cultivaron esas secreciones nasales, llamándolo agente de la coriza del Chimpancé (ACC), y lo relacionaron con la infección del tracto respiratorio alto que presentaban esos simios.⁹ Poco tiempo después, en 1956, Chanock y sus colaboradores aislaron un virus semejante al ACC, a partir de un lactante con bronconeumonía, al cual llamaron "agente Long" y otro, de un lactante con bronquiolitis, al cual llamaron "Snyder".

Cuando se los caracterizó serológicamente y fenotípicamente ambos virus parecían ser el mismo ACC y, debido a esto, se lo renombró como Virus Sincitial Respiratorio.¹⁰

El VSR es el responsable de la muerte de aproximadamente cinco millones de personas anualmente en todo el mundo, y, la OMS, lo considera un patógeno de interés para el desarrollo de nuevas vacunas, al no existir ningún tratamiento antiviral específico.¹¹

1.3.1 Patogenia y patología

El VSR es contagioso y se transmite por contacto con secreciones respiratorias, principalmente por contaminación de las manos y la subsiguiente inoculación de la mucosa nasal y conjuntiva. El período de incubación es de 4 a 5 días y la excreción viral puede persistir desde una hasta tres semanas.¹²

La infección se inicia por multiplicación del virus en las células epiteliales del tracto respiratorio superior y se propaga hacia el tracto respiratorio inferior, probablemente a través de la aspiración de secreciones infectadas, aunque puede extenderse de célula a célula mediante la fusión de sus membranas, provocando infecciones respiratorias agudas (IRA), bronquiolitis y neumonía.

Las infecciones causadas por las variantes del subgrupo A están asociadas a cuadros clínicos más severos y a la producción de cargas virales significativamente más altas que las causadas por el subgrupo B.¹³

Aunque el VSR es neumotrópico, este no está estrictamente limitado al tracto respiratorio. En los niños o adultos inmunocomprometidos, el virus puede diseminarse a otros órganos tales como riñón, hígado y miocardio. Sin embargo, la viremia no se ha descrito durante la infección en lactantes y niños saludables.¹⁴

La fase inicial de la enfermedad comienza con rinitis, acompañada en algunos casos con disminución del apetito. La tos puede aparecer simultáneamente o durante

los tres primeros días de inicio de los síntomas, también puede haber fiebre ≤ 38 °C y coriza.

Después que la tos se ha desarrollado, se puede comenzar con sibilancia, si la enfermedad es leve, y, en los casos en que la enfermedad es severa, con disnea, y puede ocurrir una retracción intercostal y subcostal. La taquipnea severa es común, incluso en ausencia de una cianosis visible. En etapas avanzadas de la enfermedad, donde la hipoxia es extrema, puede ocurrir fallo respiratorio.¹⁵

El cuadro clínico de las infecciones por el VSR varía con la edad del paciente. Este virus afecta fundamentalmente a niños entre seis semanas y nueve meses de edad.¹⁶ Son particularmente peligrosas en niños con displasia broncopulmonar, enfermedades cardíacas congénitas, prematuros, adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos.¹⁷ En los neonatos la mayoría de las infecciones por el VSR producen solo síntomas respiratorios superiores, probablemente reflejando el efecto protector de los anticuerpos maternos contra la infección del tracto respiratorio bajo (IRB). La bronquiolitis es poco frecuente y la infección severa se caracteriza por letargo, irritabilidad, fiebre inestable y no por signos respiratorios específicos. En niños mayores de un año y adultos (en su mayor parte corresponden a reinfecciones), los cuadros suelen ser leves y en algunos casos, asintomáticos.¹⁸

1.3.2 Tratamiento, prevención, control y vacunas.

El tratamiento sintomático de las enfermedades respiratorias del tracto inferior causadas por el VSRH requiere eliminación de secreciones, administración de oxígeno húmedo o asistencia respiratoria. También puede hacerse uso de broncodilatadores y corticoides como antiinflamatorios. Entre la gran variedad que existen y los que se encuentran en estudio, el más utilizado es el palivizumab. Este a pesar de ser el más empleado presenta un elevado costo en el mercado internacional, por lo que los países en vías de desarrollo no pueden adquirirlo.¹⁹

Entre las vacunas desarrolladas a lo largo de los años se encuentran:

- a) Vacuna frente al virus respiratorio sincitial inactivada con formol. Esta vacuna se comenzó a ensayar en los años 60. Se administró en lactantes a partir de los 2 meses y en niños hasta los 7 años por vía intramuscular y en dosis repetidas. Esta vacuna marcó el desarrollo de nuevas vacunas frente al VRS ya que los sujetos vacunados tuvieron más enfermedad y de mayor gravedad que el grupo control. Permitted conocer que la respuesta inmunitaria frente al VSR es distinta a la que ocurre tras la infección.²⁰
- b) Vacunas vivas atenuadas: de administración tópica por vía nasal, para replicar la infección natural sin producir enfermedad. A final de los años 1960 se utilizaron varias vacunas termosensibles, es decir, que no replicaban a temperaturas altas, con lo que se impedía la replicación pulmonar. Demostraron que los niños vacunados con esta vacuna por vía intranasal no presentaban enfermedad grave cuando se infectaban por el VRS salvaje.²¹
- c) Vacunas de virus vivos atenuados, mediante ingeniería genética, permitiendo introducir mutaciones en el genoma del VSR y analizar cómo influyen estas mutaciones en la atenuación del virus.²²
- d) También están en desarrollo, vacunas que utilizan virus quiméricos. Una de éstas, llamada MEDI-534, utiliza un virus Parainfluenza-3 en el que se incluyen segmentos genéticos para que exprese las proteínas F y G del VSR, de forma que podría proteger frente a ambos virus el Parainfluenza-3 y VSR. Se trata de una vacuna congelada, para administración por vía intranasal.²³

Las vacunas en desarrollo deben demostrar una serie de datos, imprescindibles previo a su incorporación al calendario vacunal. Deberán ser vacunas seguras y que protejan de la enfermedad grave desde edades muy tempranas. Los vacunados, en caso de infección, no tendrán una enfermedad potenciada. Será importante demostrar si las vacunas pueden neutralizar la replicación viral en las mucosas, ya que, en estos

casos, la vacuna podría tener un efecto comunitario, fundamental para estimar el impacto sobre la sociedad.²⁴

1.3.3 Epidemiología molecular.

La variabilidad de los aislamientos del VSR ha sido examinada a nivel antigénico y genético. En 1985, Anderson y colaboradores mostraron que, los subgrupos A y B han existido por más de 20 años, que tienen una distribución mundial y pueden co-circular durante una misma epidemia. Estudios realizados con AcMs, mostraron que los aislamientos de ambos subgrupos están presentes durante la mayoría de las epidemias, y que sus proporciones relativas varían de año en año. En general, los virus del subgrupo A, se han identificado más frecuentemente que los del subgrupo B.²⁵

Los virus aislados durante cinco períodos epidémicos fueron analizados en Japón.²⁶ El subgrupo A predominó en el primer y último períodos, mientras que el B se detectó con mayor frecuencia durante tres períodos seguidos.

Se analizaron los aislamientos obtenidos durante 11 períodos epidémicos en Birmingham, Reino Unido. Los genotipos se determinaron mediante transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), combinado con la secuenciación nucleotídica de las muestras seleccionadas. El subgrupo A predominó en ocho epidemias y el subgrupo B en tres. En cada epidemia circularon diferentes genotipos dentro de cada subgrupo. La prevalencia relativa de los genotipos varió cada año, aquel que predominó un año declinó al siguiente.²⁷

En 2001, Venter y colaboradores realizaron un estudio de epidemiología molecular, en cepas aisladas en Soweto (Sudáfrica) durante cuatro epidemias (1997-2000). En cada una de ellas se detectó la circulación de diferentes genotipos y el cambio del genotipo predominante cada año. Así, dentro del subgrupo A, se observó que durante 1997, predominó el genotipo GA5, el cual fue reemplazado durante 1998 por el genotipo SAA1 y este, a su vez, fue reemplazado por GA2 al siguiente año. Este

último genotipo predominó durante dos períodos consecutivos (1999-2000). En relación con los genotipos pertenecientes al subgrupo B, se observó que los genotipos GB3 y SAB3 fueron co-dominantes durante los cuatro años analizados.²⁸

En 2003, se determinó la circulación de un nuevo genotipo (BA) perteneciente al subgrupo B, el cual presenta una duplicación de 60 nucleótidos en el tercio C-terminal del gen G. Se ha visto que este genotipo se ha diseminado de forma rápida por todo el mundo, reemplazando gradualmente al resto de los genotipos del subgrupo B.²⁹

En 2012, en Canadá, se encontró la circulación de un nuevo genotipo (ON1), perteneciente al subgrupo A. Dicho genotipo presenta una duplicación de 72 nucleótidos (23 aa.) en el C- terminal del gen de la glicoproteína G.³⁰

1.3.4 Caracterización Viral.

El VSR se clasifica dentro del Orden *Mononegavirales* y pertenece a la Familia *Paramyxoviridae*, Género *Pneumovirus*. Las partículas virales están constituidas por una nucleocápside helicoidal cubierta de una envoltura lipoproteica, que el virus adquiere al salir de la célula por gemación. Esta envoltura contiene tres glicoproteínas transmembranales, la proteína de unión al receptor (glicoproteína G), la proteína de fusión (glicoproteína F) y una proteína pequeña hidrofóbica¹² (la proteína SH). La Glicoproteína (G) es la responsable de la unión del virus al receptor celular en las primeras etapas del ciclo infectivo. Su secuencia nucleotídica codifica para un polipéptido de 282-322 aa. dependiendo de la cepa.³¹

La proteína matriz (M) forma una cubierta proteica en la cara interna de la envoltura. Las glicoproteínas están organizadas por separado en espículas virales, que se visualizan como proyecciones cortas (11-20 nm) y poco separadas entre sí (6-10 nm). La nucleocápside es una hélice simétrica en la que está el ácido ribonucleico viral (ARNv) asociado con la nucleoproteína (N),³² la fosfoproteína (P),³³ la polimerasa (L)¹² y un factor antiterminador de la transcripción (M2 o 22K)³⁴. El gen M2 contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF) que se solapan en 32 nucleótidos (nt). El producto del

primer marco de lectura da lugar a una proteína, denominada M2-1 (ORF-1). La segunda fase de lectura, M2-2 (ORF-2), codifica para una proteína que se ha encontrado en los extractos de las células infectadas³⁵ (**Figura 1**).

A estas proteínas hay que añadir las proteínas no estructurales (NS1 y NS2) que se consideran así, aunque no se han encontrado en viriones maduros porque abundan en células infectadas.¹² Se ha visto que estas proteínas están implicadas en la evasión de la respuesta inmune innata durante la infección por VSRH.³⁶

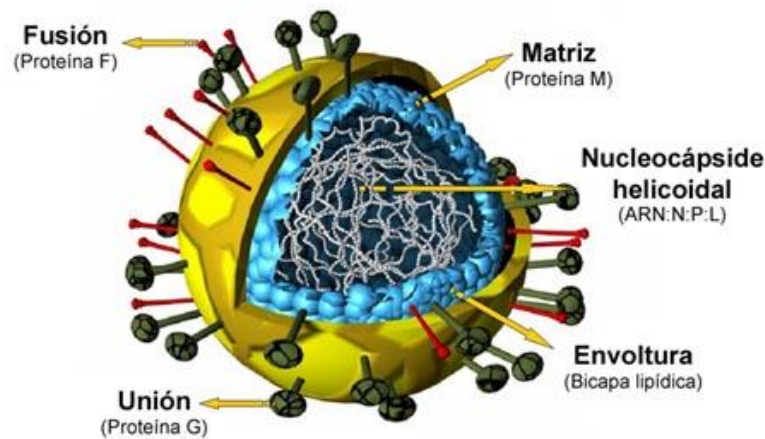


Figura 1: Representación esquemática de la estructura del VSR.

El genoma del VSRH está constituido por una molécula de ARN monocatenario, de polaridad negativa y aproximadamente 15,2 kb, que codifica para 10 ARNm. Cada uno de ellos contiene un marco abierto de lectura (ORF), a excepción del gen M2 que tiene dos.³⁹ Los ARNm tienen una caperuza (CAP) en el extremo 5' y están poliadenilados en el extremo 3'. Cada gen comienza con una secuencia de 10 nucleótidos (nt), muy conservada a excepción del gen L, cuya función es controlar el inicio de la transcripción y la adición de CAP y acaba con una secuencia semi-conservada de 12 a 13 nt, que dirige la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm. Los nueve primeros genes están separados por regiones intergénicas que varían en longitud de 1- 56 nt y carecen de secuencias consenso.³⁷ Los dos últimos genes, M2 y L, se solapan en 68 nt, por lo que la señal inicio del gen L se

localiza dentro del gen M2. En cada extremo del ARN viral (ARNv) se encuentran dos regiones no codificantes, una hacia el extremo 3' de 44 nt, y otra de 159 nt en el extremo 5'. Veintiuno de los últimos 24 a 26 nt de ambos extremos son complementarios, lo que indica un alto grado de identidad entre los promotores de los extremos 3' del ARN genómico y antigenómico³⁸ (**Figura 2**).

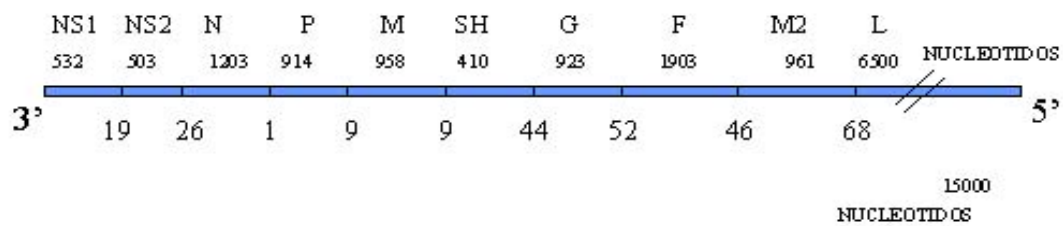


Figura 2: Mapa genético del VSR. En la parte superior se indica el nombre y la longitud (nucleótidos) de cada gen. En la parte inferior se señalan las posiciones y longitudes de las secuencias intergénicas y la región de solapamiento entre los genes M2 y L.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivos.

- Analizar la incidencia de los virus respiratorios en pacientes diagnosticados en el Hospital Universitario Central de Asturias en una temporada epidemiológica.
- Conocer el papel del Virus Sincitial Respiratorio (VSR) como productor de IRAB.
- Caracterizar los genotipos de VSR circulantes en Asturias en esa temporada.

III. PACIENTES, MUESTRAS Y MÉTODOS

3.1 Pacientes y muestras.

Desde el 1 de Septiembre del 2014 al 30 de abril del año 2015 se recogieron un total de 2993 muestras (175 exudados nasales y 720 nasofaríngeos, 322 lavados nasales profundos, 1648 faríngeos y 88 aspirados) en un medio de transporte de virus (ViralPack; Biomedis S.L.[®] Madrid) que se enviaron al servicio de Virología del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) para el diagnóstico de infecciones virales y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento e inoculación.

Los procesos se dividieron en Infecciones respiratorias de vías altas (IRVA), de vías bajas (IRVB), síndromes febriles (SF) y Otros.

Las muestras eran enviadas desde distintas áreas sanitarias, con diferentes localizaciones geográficas dentro del Principado de Asturias. Se incluyeron en la Zona central, las muestras recibidas de Oviedo; la zona de la Costa oriental de Asturias, formada por Gijón y Arriondas; en la zona interior, las muestras recibidas de las áreas sanitarias del interior de Asturias, formada por Sama de Langreo, Mieres y Cangas del Narcea; y, en la Costa occidental, Avilés y Jarrio. Las muestras de cada área sanitaria según su diagnóstico se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Clínica presentada por los pacientes procedentes de las distintas áreas.

	Costa Occidental	Zona Interior	Costa Oriental	Zona central	Total
Otros	40	48	34	55	177
IRVA	63	113	46	1983	2205
IRVB	55	61	90	23	229
SF	96	115	85	86	382
Total	254	337	255	2147	2993

Estas muestras pertenecían a 2556 pacientes, de ellos 1324 (51,84%) eran hombres y 1232 (48,16%) eran mujeres. La distribución por sexo y grupo de edad, se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Distribución de los pacientes según la edad y el sexo.

Edad	Hombres	Mujeres	Total
<2 años	331	247	578
2-15 años	399	387	786
>15 años	592	589	1181
No datos	2	9	11
Total	1324	1232	2556

3.2 Métodos.

3.2.1 Diagnostico viral

El diagnostico viral se lleva a cabo de forma rutinaria en la Sección de Virología del Servicio de Microbiología del HUCA aplicando diferentes técnicas basadas en el crecimiento del virus en diferentes líneas celulares y/o en la detección de sus proteínas y/o genoma.

3.2.1.1 Detección de antígeno en la muestra por Inmunofluorescencia.

La torunda de recogida de muestra se introduce en un criovial con tampón PBS y después de agitarla se retira y se centrifuga para recoger las células de la mucosa. El precipitado se deposita sobre 6 pocillos de dos portaobjetos, se deja secar al aire, se fijan las células depositadas y se realiza una tinción con anticuerpos monoclonales específicos para cada virus (Pasteur Diagnostics). Se incuba en cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C y, después de hacer lavados con PBS y dejar secar al aire, se observa en un microscopio de fluorescencia (**Figura 3**).

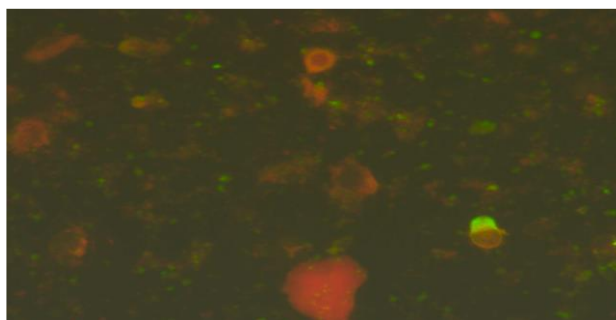


Figura 3: Micrografía en la que se observan células procedentes de un exudado faríngeo infectadas por VSR marcadas con un anticuerpo conjugado con fluoresceína.

3.2.1.2 Cultivo rápido en “Shell-vial” y convencional.

El medio de transporte sin la torunda de recogida se descontamina con una mezcla de antibióticos y se introduce en un criovial. A este sobrenadante se añaden las células sobrantes del proceso anterior. Esta mezcla se deja a 4°C durante 1 hora y con ella se inoculan líneas celulares (MRC-5, MK2, MDCK), previamente crecidas usando medio de crecimiento (Bio-Whittaker, Bélgica), constituido por solución salina balanceada de Earle, con 25 mM HEPES, sin L-Glutamina; Bio-Whittaker® (EMEM) + 6% suero bovino fetal + 2% L-Glutamina (L-Glutamina 200mM en solución 0,85% NaCl, Bio-Whittaker®) + 1% de aminoácidos no esenciales + 1% de mezcla antibiótico en tubos con fondo en U (cultivo convencional) o sobre cubreobjetos introducidos en tubos con fondo plano (cultivo rápido “Shell-vial”). Ambos cultivos se incuban en una estufa a 37°C en presencia de 5% de CO₂. El cultivo convencional se mantiene al menos 15 días o hasta observar un posible efecto citopático. El cultivo rápido se mantiene tres días. En todos los casos se realiza una inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos para cada virus tal como se describe en el apartado anterior (**Figura 4**).

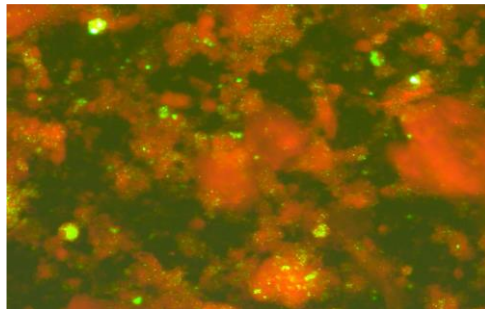


Figura 4: Micrografía en la que se observan células en cultivo tipo “Shell-vial” infectadas por VSR marcadas con un anticuerpo conjugado con fluoresceína.

3.2.1.3 Diagnóstico basado en técnicas de amplificación genómica

En todos los casos se guardó una alícuota a -40°C utilizada para la extracción de los ácidos nucleicos presentes en las muestras respiratorias mediante la tecnología de partículas magnéticas recubiertas de sílice. Para ello se realizó la extracción en un extractor automático (Hamilton, Roche) siguiendo las indicaciones del proveedor.

La detección de los diferentes genomas virales se llevó a cabo mediante la técnica de la PCR a tiempo real (PCR-TR). Para ello, 5 µl del extraído fueron amplificados usando el preparado comercial TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (4x) en un volumen final de 10µl al que se le añaden los cebadores (450 nM) y las sondas (125 nM) recogidas en la tabla 4.

Tabla 4: Cebadores y sondas utilizados en la detección de virus respiratorios.

Virus	Nombre*	Secuencia (5' > 3')
IA	IA-TR-S	GACCRATCCTGTACCTCTGAC
	IA-TR-A	AGGGCATTYTGACAAAKCGTCTA
	IA-FAM	TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG
IB	IB-TR-S	AACATGGTAGTGAAACTGGGTGAA
	IB-TR-A	CAGCATGCGCATTTTGGAT
	IB-NED	ATAACCAGATGATGGTCAAA
VSR	VSRA-TR-S	GCCAGTGGCATTGCTGTAT
	VSRA-TR-A	CTGACTACGGCCTTGTTTGT
	VSRB-TR-S	GCAAGTGGTATAGCTGTAT
	VSRB-TR-A	CTGACTACAGCTTTGTTTGT
	VSR-VIC	AGAAGTGAACAAGATCAA
Parainfluenza 1-3	Para-TR-S	CATGTMMATGCAACWGGMWCMWTA
	Para-TR-A	TGAWGMWGCCCAGATRACYAGA
	Para13-FAM	TTTGYTATCCTTTAATGGAT
Picornavirus	Picor-Ext-1 mod	GCCCCTGAATGYGGCTAA
	Picor-Int-4 mod	GAIACYTGWGCICCCAT
	Picor- VIC	ACTTTGGGTGTCCGTGTT
Coronavirus	Coro12-TR-S	TATGTTGCWTRCARACTGATGT
	Coro12-TR-A	TGMAGTTTGTGTAATAGCATCATTAAAC
	Coro34-TR-S	GGCTGTATGATGAATGTTGCTAAGT
	Coro34-TR-A	GAMCCTGCACCTAAATGCMAA
	Coro-VIC	CAAGAAAATCAGAAAATT
Metapneumovirus	Meta-TR-S	CGCACTATGTGATTTTATGGATCTAGA
	Meta-TR-A	GCTTCAACAGTAGCTGACTCACTCTCT
	Meta-NED	AAGAACACACCTGTTACAATA
Adenovirus	ADV2-TR-S	CCAGGACGCCTCGGAGTA
	ADV2-TR-A	AAACTTGTTATTAGGCTGAAGTACGT
	ADV4-TR-S	GGACAGGACGCTTCGGAGTA
	ADV4-TR-A	CTTGTTCCCCAGACTGAAGTAGGT
	ADV2-NED	AGTTTGCCCGGCCACCG
	ADV4-NED	CAGTTGCCCCGYGCMACAG

*Los cebadores se denominan con un diminutivo del nombre del virus y las letras TR seguidas de S (Sentido) y A (Antisentido). Las sondas se denominan con un diminutivo del virus seguido del fluoróforo que portan (FAM, NED o VIC)

Las amplificaciones, así como los análisis de estas amplificaciones, se realizaron usando un Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (ABI). El perfil térmico utilizado es 30 min a 50°C, 5 min a 95°C y 40 ciclos de 10 s a 95°C y 30 min a 60°C. Este sistema permite detectar tres fluoroforos simultáneamente, por lo que en una misma reacción se pueden detectar hasta tres virus distintos. Así, detectamos simultáneamente la presencia de IA, IB y VSR o de Parainfluenzavirus, Metapneumovirus y Coronavirus.

3.2.2 Caracterización molecular del VSR.

3.2.2.1 Identificación del subgrupo de VSR (A y B)

Para saber si un aislado de VSR concreto era de tipo A o de tipo B se disponía de dos métodos basados en la detección de un fragmento de la glicoproteína F.

El primero, utilizado desde hace tiempo en la Sección de Virología, está basado en una retrotranscripción (RT)-PCR anidada. Esta consiste en una primera amplificación de la muestra, previamente extraída, mediante una RT-PCR usando como 0,5 µM de cada cebador RSFAB41 y RSFAB 51 (Tabla 5) y el preparado comercial Titan One Tube RT-PCR System (Roche). El resultado es sometido a una segunda amplificación usando 0,5 µM de cada cebador RSFA8 y RSFA10 para amplificar VSR-A y RSFB112 y RSFB133 para amplificar VSR-B (Tabla 5) y el preparado comercial Go Taq DNA Polymerase (Promega). En ambos casos se siguió las instrucciones del suministrador.

Tabla 5: Cebadores utilizados para la identificación de tipo de VSR mediante RT-PCR anidada.

Virus	Reaccion	Nombre	Secuencia (5' > 3')
VSR A y B	RT-PCR	RSFAB41	ATGGAGYTGCRYRATCCWCARRRCAARTGCAAT
		RSFAB51	AGGTGTWGTACACCTGCATTRACTRAATTC
VSR A	PCR 2	RSFA8	TTATACACTCAACAATRCCAAAAWACC
		RSFA10	AAATCCCTGGTAATCTCTAGTAGTCTGT
VSR B	PCR 2	RSFB112	ATCTTCCTAACTCTTGCTRTTAATGCATTG
		RSFB133	9GATGCGACAGCTCTGTTGATTACTATG

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (BioRad) usando los perfiles térmicos descritos en la Figura 5.

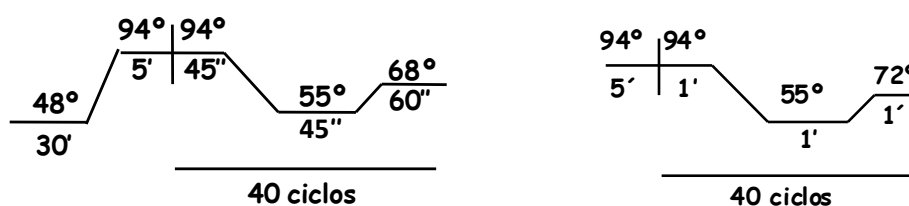


Figura 5: Perfiles térmicos usados en la RT-PCR (izquierda) y en la PCR 2 (derecha) de la RT-PCR anidada.

El producto de las amplificaciones se analizó en una electroforesis en gel de agarosa (2%) con bromuro de etidio. El ADN se visualizó tras exponer el gel a luz ultravioleta en un transiluminador. El producto amplificado se comparó con el marcador de pesos moleculares “50bp DNA ladder” (New England BioLabs) para determinar su tamaño aproximado. Una muestra se consideró positiva para VSR-A y VSR-B cuando se observaron bandas de 363 y 661 pb, respectivamente.

El segundo método, desarrollado más recientemente, está basado en una PCR-TR. Para ello, 5 µl del extraído fueron amplificados usando el preparado comercial TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (4x) en un volumen final de 10µl al que se le añaden los cebadores (450 nM) y la sonda (125 nM) recogidas en la tabla 6. Dado que la sonda es común, las reacciones deben de hacerse por duplicado (una usando los cebadores de VSR-A y otra los de VSR-B). Las amplificaciones, así como los análisis de estas amplificaciones se realizaron usando un Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (ABI). El perfil térmico utilizado es 30 min a 50°C, 5 min a 95°C y 40 ciclos de 10 s a 95°C y 30 min a 60°C.

Tabla 6: Cebadores y sonda para la identificación de tipo de VSR mediante PCR-RT.

Virus	Nombre*	Secuencia (5' > 3')
VSR-A	VSRA-TR-S	GCCAGTGGCATTGCTGTAT
	VSRA-TR-A	CGGCCTTGTGGATAGT
VSR-B	VSRB-TR-S	GCAAGTGGTATAGCTGTAT
	VSRB-TR-A	TGACTACAGCTTTGTTGTAGACAAC
VSR-A y VSR-B	VSR-NED	AGAAGTGAACAAGATCAA

*Los cebadores se denominan con un diminutivo del nombre del virus y las letras TR seguidas de S (Sentido) y A (Antisentido). La sonda se denomina VSR-NED ya que porta dicho fluoróforo.

3.2.2.2 Caracterización de genotipos de VSR A

Para identificar el genotipo de un aislado concreto de VSR A, se amplificó un fragmento de la glicoproteína G a partir del genoma extraído mediante una RT-PCR semianidada. Esta consiste en una primera amplificación de la muestra, previamente extraída, mediante una retrotranscriptasa inversa (RT)-PCR usando 0,5 µM de cada cebador VSR-G2-A-F y VSR-G2-A-R (**Tabla 7**) y el preparado comercial Titan One Tube RT-PCR System (Roche). El resultado es sometido a una segunda amplificación usando 0,5 µM de cada cebador VSR-G2-A-F2 y VSR-G2-A-R (**Tabla 7**) y el preparado comercial Go Taq DNA Polymerase (Promega) siguiendo en ambos casos las instrucciones del suministrador. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (BioRad) usando los perfiles térmicos descritos en la **Figura 5**.

Tabla 7: Relación de cebadores utilizados para genotipar VSR A

Nombre	Reaccion	Secuencia (5' > 3')
VSR G2 A F	RT-PCR	GAAGTGTTCAACTTTGTA CC
VSR G2 A R	RT-PCR y PCR2	CTGCAATTCTGTTACAGC AT
VSR G2 A F2	PCR2	GCAGCATATGCAGCAACA A

El resultado de la amplificación se analizó en una electroforesis en gel de agarosa (2%) con bromuro de etidio. El amplicón obtenido (733 pb) se purificó del gel mediante el preparado comercial Montage DNA Gel Extraction Kit (Millipore) y se secuenció mediante el método de terminación de la cadena (*BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*) en un secuenciador automático (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, USA) utilizando los cebadores VSR-G2-A-R y VSR-G2-A-F2.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron alineadas con secuencias análogas de aislados representativos de los genotipos de VSR-A descritos usando el programa Clustal W (www.ebi.ac.uk) con los parámetros por defecto del mismo. Los árboles filogenéticos se crearon usando el programa TreeView (versión 1.6.6).

3.2.3 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa GraphPad InStat 3.0 for Windows 95 (GraphPad Software, California, EEUU).

IV. RESULTADOS

4.1 Epidemiología de los virus respiratorios en Asturias.

De los 2556 pacientes en los cuales se llevó a cabo el estudio, en 1537 (60,13%) se detectó al menos un virus.

4.1.1 Análisis en función de la edad.

De los 1537 pacientes en los que se detectó la presencia de algún virus respiratorio 398 (68,86%) eran menores de 2 años, 501 (63,74%) tenían entre 2 y 15 años y 638 (54,02%) eran mayores de 15 años (**Figura 6**).

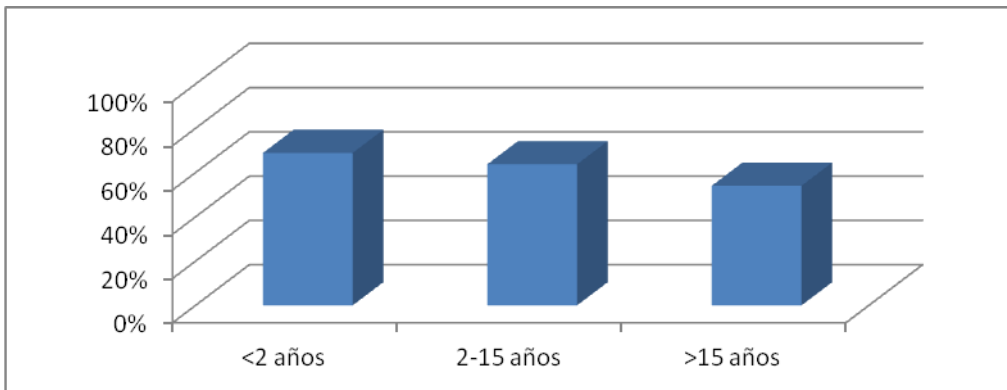


Figura 6: Influencia de la edad en la detección de virus respiratorios.

Los niños menores de 2 años sufren más infecciones virales respiratorias ($p < 0,001$).

4.1.2 Análisis en función del sexo.

Entre los pacientes en los que se detectó al menos un virus respiratorio, 814 (61,48%) eran hombres y 723 (58,69%) mujeres. Esta distribución se puede ver en la **Figura 7** y apreciar como no hay diferencias significativas en el sexo de los pacientes ($p > 0,05$).

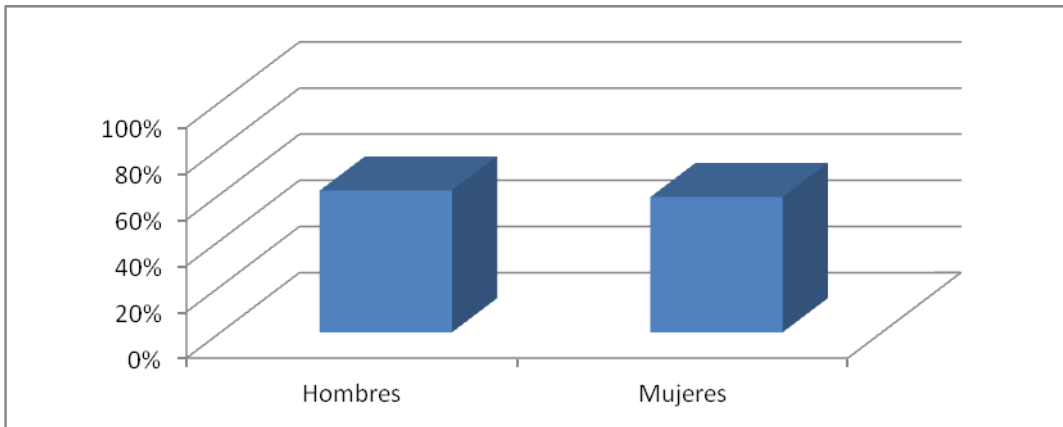


Figura 7: Influencia del sexo en la detección de virus respiratorios.

4.1.3 Análisis en función del lugar de procedencia.

Teniendo en cuenta la zona geográfica, a 1077 (61,40%) pacientes de la zona central se les detectó la presencia de un virus respiratorio; en la costa oriental a 149 (62,87%), en la zona interior a 175 (53,52%) y en la costa occidental a 136 (57,14%). La

Tabla 8 y la **Figura 8** muestran estos resultados.

Tabla 8: Detección viral según el área.

	Total
Zona interior	175
Costa Occidental	136
Costa Oriental	149
Zona Central	1077
Total	1537

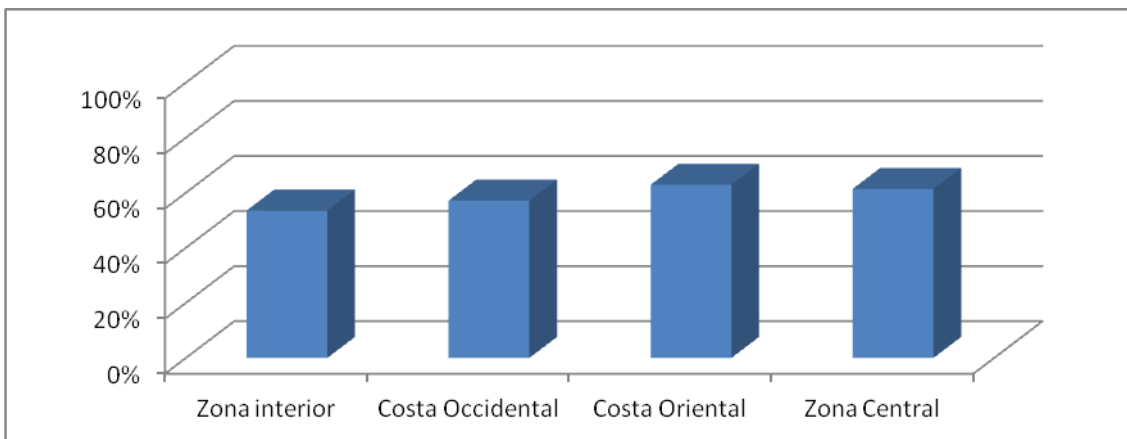


Figura 8: Influencia del área en la detección de virus respiratorios.

Aunque no se encuentran diferencias significativas, entre la zona interior y la costa occidental existe la mayor diferencia pero, en general, el análisis de los datos no mostró diferencias en lo que se refiere al lugar de procedencia de los pacientes.

4.1.4 Etiología viral.

En 1537 pacientes se detectaron 2124 virus respiratorios. El virus más frecuentemente encontrado fue el Picornavirus, en 654 ocasiones (21,85%), seguido del virus Influenza A en 509 (17,01%), del Virus Sincitial Respiratorio en 341 (11,39%) y del Adenovirus en 276 (9,22). También se detectó virus Influenza B en 159 muestras (5,31%), Coronavirus en 120 (4,01%), el virus Parainfluenza en 52 (1,74%) y el Metapneumovirus en 13 pacientes (0,43%) (**Figura 9**). El virus que muestra mayor diferencia es el Picornavirus ($p < 0,001$).

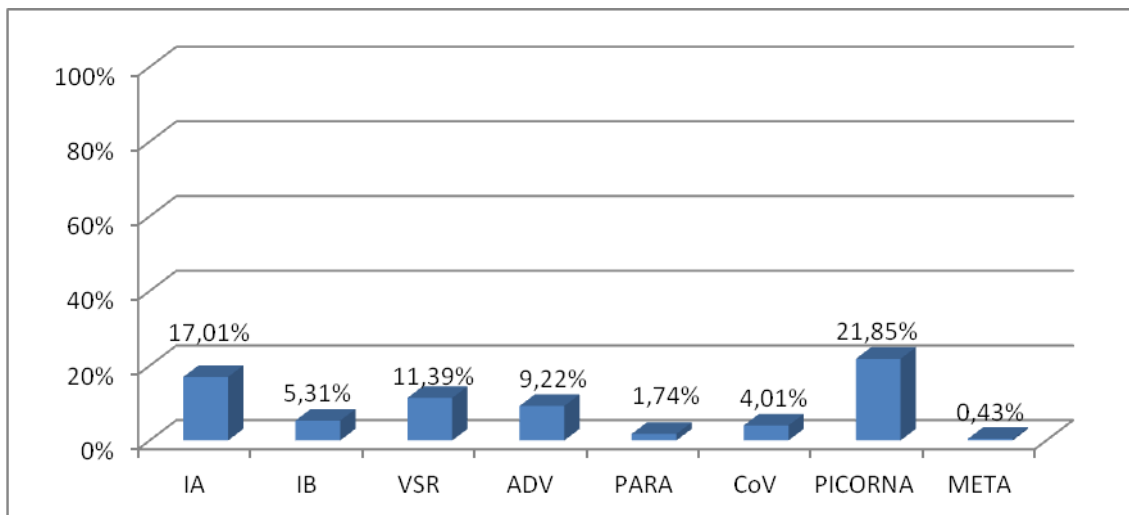


Figura 9: Porcentaje de pacientes con virus respiratorios.

a) Etiología viral y edad.

De los 1537 pacientes en los que se encontró 2124 virus respiratorios, 619 (29,14%) fueron detectados en niños menores de 2 años, 659 (31,03%) en pacientes de 2 a 15 años y 846 (39,83%) en mayores de 15 años. Los datos se muestran en la **Tabla 8** y en la **Figura 10**.

Tabla 9: Virus detectados en cada división de edad.

	<2 años	2-15 años	>15 años	Total
IA	49	158	301	509
IB	13	39	107	159
VSR	189	65	87	341
ADV	99	118	59	276
PARA	22	5	25	52
CoV	37	33	50	120
PICORNA	206	238	210	654
META	4	3	6	13
Total	619	659	846	2124

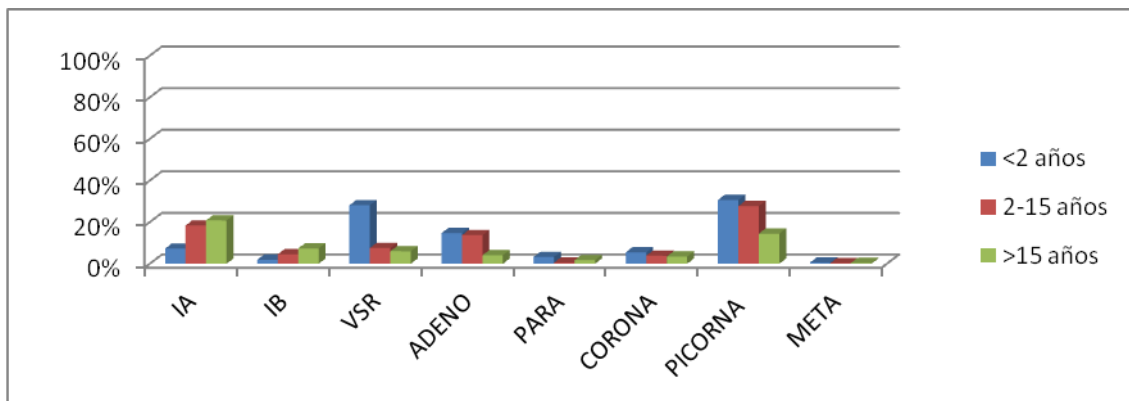


Figura 10: Virus detectados en cada división de edad.

En los tres grupos de edad el virus más frecuentemente detectado fue el Picornavirus, seguido de la Gripe A en adultos y el Virus Sincitial Respiratorio en niños.

b) Relación clínica y etiología viral.

Como se dijo anteriormente los procesos clínicos se dividieron en infección respiratoria de vías altas (IRVA), infección respiratoria de vías bajas (IRVB), síndrome febril (SF) y Otros (pacientes sin diagnóstico). Los virus detectados en total en relación con la clínica se muestran en la **Tabla 10** y en la **Figura 11**.

Tabla 10: Virus detectados según la clínica.

	IRVA (n=2173)	IRVB (n=229)	SF (n=382)	OTROS (n=177)	TOTAL
IA	347	25	115	15	509
IB	98	9	43	9	159
VSR	265	51	15	10	341
ADENO	219	16	29	12	276
PARA	30	11	9	2	52
CORONA	97	10	4	8	120
PICORNA	455	57	61	30	654
META	12	0	0	1	13

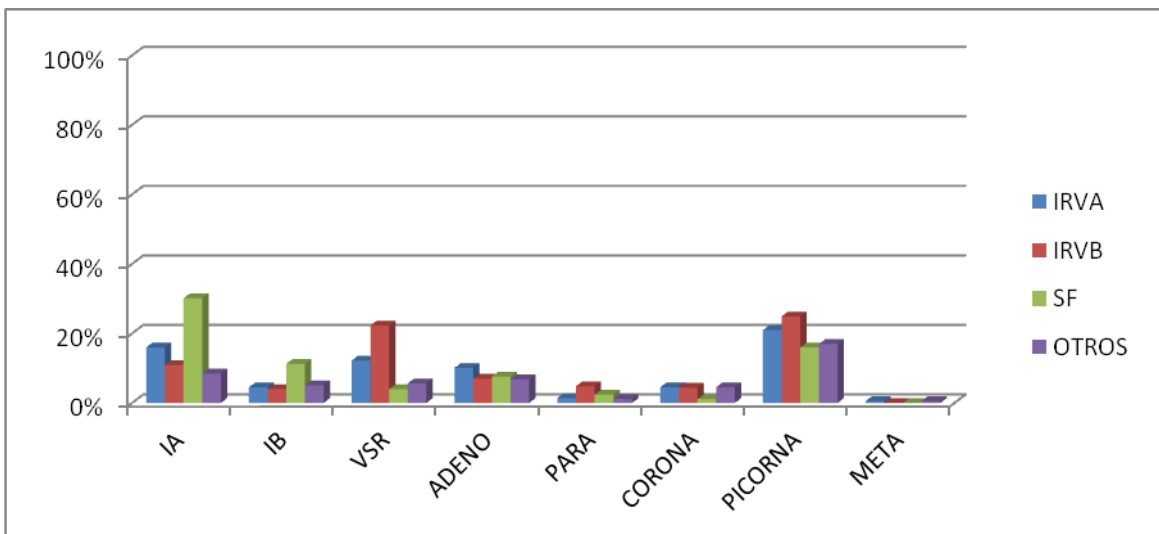


Figura 11: Clínica presentada en cada uno de los virus respiratorios.

4.1.5 Estacionalidad viral.

El estudio se llevó a cabo desde Septiembre de 2014 a Abril de 2015. Durante esta temporada la distribución total de los virus respiratorios detectados en el laboratorio de Virología puede verse en la **Figura 12.**

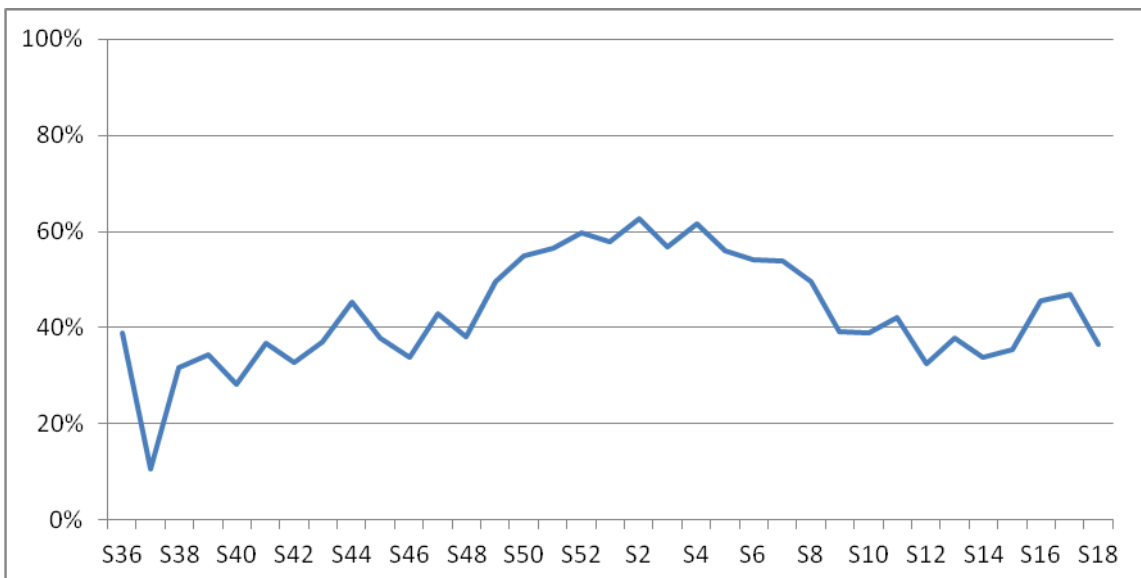


Figura 12: Porcentaje de virus respiratorios detectados en cada una de las semanas en las que se llevó a cabo el estudio.

La temporada con más muestras recibidas, como podemos observar, es en los meses de invierno, especialmente entre la semana 52 y la semana 10 que coincide con el mes de febrero.

La estacionalidad de cada uno de los virus respiratorios detectados en los 1537 pacientes durante esta temporada se puede ver en la **Figura 13**.

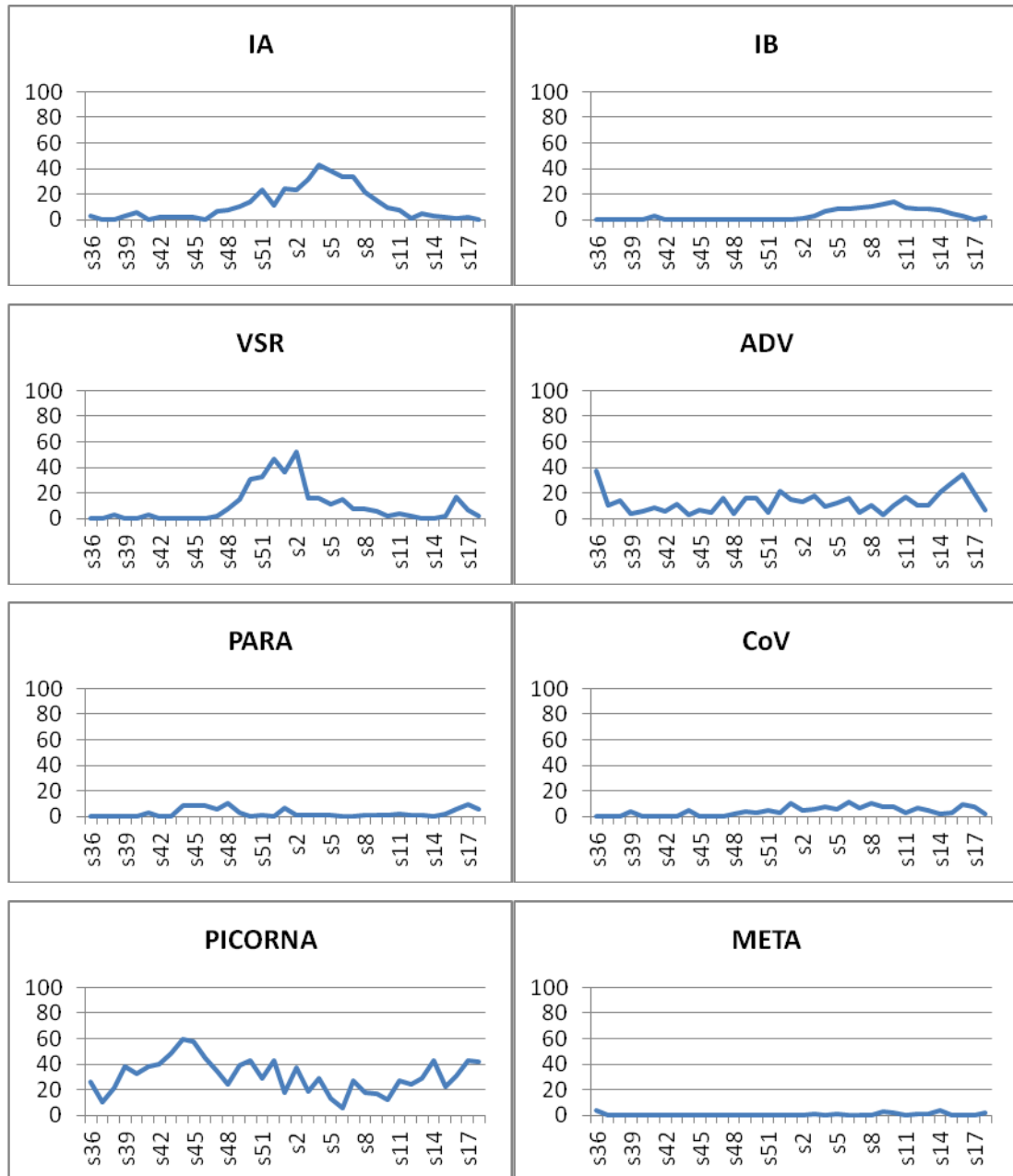


Figura 13: Estacionalidad de cada uno de los virus respiratorios.

El VSR sigue un claro patrón estacional, apareciendo en los meses de otoño e invierno con un pico de máxima intensidad de la semana 50 a la 2, justo antes de que el virus Influenza A tenga el suyo (de la semana 2 a la 10). El virus Influenza B alcanza un porcentaje de 14,5% en la semana 10 y aparece después de la Gripe A. El Picornavirus circula durante todo el periodo de estudio alcanzando su máximo en la semana 46. El Adenovirus y el Parainfluenza se detectan a lo largo de toda la época, pero en menor proporción que los virus anteriores. En cuanto al Coronavirus, también sigue una tendencia estacional, detectándose sobre todo en los meses de invierno y primavera. Finalmente, el Metapneumovirus es detectado tan sólo en 13 pacientes, 3 de ellos en la semana 9 del estudio.

4.1.6 Infecciones mixtas.

De los 1537 pacientes con virus, 352 (14,23%) tenían una infección mixta. Las encontradas en cada grupo de edad se muestran en la **Tabla 11** y en la **Figura 14**.

Tabla 11: Distribución de las infecciones mixtas en cada división de edad.

	<2 años	2-15 años	>15 años
I. MIXTA	135/754	122/778	95/941
%	17,90%	15,70%	10,10%

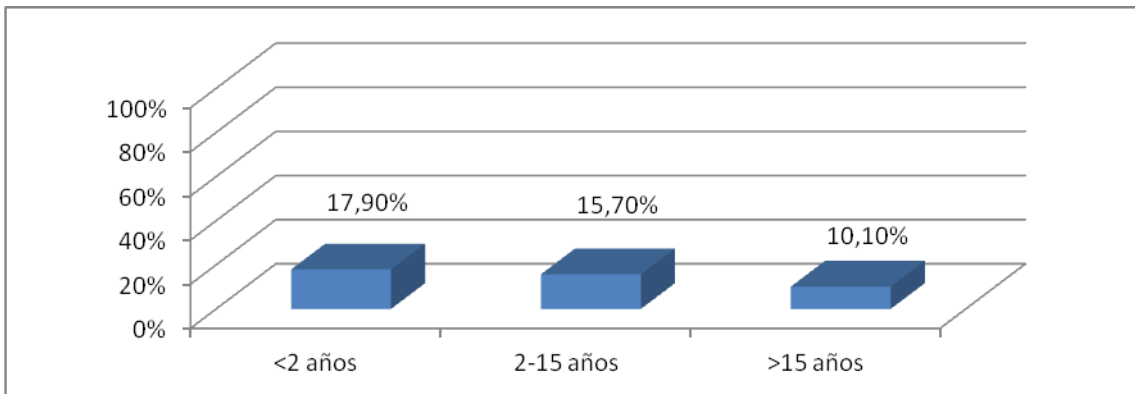


Figura 14: Distribución de las infecciones mixtas en cada división de edad.

La mayor incidencia de infecciones mixtas se encuentra en niños menores de 2 años (17,90%).

La **Tabla 12** y la **Figura 15** muestran el número y porcentaje de los virus encontrados en las infecciones mixtas, así como en las infecciones únicas.

Tabla 12: Virus encontrados en las infecciones mixtas y únicas.

	I ÚNICA	I MIXTA
IA	509 (17,01%)	101 (4,4%)
IB	159 (5,31%)	25 (1,09%)
VSR	341 (11,39%)	146 (5,04%)
ADV	276 (19,22%)	131 (5,93%)
PARA	52 (1,74%)	18 (0,75%)
CoV	120 (4,01%)	52 (2,17%)
PICORNA	654 (21,85%)	228 (9,95%)
META	13 (0,43%)	3 (0,14%)

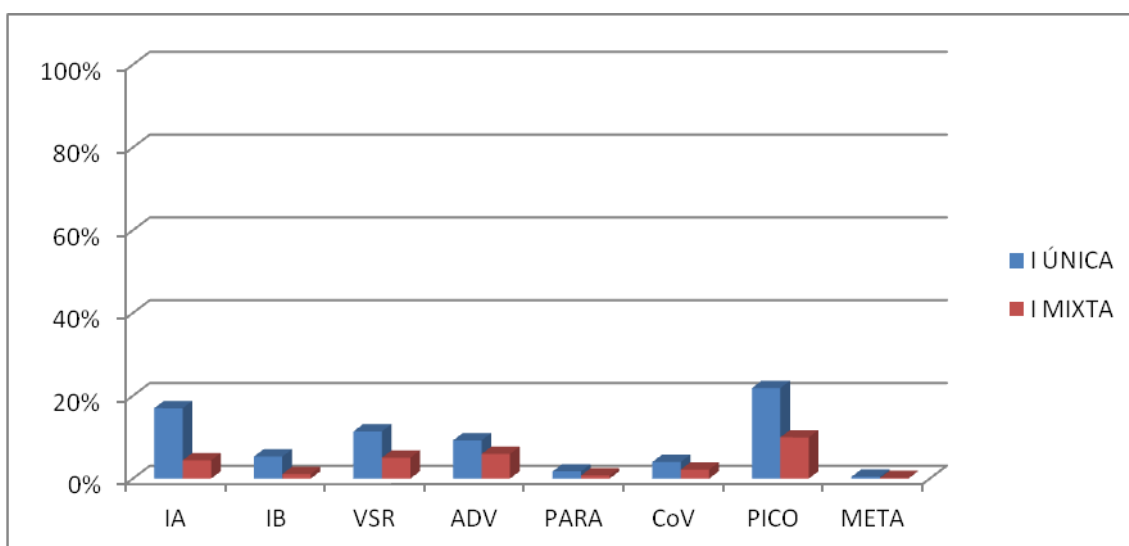


Figura 15: Virus encontrados en infecciones mixtas o como único patógeno.

Los virus más frecuentes encontrados en las infecciones mixtas fueron el Picornavirus (9,95%) y el Adenovirus (5,93%), seguidos del Virus Sincitial Respiratorio (5,04%) y del virus Influenza A (4,41%).

De las 352 infecciones mixtas, 326 (92,09%) estaban formadas por la combinación de dos virus, 25 (7,10%) por tres y 1 (0,28%) por cuatro virus. La **Tabla 13** muestra las combinaciones de virus más frecuentes.

Tabla 13: Combinaciones de virus más frecuentes en las infecciones mixtas.

Combinación	n	%
Mixta (IA, VSR)	30	8,52%
Mixta (IA, ADV)	16	4,55%
Mixta (IA, PICORNA)	36	10,23%
Mixta (VSR, ADV)	26	7,39%
Mixta (VSR, PICORNA)	74	21,02%
Mixta (ADV, PICORNA)	76	21,59%
Mixta (CoV, PICORNA)	22	6,25%

La combinación más frecuente fue el Picornavirus con el Adenovirus, seguida muy de cerca por el por la combinación de Picornavirus y Virus Sincitial Respiratorio.

4.1.7 Importancia del Virus Sincitial Respiratorio (VSR) en infecciones respiratorias.

En este trabajo estamos interesados en caracterizar molecularmente el VSR ya que presenta una alta variabilidad genética con una descripción de genotipos de reciente aparición. En primer lugar, se averiguo el tipo o tipos de VSR que circulan en nuestra región. Para ello, se aplicaron los métodos basados en la detección de la glicoproteína F. Se analizaron 104 muestras clínicas positivas para VSR obtenidas entre Octubre de 2014 y Abril de 2015 de la provincia de Asturias. De estas, 61 pertenecieron al subgrupo A y 43 al subgrupo B (**Figura 16**).

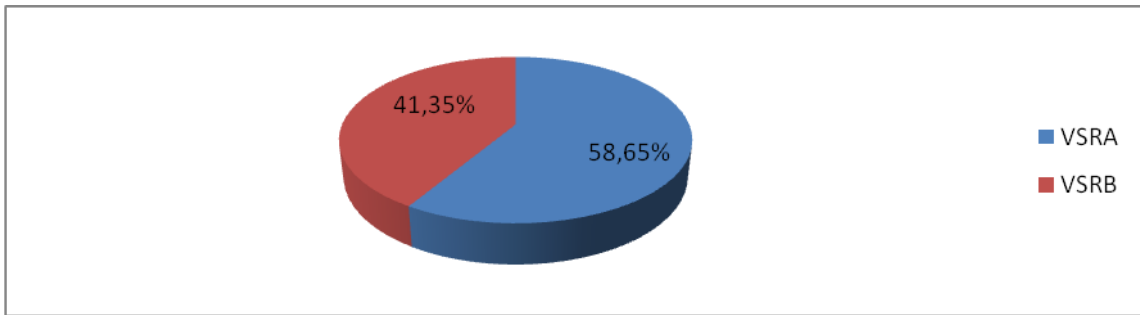


Figura 16: Distribución de los subgrupos del VSR en las muestras positivas.

Si analizamos los pacientes en función del subgrupo al que pertenecen y atendiendo a la edad o al sexo nos encontramos con los datos que aparecen en las **Tablas 14 y 15** y a las **Figuras 17 y 18**.

Tabla 14: Distribución de los subgrupos del VSR en función del sexo.

	Hombres	Mujeres	Total
VSRA	29	32	61
VSRB	21	22	43
Total	50	54	104

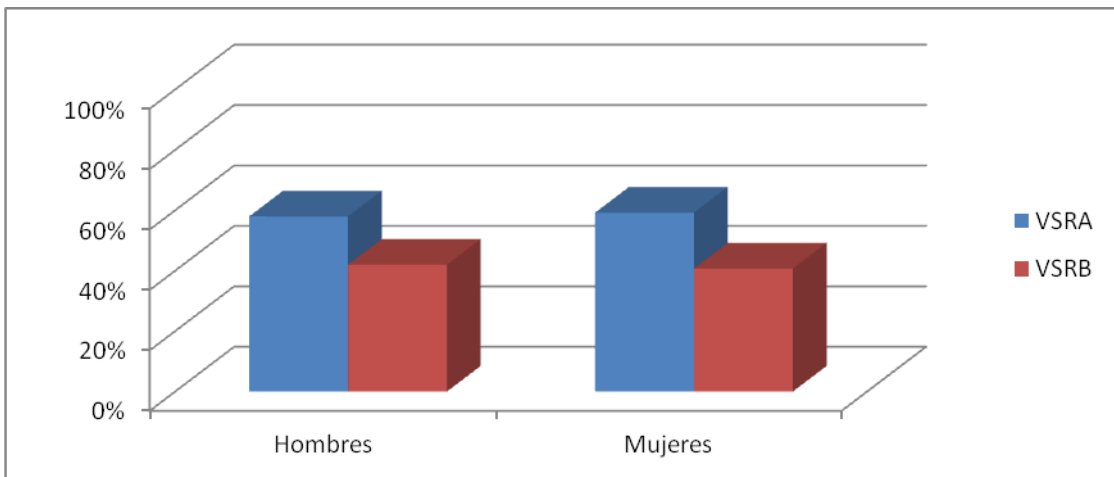


Figura 17: Distribución de los subgrupos del VSR en función del sexo.

Como podemos observar al comparar el sexo de los pacientes no se ven diferencias significativas para el diagnóstico de los subgrupos del VSR.

Tabla 15: Distribución de los subgrupos del VSR en función de la edad.

	VSRA	VSRB	Total
<2 años	37	37	74
2-15 años	6	6	12
>15 años	18	0	18
Total	61	43	104

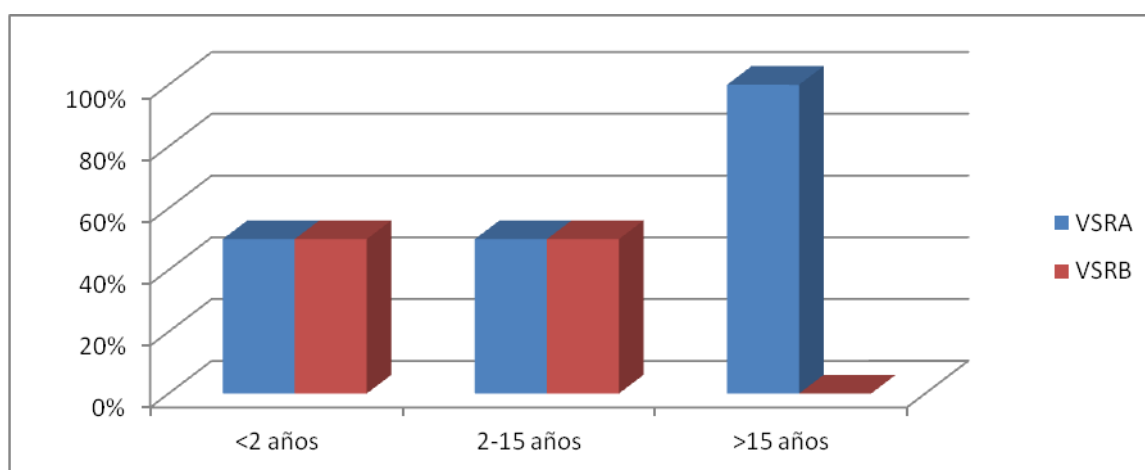


Figura 18: Distribución de los subgrupos del VSR en función de la edad.

Como se puede comprobar, el VSRB no afecta a mayores de 15 años en este estudio, en cambio, los dos subgrupos afectan por igual a los menores de esta edad.

Respecto a la clínica de cada uno de los pacientes en los que se detectó un VSRA o VSRB la **Tabla 16** y la **Figura 19** muestran los resultados.

Tabla 16: Clínica presentada por los pacientes según el subgrupo.

	VSRA	VSRB	Total
IRVB	7	28	35
IRVA	31	14	45
SF	23	1	24
Total	61	43	104



Figura 19: Clínica presentada por los pacientes según el subgrupo del VSR.

Los pacientes en los que se detectó un VSRA presentaban síndrome febril e IRVA mayoritariamente, mientras que, en los que se les aislaba un VSRB padecían bronquiolitis o neumonía.

La estacionalidad de cada uno de los subgrupos detectados en los 104 pacientes durante esta temporada se puede ver en la **Figura 20**.

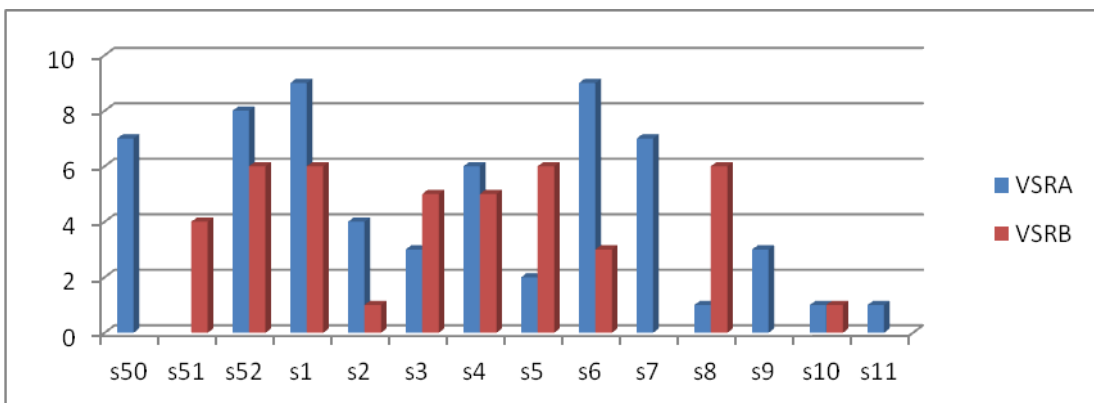


Figura 20: Estacionalidad de cada uno de los subgrupos del VSR.

Como podemos observar la estacionalidad de los dos subgrupos es similar durante todo el estudio, con la prevalencia del VSRA en la gran mayoría de semanas excepto en las semanas 3, 5 y 8 del 2015.

4.1.7.1 Caracterización genotípica de cepas VSR A

Para conocer el genotipo o genotipos circulantes de VSR A en nuestra región durante el periodo estudiado, varias muestras positivas para dicho subgrupo fueron procesadas de acuerdo al apartado 3.2.2.2. En 4 de ellas (6,56% del total de VSRA) se obtuvieron secuencias óptimas (**Figura 21**). Debido a que todas ellas eran idénticas entre sí, se seleccionó una de ellas como secuencia consenso y se la denominó VSR-A/Ast/2015.

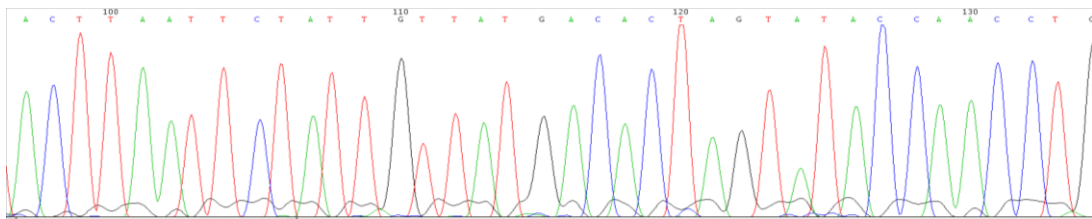


Figura 21: Fragmento de una secuencia de VSR A

El árbol filogenético obtenido al comparar la cepa VSR-A/Ast/2015 con cepas representativas de los distintos genotipos de VSRA se observa en la Figura 24. Se demostró que la cepa VSR-A/Ast/2015 resultó filogenéticamente similar al aislado ON1.

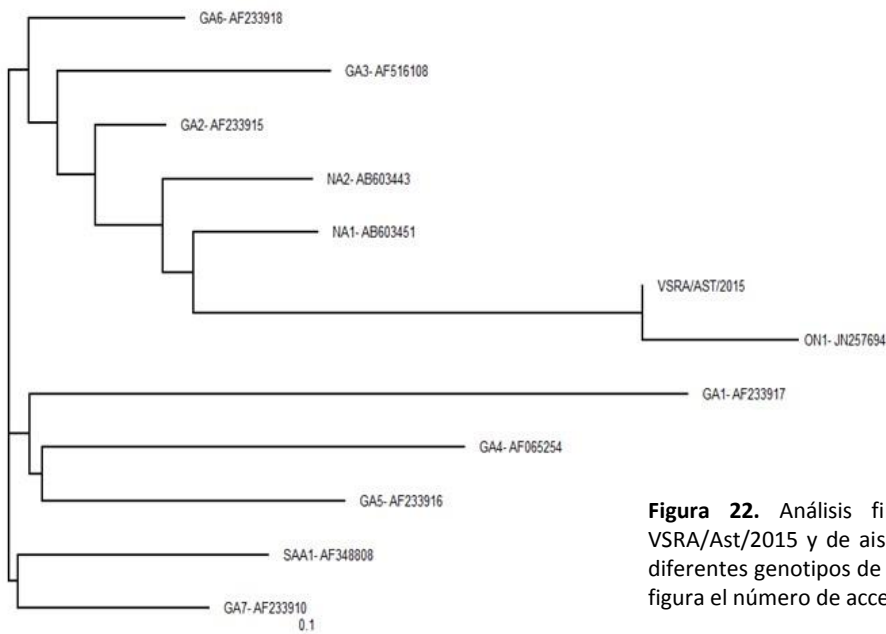


Figura 22. Análisis filogenético de la cepa VSRA/Ast/2015 y de aislados representativos de diferentes genotipos de VSRA. Detrás del nombre figura el número de acceso de GenBank.

V. DISCUSIÓN

Los agentes clásicamente relacionados con las infecciones respiratorias son los virus Influenza A y B, los virus Parainfluenza 1-3, el Adenovirus, el Virus Sincitial Respiratorio, los Picornavirus, el Coronavirus y el Metapneumovirus.

Con el fin de conocer la incidencia, las características y la estacionalidad de las infecciones respiratorias en la población del Principado de Asturias, desde Septiembre de 2014 a Abril de 2015, se llevó a cabo un estudio en el cual se analizaron en el laboratorio de Virología del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) 2993 muestras.

En este estudio se encontró una infección viral en 1537 pacientes, lo que supone un 60,13% del total de los estudiados. Los virus más frecuentemente detectados fueron la Gripe A, los Picornavirus (Rhinovirus y Enterovirus) y el Virus Sincitial Respiratorio. En este tipo de infecciones, variables como la localización geográfica, el sexo, la edad o la clínica que presentaban los pacientes, pueden determinar el diagnóstico etiológico. Por lo tanto, se intentó analizar la influencia que podrían tener esas variables en los datos.

Una variable que podría influir en la tasa de infección es el sexo. Algunos autores han encontrado que los hombres (sobre todo en edades tempranas) son más propensos a padecer infecciones virales que las mujeres⁷. Sin embargo, en este estudio, el sexo no parece influir en la tasa de infección de los virus respiratorios encontrados.

La edad es una variable importante en las infecciones virales. En los niños menores de 2 años estas infecciones representan una de las causas más comunes de hospitalización, originando numerosas consultas médicas tanto en atención primaria como en los servicios de urgencias hospitalarios³⁹. Para el análisis de la edad, en relación con la infección viral se hicieron distintos estratos de la misma (<2 años, 2-15 años y >15 años). Se observó que en niños menores de 2 años esta tasa de detección es significativamente mayor que en el resto, de 579 muestras analizadas 398 (68,86%) fueron positivas para, al menos, un virus. A medida que aumenta la edad, estos porcentajes de detección van disminuyendo, siendo el 63,75% y el 54,02% positivas en los pacientes entre 2 y 15 años y los mayores de 15, respectivamente.

En lo que se refiere a la etiología viral, como ya se comentó anteriormente, los virus más frecuentemente encontrados fueron el Virus Influenza A, el Picornavirus (Rhinovirus y Enterovirus) y el Virus Sincitial Respiratorio. Estos resultados son compatibles con los de García-García y cols.⁴⁰ y con los del estudio de Allander y cols.⁴¹ en los que los dos virus más frecuentes fueron el VSR y el Rhinovirus (Picornavirus).

Si se analiza la etiología viral en función de la edad de los pacientes, se puede observar que en los menores de 2 años, el virus más común fue el Picornavirus seguido del Virus Sincitial Respiratorio.

Según la literatura el Rhinovirus (Picornavirus) es el agente causal más común de las infecciones respiratorias de vías altas tanto en niños como en adultos, siendo incluso más habitual en niños. Prácticamente todos los niños han experimentado al menos un catarro por Rhinovirus a los 2 años⁴².

Se pudo comprobar que los pacientes mayores también son susceptibles a padecer dichas infecciones, en los cuales, destacan las Gripe, el Adenovirus y los Picornavirus.

El Adenovirus se detectó en el 14,73% de los pacientes entre 2 y 15 años. Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado que los Adenovirus son los causantes del 5-24% de las infecciones respiratorias en los niños menores de 5 años, disminuyendo su incidencia a medida que aumentaba la edad⁴³. Nuestros resultados estarían acorde con los reflejados en la literatura, ya que, en pacientes mayores de 15 años se detectó sólo en un 4,07% de los casos.

Se estima que el 20% de los niños y el 5% de los adultos contraen una infección sintomática por el virus de la Gripe cada año. La mayor parte de los estudios epidemiológicos demuestran que la población infantil es la responsable de la introducción, difusión y mantenimiento de la gripe en la comunidad⁴⁴. En nuestro estudio se encontró Gripe (IA y IB) en el 28,21% de los pacientes mayores de 15 años, porcentaje que disminuye al disminuir la edad.

Otro virus respiratorio detectado fue el Metapneumovirus. Estudios de seroprevalencia han mostrado que la presencia de anticuerpos frente a Metapneumovirus era mayor del 90% en niños de 5 años. Esto sugiere que la primera infección ocurre normalmente entre 1-5 años⁴⁵. En nuestro caso solamente 13

pacientes tuvieron un resultado positivo para Metapneumovirus y sin diferencias entre los distintos grupos de edad.

Con respecto al Virus Parainfluenza estudios publicados han descrito que a los 5-6 años el 95% de los niños tienen anticuerpos frente a este virus. Su mayor incidencia se produce a los 2-3 años de edad. El tipo 3 es el más prevalente.⁶⁷ En este trabajo nos encontramos con 52 pacientes con resultado positivo para este virus, siendo mayoritario en pacientes menores de 2 años.

Por último, el Coronavirus, asociado también con infecciones respiratorias, se diagnostica en 120 pacientes repartido en todos los grupos de edad.

Las manifestaciones clínicas de las infecciones virales son muy variables, por tanto, se hizo una división atendiendo al diagnóstico clínico y se relacionó con la etiología viral. Los procesos de faringitis, amigdalitis, laringitis, sinusitis, otitis media aguda, rinitis, y resfriado se clasificaron en infecciones respiratorias de vías altas (IRVA); los pacientes que presentaban neumonía, bronquiolitis, bronquitis, y crisis asmática en infección respiratoria del tracto inferior (IRVB); en los síndromes febriles se incluyeron todos los pacientes que tenían fiebre como único síntoma de infección, mononucleosis infecciosa y síndrome gripal y por último incluimos en otros a aquellos pacientes que presentaban cualquier otra manifestación clínica.

En las infecciones respiratorias de vías altas y los síndromes febriles, que comparten etiología en muchas ocasiones, la Gripe juega un papel muy importante. Su presentación clínica es bastante inespecífica, sobre todo en niños pequeños. Se acompaña de fiebre con mayor frecuencia que otras infecciones virales y en ocasiones es el único síntoma, sobre todo en lactantes menores de 1 año. Con frecuencia se asocian complicaciones como procesos neumónicos y otitis media por infección bacteriana secundaria⁴⁴. En nuestro caso encontramos que el 15,97% de los pacientes infectados por el virus Influenza A presentaba una infección respiratoria de vías altas, un 10,92% infección respiratoria de vías bajas y un 30,10% un cuadro febril, en concordancia con lo expuesto.

Las infecciones respiratorias agudas de origen viral tienden a tener una estacionalidad, presentándose principalmente en las épocas frías⁴⁷. En este estudio,

realizado a lo largo de los meses de otoño-invierno principalmente, no se puede observar tan claramente las diferencias entre los meses calurosos y fríos. Analizando cada uno de los virus se obtuvo que el Virus Sincitial Respiratorio sigue un claro patrón estacional, con un pico en las últimas semanas de Diciembre y primeras de Enero; la Gripe A se encontró durante los meses de invierno, después del Virus Sincitial Respiratorio; la Gripe B apareció después de la Gripe A y el resto de los virus (Metapneumovirus, Adenovirus, Coronavirus, Parainfluenza y Picornavirus) se detectaron a lo largo de toda la temporada. Se puede intuir como al principio y al final de nuestro estudio los pacientes con Adenovirus aumentan, al igual que los Rhinovirus (Picornavirus) positivos.

En las infecciones respiratorias víricas es bastante común encontrarnos con infecciones dobles, coinfecciones o infecciones por múltiples virus. En este estudio se encontró un 14,23% de infecciones mixtas, que si lo analizamos por edades, se puede apreciar un mayor índice de coinfecciones en niños menores de 2 años.

Los virus más frecuentemente implicados en las infecciones mixtas fueron el Virus Sincitial Respiratorio, el Adenovirus y los Picornavirus. La combinación más frecuente fue el Adenovirus con los Picornavirus (21,59%), seguida del VSR con los Picornavirus (21,02%). Aunque la mayoría de las infecciones mixtas estaban formadas por la combinación de dos virus, también se encontraron combinaciones de tres e incluso cuatro virus.

El papel de las coinfecciones es algo confuso, mientras algunos autores creen que no influyen en las manifestaciones clínicas, otros piensan que si aportan una mayor gravedad. Rehder KJ y Wilson EA⁴⁸ comparan los diagnósticos clínicos de los pacientes con y sin coinfecciones y encuentran que la presencia de neumonía era significativamente más frecuente en el grupo de los sin coinfección.

De todos los virus estudiados, el Virus Sincitial Respiratorio tiene una importancia especial. Las infecciones por el VSR destacan como la mayor causa de hospitalización por infección del tracto respiratorio en niños pequeños⁴⁹. La infección primaria por el VSR tiende a ocurrir en edades muy tempranas de la vida. Así, el 50% de los niños sufre una infección por Virus Sincitial Respiratorio en el primer año de vida y del 65 al 98%

de los niños que acuden a guarderías ya están infectados cuando llegan a los tres años⁵⁰.

La bronquiolitis aguda es una enfermedad muy frecuente en la infancia que origina una gran demanda asistencial tanto en atención primaria como en los servicios de urgencias y hospitalización⁴⁹. En todas las regiones geográficas estudiadas a nivel mundial se han hallado evidencias de infección por VSR, que incluso en condiciones climáticas muy diferentes parece tener características similares. Se puede decir, por lo tanto que las infecciones por VSR tienen una distribución mundial⁵¹.

En el presente estudio, la distribución etaria de los casos de infección por VSR diagnosticados en el HUCA entre Septiembre de 2014 y Abril de 2015, refleja una clara tendencia a aparecer en las edades más tempranas de la vida, especialmente, en pacientes menores de 2 años, coincidiendo con los estudios existentes que reflejan que la bronquiolitis por VSR es la principal causa de ingreso por infección respiratoria aguda de vías bajas en el niño menor de 2 años, más frecuentemente entre los 3-6 meses de vida, con una incidencia en aumento en los últimos años⁵². Si bien en nuestro estudio, el grupo de pacientes menores de 2 años supuso el 28,13% del total, la posibilidad de que se presenten reinfecciones permanece durante la edad escolar (7,57%) y la edad adulta (6,00%), ya que la infección por VSR no genera una respuesta inmunitaria que proteja frente a las nuevas infecciones, no habiendo ningún grupo etario protegido completamente frente a ella. Diversos estudios hacen hincapié en la importancia que el VSR tiene como agente patógeno durante la edad adulta, sobretodo en coinfección con otros virus, tratándose de infecciones más duraderas en el tiempo que las causadas por otros agentes respiratorios⁵³.

En los procesos respiratorios de vías bajas el virus más frecuentemente encontrado fue el Virus Sincitial Respiratorio (22,27%). Estos resultados concuerdan con los trabajos publicados en los que consideran que el VSR como el patógeno responsable con mayor frecuencia de infecciones del tracto respiratorio inferior⁴⁹.

La variabilidad del VSR ha sido examinada a nivel genético usando RT-PCR y secuenciación nucleotídica. La variabilidad de este virus, se debe al alto grado de diversidad antigénica y genética que presentan las glicoproteínas F y G. Las

reinfecciones con el VSR se han relacionado con cambios en las propiedades antigénicas del mismo, particularmente en estas glicoproteínas, sugiriendo que la selección inmune de nuevas variantes antigénicas puede ser uno de los factores que contribuye a la evolución del virus⁵⁴.

La caracterización antigénica de la glicoproteína F de 104 muestras aisladas en el Principado de Asturias entre Septiembre de 2014 y Abril de 2015 mostró que el subgrupo A es predominante, 61 muestras pertenecen a él y, 43, al subgrupo B.

Si analizamos estos resultados en función del sexo, vemos que no existen diferencias significativas (50 hombres y 54 mujeres), sin embargo, atendiendo a la edad, observamos como el subgrupo B no aparece en pacientes mayores de 15 años.

En cuanto a la clínica, los pacientes con VSRA presentaban infecciones respiratorias de vías altas y síndromes febriles mayoritariamente (88,52%), mientras que en los pacientes con resultado positivo para VSRB se les diagnosticaba con mayor frecuencia infecciones respiratorias de vías bajas (60,12%).

El análisis filogenético de las secuencias de la glicoproteína G obtenidas por los diferentes criterios de inferencia filogenética mostró la circulación en nuestra región del genotipo previamente descrito, ON1, caracterizado por una duplicación de 72 nucleótidos en el tercer carbono terminal del gen G circulando durante el período de estudio. Mostró gran similitud con el genotipo identificado anteriormente NA1 aislado en Japon⁵⁵. Más secuencias deberían de realizarse para demostrar la presencia de más genotipos cocirculantes en nuestra región.

En resumen, en este estudio se evaluó la diversidad genética de VSR dentro de una cohorte de pacientes y confirma la rápida distribución del genotipo ON1 en España, ya que también se ha descrito recientemente en Cataluña⁵⁶. Una mejor comprensión de la epidemiología molecular de VSR será esencial para el desarrollo de vacunas y la farmacoterapia antiviral contra la infección por VSR.

VI. CONCLUSIONES

1. La implicación viral en procesos relacionados con infecciones respiratorias es alta, afectando principalmente a niños menores de 2 años.
2. Los virus más frecuentemente encontrados fueron el Virus Influenza A, el Picornavirus (Rhinovirus y Enterovirus) y el Virus Sincitial Respiratorio.
3. Las infecciones mixtas están provocadas preferentemente por dos virus y los más frecuentemente implicados fueron el Virus Sincitial Respiratorio, el Adenovirus y los Picornavirus.
4. En los procesos respiratorios de vías bajas el virus más frecuentemente encontrado fue el Virus Sincitial Respiratorio, mientras que Gripe A y Adenovirus se encuentran significativamente en infecciones respiratorias de vías altas y en síndromes febriles.
5. En invierno coexisten Virus Sincitial Respiratorio y Picornavirus y dejan paso a la Gripe A. El Coronavirus se detecta en invierno y primavera y el Adenovirus durante todo el año.
6. El análisis molecular de los subtipos A y B del VSR mostró que ambos subtipos cocircularon durante el período analizado, encontrándose que en forma global el subtipo A prevaleció sobre el B.
7. El VSRB no se encontró en pacientes mayores de 15 años.
8. La secuenciación y análisis filogenético del gen de la glucoproteína G de cepas de VSRA, permitió demostrar que durante el período analizado demostró que el genotipo ON1, el más recientemente descrito, ya circula por nuestra región.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Belshe, R., Bernstein, I. M. & Dansby, K. N. Respiratory syncytial virus. In Textbook of Human Virology. Edited by R. B. Belshe. Littleton: PSG Publishing Co. 1984; 361-384
2. Manoha, C.; Bour, J.B.; Pitoiset,. Rapid and Sensitive detection of metapneumovirus in clinical specimens by indirect fluorescence assay using a monoclonal antibody. J. Med. Virol. 2008; 80: 154-158.
3. Liu M, Worley S, Arrigain S. Respiratory viral infections within one year after pediatric lung transplant. Transpl Infect Dis. 2009; 4:304-12.
4. Marcone DN, Riarte C, Videla C. Frequency in nonhospitalized children with acute respiratory infection. M. Medicina. 2012; 72: 28-32.
5. Voon K, Tan YF, Leong PP. Pteropine Orthoreovirus infection among out-patients with acute upper respiratory tract infection in Malaysia. J. Med Virol. 2015; 23.
6. Tempia S, Walaza S, Viboud C. Mortality associated with seasonal and pandemic influenza and respiratory syncytial virus among children 5 years of age in a high HIV prevalence setting South Africa, 1998-2009. Tempia S et al. Clin Infect Dis. 2014; 58: 1241-9.
7. Díez-Domingo J, Pérez-Yarza EG, Melero JA. Social, economic, and health impact of the respiratory syncytial virus: a systematic search. BMC Infect Dis. 2014; 30: 14-544.
8. Reiche J, Schweiger B. Genetic variability of group A human respiratory syncytial virus strains circulating in Germany from 1998 to 2007. J Clin Microb. 2009; 47(6):1800-10.
9. Blount RE Jr, Morris JA, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coriza. Proc Soc Exp Biol Med 1956; 92: 544-9.
10. Chanock R, Roizman B, Myers R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to Chimpanzee coryza agent (CCA). Isolation, properties and characterization. Am J Hyg 1957; 66: 28-90.
11. Stensballe, L. G. and Kristensen, K., Respiratory syncytial virus. Ugeskr Laeger 2002; 164: 5623-6.
12. Collins PL, James E. Respiratory Syncytial Virus. In: B.N. Fields DMKaPMH, editor. Fields Virology Philadelphia 2007: 1603-1646.
13. Campanini, G. et al. Human respiratory syncytial virus (hRSV) RNA quantification in nasopharyngeal secretions identifies the hRSV etiologic role in acute respiratory tract infections of hospitalized infants. J. of Clinical Virology, 2007; 39: 119-124.
14. Guan XR, Jiang LX, Ma XH, Wang LF, Quan H, Li HY. Respiratory syncytial virus infection and risk of acute myocardial infarction. Am J Med Sci. 2010; 340(5): 356-9.

15. Greenough A. Respiratory syncytial virus infection: clinical features, management, and prophylaxis. *Curr Opin Pulm Med*. 2002; 8(3): 214-7.
16. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory Viral Infections in Infants: Causes, Clinical Symptoms, Virology, and Immunology *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23(1): 150-7.
17. G D, Chranioti A, E P,.Viral Profile of COPD Exacerbations According to Patients. *Open Respir Med J*. 2015; 9: 1-8.
18. Nair H, Nokes D J, Gessner B D. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: A systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010; 375: 1545-55.
19. Shadman KA, Wald ER. A review of palivizumab and emerging therapies for respiratory syncytial virus. *Expert Opin Biol Ther*. 2011; 11(11): 1455-67.
20. Openshaw PJ, Culley FJ, Olszewska W. Immunopathogenesis of vaccine enhanced RSV disease. *Vaccine*. 2001; 20(1): 27-31.
21. Homero San Juan Vergara, Mario Alberto Gutiérrez, Shyam S Mohapatra. *Biología molecular del virus sincitial respiratorio y desarrollo de estrategias profiláctica*. 2012; 22.
22. Mariana Viegas. *Epidemiología molecular del virus sincicial respiratorio en pacientes pediátricos en un período de seis años*. *J. Virology*. 2010.
23. Roberts SR, Lichtenstein D, Ball LA, Wertz GW. The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J Virol*. 1994; 68(7): 4538-46.
24. Schijf MA, Kruijsen D, Bastiaans J, Specific dietary oligosaccharides increase Th1 responses in a mouse respiratory syncytial virus infection model. *J Virol*. 2012; 86: 11472-82.
25. Lopez JA, Villanueva N, Melero JA, Portela A. Nucleotide sequence of the fusion and phosphoprotein genes of human respiratory syncytial (RS) virus Long strain: evidence of subtype genetic heterogeneity. *Virus Res*. 1988; 10: 249-61.
26. Tsutsumi H, Onuma M, Suga K. Occurrence of respiratory syncytial virus subgroup A and B strains in Japan, 1980 to 1987. *J Clin Microbiol*. 1988; 26(6): 1171-4.
27. Seki K, Tsutsumi H, Ohsaki M, Genetic variability of respiratory syncytial virus subgroup a strain in 15 successive epidemics in one city. *Med Virol*. 2001; 64:374-80
28. P Martinelli M, Frati ER, Zappa A. Phylogeny and population dynamics of respiratory syncytial virus (Rsv) A and B. *Virus Res*. 2014; 189: 293-302.
29. Agrawal AS, Sarkar M, Ghosh S. Prevalence of respiratory syncytial virus group B genotype BA-IV strains among children with acute respiratory tract infection in Kolkata, Eastern India. *J Clin Virol*.2009; 45(4): 358-61.

30. Eshaghi AR, Duvvuri VR, Lai R. 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): 2007-1-10.
31. Johnson, T. R., Johnson, J. E., Roberts, S. R. Priming with secreted glycoprotein G of respiratory syncytial virus augments interleukin-5 production and tissue eosinophilia after RSV challenge. J Virol. 1998; 72: 2871-80.
32. García- Barreno, B., Delgado, T. and Melero, J. A. Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. J Virol. 1996; 70: 801-8.
33. Villanueva N, Navarro J, Mendez E, Garcia-Albert I. Identification of a protein kinase involved in the phosphorylation of the C-terminal region of human respiratory syncytial virus P protein. J Gen Virol. 1994; 75(3): 555-65.
34. Routledge, E.G., Willcocks, M. M., Morgan, L. Expression of the respiratory syncytial virus 22k protein on the surface of infected HeLa cells. J Gen Virol 68. 1987; 4: 1217-22.
35. Ahmadian G, Randhawa JS, Easton AJ. Expression of the ORF-2 protein of the human respiratory syncytial virus M2 gene is initiated by a ribosomal termination-dependent reinitiation mechanism. Embo J. 2000; 19(11): 2681-9.
36. Elliott J, Lynch OT, Suessmuth Y. Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase. J Virol. 2007; 81(7): 3428-36.
37. Gould, P. S. Easton, A.J. Coupled translation of the second ORF of the M2 mRNA is sequence dependent and differs significantly in the subfamily *Pneumovirinae*. J. Virol. 2014; 81: 8488–96.
38. Kuo, L., Fearn, R. and Collins, P.L. Analysis of the gene start and gene end signals of human respiratory syncytial virus: quasi-templated initiation at position 1 of the encoded mRNA J Virol. 1997; 71: 4944-53.
39. Shapiro ED. Epidemiology of acute respiratory infections. Sem Pediatr Infect Dis 2012; 9: 31-36.
40. Randolph AG, McCulloh RJ. Pediatric sepsis: important considerations for diagnosing and managing severe infections in infants, children, and adolescents. Virulence. 2014 Jan 1; 5: 179-89.
41. Allander T, Jartti T, Gupta S. Human Bocavirus and acute wheezing in children. Clin Infect Dis 2007; 44: 904-910.
42. Dupouey J, Ninove L, Ferrier V. Molecular detection of human rhinoviruses in respiratory samples: a comparison of Taqman probe-, SYBR green I- and BOXTO-based real-time PCR assays. Virol J. 2014; 18: 11-31.

43. Waman VP, Kolekar PS, Kale MM, Kulkarni-Kale U. Population structure and evolution of Rhinoviruses. *PLoS One*. 2014; 9.
44. Sato M, Hosoya M, Wright PF. Differences in serum cytokine levels between influenza virus A and B infections in children. *Cytokine*. 2009 Jul; 47: 65-8.
45. Essa S, Owayed A, Altawalah H. Mixed viral infections circulating in hospitalized patients with respiratory tract infections in kuwait. *Adv Virol*. 2015;
46. Tran DN, Trinh QD, Pham NT. Clinical and epidemiological characteristics of acute respiratory virus infections in Vietnamese children. *Epidemiol Infect*. 2015; 6:1-10.
47. Wei L, Chan KH, Ip DK. Burden, seasonal pattern and symptomatology of acute respiratory illnesses with different viral aetiologies in children presenting at outpatient clinics in Hong Kong. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 30: 1198-743.
48. Rehder KJ, Wilson EA, Zimmerman KO, Cunningham CK, Turner DA. Detection of Multiple Respiratory Viruses Associated With Mortality and Severity of Illness in Children. *Pediatr Crit Care Med*. 2015; 26.
49. Nenna R, Ferrara M, Nicolai A, Pierangeli A, Scagnolari C, Papoff P, Antonelli G, Moretti C, Midulla F. Viral Load in Infants Hospitalized for Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis Correlates with Recurrent Wheezing at 36 Months Follow-Up. *Pediatr Infect Dis J*. 2015; 30.
50. Howard LM, Johnson M, Williams JV. Respiratory Viral Detections During Symptomatic and Asymptomatic Periods in Young Andean Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2015; 26.
51. Simoes EA, Carbonell-Estrany X, Guilbert T, Mansbach. Clinical Endpoints for Respiratory Syncytial Virus Prophylaxis Trials in Infants and Children in High and Middle Income Countries. *Pediatr Infect Dis J*. 2015; 26.
52. Lee CY, Chang YF, Lee CL. Molecular viral epidemiology characterization of acute febrile respiratory infections in hospitalized children in Taiwan. *J Med Virol*. 2015; 18.
53. Pilie P, Werbel WA, Riddell J. Adult patients with respiratory syncytial virus infection: impact of solid organ and hematopoietic stem cell transplantation on outcomes. *Transpl Infect Dis*. 2015; 8.
54. Bose ME, He J, Shrivastava S, Nelson MI. Sequencing and analysis of globally obtained human respiratory syncytial virus A and B genomes. *PLoS One*. 2015; 3: 20-10.
55. Shobugawa Y, Saito R, Sano Y, Zaraket H. Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2475–2482.

56. Gimferrer L, Campins M, Codina MG, Martín Mdel C, Fuentes F, Esperalba J, Bruguera A, Vilca LM, Armadans L, Pumarola T, Antón A. 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.