



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA ANIMAL



“PERFIL DE CITOQUINAS TH1 Y TH2 Y DE SUBPOBLACIONES  
LINFOCITARIAS EN LA PRIMOINFECCIÓN RESPIRATORIA  
AGUDA BAJA POR VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL”.

**NELSON AGUILAR VERA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: CARMEN LARRAÑAGA L.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: CARLOS NAVARRO	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: ULISES VERGARA	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2008

## **Agradecimientos**

Esta tesis se ha efectuado gracias a la colaboración de muchas personas y equipos de trabajo que me acogieron no sólo intelectualmente, sino además fraternalmente, enseñándome y orientándome con mucha paciencia durante este proceso.

Debo agradecer a mi profesora guía, la Dra. Carmen Larrañaga, haberme dado la oportunidad de participar en un proyecto que siento que ha marcado profundamente mi persona tanto en el ámbito científico como en el ámbito personal. Inolvidables serán las eternas discusiones conceptuales en las que nos envolvíamos por horas, pero de las que siempre sacamos nuevos conocimientos.

A la doctora Luchsinger que con su excelente disposición siempre estuvo cuando la necesité, brindándome sus conocimientos específicos sobre los temas, como también aquellos de tipo profesional. También a todo el grupo humano del laboratorio de virología que me hicieron sentir como en mi casa y siempre sentí su mano amiga cuando estuve en aprietos: Sandra, don Luis, Cristian, Mané, Rosita, Mónica, Richard, Aroldo, señora Isabel y a la familia entera del laboratorio de Virología.

Quisiera también dar gracias al Laboratorio de Inmunología de la Universidad de los Andes especialmente al Doctor Flavio Carrión que me cobijó en toda la primera etapa de este trabajo y tuvo que soportar mis constantes inquietudes y rebeldías.

Finalmente agradezco a mi familia que en todo momento me brindó su apoyo y que sin ella hubiese sido imposible enfrentar este proceso, principalmente a mi madre y mi padre que me dieron la posibilidad de alcanzar y enfrentar esta etapa profesional.

Hay tantas cosas que debo agradecer a cada una de las personas con las cuales me relacione durante este proceso que solo cabe decirles... Muchísimas gracias a todos!!!.

## Índice

1) Resumen.....	3
2) Introducción.....	7
3) Revisión Bibliográfica.....	9
4) Hipótesis y objetivos.....	17
5) Metodología.....	18
6) Resultados.....	28
7) Discusión.....	35
8) Conclusiones.....	47
9) Tablas y gráficos.....	48
10) Anexos.....	91
11) Referencias bibliográficas.....	95

## RESÚMEN

**Introducción.** El virus respiratorio sincial (VRS) es el principal agente de infección respiratoria aguda infantil a nivel mundial y nacional. Diversos estudios han asociado patologías previas como factores asociados a la gravedad del cuadro; sin embargo, algunos niños sanos también se enferman gravemente mientras que otros cursan con una enfermedad leve. Ciertos genotipos de VRS han sido asociados con cuadros más graves mientras que otros estudios no encuentran ninguna asociación en particular. Por otro lado la respuesta inmune del hospedero parece ser el factor más relevante en la evolución clínica de los lactantes, según estudios en modelos animales y otros estudios *in vitro*; pero existen muy poco estudios *in vivo* en los pacientes afectados. Este trabajo plantea como hipótesis que la gravedad de la primoinfección por VRS en lactantes menores de 1 año se asocia a un perfil de respuesta inmune celular Th1 disminuida y no al genotipo viral.

**Objetivos.** Caracterizar el perfil de la respuesta inmune celular en lactantes hospitalizados por primoinfección respiratoria aguda baja por VRS adquirida en la comunidad en relación a la gravedad de la enfermedad y detectar genotipos virales involucrados.

**Material y métodos.** Se estudiaron 83 lactantes sanos con primoinfección por VRS durante los brotes de invierno de los años 2005 y 2006, los cuales fueron clasificados según su evolución en pacientes graves o leves. Se efectuaron técnicas de inmunotipificación a través de citometría de flujo para cuantificar las subpoblaciones linfocitarias y se midieron algunos marcadores de activación de linfocitos T (LT) y natural killer. También se cuantificaron los niveles de citoquinas de la respuesta de tipo Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub> a través de la técnica de ELISA. Las cepas de VRS fueron genotipificadas mediante PCR y análisis filogenéticos del gen G.

**Resultados.** La inmunotipificación demostró una disminución de la población de LT en el grupo de pacientes graves con respecto a lactantes leves y controles sanos. Esta disminución fue manifiesta especialmente en la subpoblación de linfocitos T citotóxicos/supresores (LTc/s). También estuvieron disminuidos en el grupo grave los marcadores de linfocitos de memoria CD45RO, el marcador de activación de LT CD25 y el antígeno CD94 en la población natural killer que se asocia al sistema MHC clase I. Los niveles de citoquinas fueron en general bajos, excepto los niveles de IL-6 que fueron mayores en lactantes graves y los niveles de IL-8 mayores en pacientes con VRS con respecto a los controles sanos. Los genotipos del grupo B fueron más prevalentes en el 2005, especialmente del genotipo BA

(76,6%) y del grupo A durante el 2006, especialmente el GA2 (77,2%). Sin embargo, no hubo asociación de algún genotipo viral con cuadros clínicos de mayor gravedad.

**Conclusión:** La gravedad del cuadro clínico en la infección por VRS se asocia a una respuesta inmune celular deficiente con un perfil de citoquinas Th<sub>1</sub> disminuido y no al genotipo viral.

## **ABSTRACT**

**Introduction.** The respiratory syncytial virus (RSV) is the principal agent of acute infantile respiratory infection on a global and national scale. Several studies have associated previous pathologies as factors associated with the gravity of the clinical disease; nevertheless, some healthy children also fall seriously ill whereas others have a slight illness. Certain genotypes of RSV have been associated with more serious clinical disease whereas other studies do not find any connection in particular. On the other hand the immune response of the host seems to be the most important factor in the clinical evolution of the infants, according to studies in animal models and other studies *in vitro*; but there are very few studies *in vivo* in the affected patients. This work raises as hypothesis that the gravity of the primoinfection for RSV in infants younger than 1-year-old is related to a profile of diminished Th1 cellular immune response and not to the viral genotype.

**Objectives.** To characterize the profile of the cellular immune response in infants hospitalized for low acute respiratory primoinfection by RSV acquired in the community in relation to the gravity of the illness and to detect viral genotypes involved.

**Material and methods.** 83 healthy infants with primoinfection by RSV were studied during the winter sprouts of the years 2005 and 2006, which were classified according to their evolution under severe or mild patients. Techniques of immune typification were carried out through flow cytometry to quantify the subpopulations of lymphocytes and some markers of activation of lymphocytes T (LT) and natural killers were measured. Also the levels of cytokines of the response of type Th<sub>1</sub> and Th<sub>2</sub> were quantified through the ELISA technique. The strains of RSV were genotyped by means of PCR and phylogenetics analysis of the gene G.

**Results.** The immune typification demonstrated a decrease of the LT population in the group of severe patients in comparison to mild infants and healthy control. This decrease was clear especially in the subpopulation of lymphocytes T cytotoxic/supresors (LTc/s). The markers of lymphocytes of memory CD45RO, the activation marker of LT CD25 and the antigen CD94 in the population of natural killer that is associated to the system MHC class I were also diminished in the severe group. The levels of cytokines were generally low, except the levels of IL-6 that were higher in severe infants and the levels of IL-8 higher in patients with RSV with regard to the healthy control. The genotypes of the group

B were more prevalent in 2005, especially of the genotype BA (76,6 %) and of the group A during the year 2006, especially the GA2 (77,2 %). Nevertheless, there was no association of any viral genotype with clinical disease of major gravity.

**Conclusion:** The gravity of the clinical disease in the infection by RSV is associated to an deficient cellular immune response with a diminished profile of cytokines Th<sub>1</sub> and not to the viral genotype.

## **INTRODUCCIÓN.**

En el mundo, una población altamente susceptible, especialmente a enfermedades infecciosas, son los niños, principalmente los lactantes menores de dos años. La vulnerabilidad de esta población se debe a su "inmadurez" fisiológica frente a diversas agresiones, como son los patógenos infecciosos que no solo producen daño durante el episodio agudo sino que también pueden determinar otras consecuencias o secuelas a mediano y largo plazo.

De las enfermedades infecciosas, las infecciones respiratorias agudas bajas (IRAB), tienen un gran impacto en la morbimortalidad infantil a nivel mundial (Avendaño, 1997; Avendaño *et al.*, 2003). Muchos son los agentes etiológicos de IRAB, pero los virus son sin duda la causa más común de infecciones del tracto respiratorio bajo. Entre los virus respiratorios de mayor impacto y frecuencia se encuentran el virus respiratorio sincicial (VRS), los adenovirus, los virus parainfluenza, los virus influenza y el metaneumovirus. El VRS es responsable de más del 30% de las hospitalizaciones de los lactantes por IRAB en el año (Avendaño *et al.*, 2003). La infección por VRS afecta alrededor del 70% de los niños en el primer año de vida y al 100% de los niños hacia el segundo y tercer año de vida. La morbilidad es muy alta durante los primeros 6 meses de vida, especialmente entre los meses 2 y 4 meses de edad (Palominos y Avendaño, 2003; Parrot *et al.*, 1973).

La mortalidad, la alta morbilidad y su participación en secuelas pulmonares a largo plazo como el asma bronquial, hacen que el VRS sea un agente de suma importancia, que obliga a implementar medidas de salud pública en la población susceptible. A pesar de lo mucho que se ha avanzado en el conocimiento de las características estructurales y genéticas del virus, aún persisten interrogantes respecto de los mecanismos patogénicos y de los mecanismos de respuesta inmune inducidos por el virus. Estas interrogantes no han permitido el total control de las infecciones por VRS, tanto en el campo de la terapéutica (antivirales efectivos), como en la profilaxis a través de vacunas.

El objetivo de este estudio fue comprender mejor el tipo de respuesta inmune que la infección por VRS induce en el hospedero *in vivo*. Para ello se comparó el perfil de respuesta inmune celular y el perfil de citoquinas inducidas por la infección por VRS según la gravedad clínica de la infección en lactantes chilenos susceptibles. Además, se analizó el genotipo de las cepas de

VRS aisladas, de manera de observar posibles asociaciones entre el genotipo viral, la respuesta inmune inducida y la gravedad clínica del cuadro respiratorio.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.**

Los factores que inciden en la gravedad de la enfermedad por VRS se estudian incansablemente desde la década de los años 60s. Entre ellos se ha podido determinar que los nacimientos prematuros, especialmente aquellos que evolucionan con displasia broncopulmonar; las enfermedades cardiorrespiratorias crónicas y las condiciones de inmunodeficiencia son factores que inciden en la evolución grave de la enfermedad respiratoria (Mejías *et al.*, 2005). Sin embargo, los niños aparentemente sanos y con un desarrollo normal también pueden enfermar gravemente por VRS. Además de las características propias del virus, los estudios sugieren que el VRS es capaz de inducir una respuesta inmune "exagerada" y mecanismos neurogénicos "anormales". Este tipo de respuesta inducida jugaría un papel significativo en la patogénesis de la enfermedad. También algunas características genéticas del hospedero y algunos marcadores inmunológicos han sido correlacionados con la gravedad clínica de la enfermedad y con el mayor riesgo de presentar una enfermedad aguda grave, fatal o con secuelas pulmonares a largo plazo, incluso durante la vida adulta (Mejías *et al.*, 2005). Los ejemplos más frecuentes son el desarrollo de asma bronquial y la hipersensibilidad de la vía aérea a algunos alérgenos en niños que tienen el antecedente de infección por VRS siendo lactantes. De estas observaciones se desprenden dos líneas de estudio destinadas a identificar los factores que influyen en la gravedad de la enfermedad por VRS. Por un lado, la variabilidad genética del VRS y por otro, la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedero.

## **Virus Respiratorio Sincicial.**

En países de clima templado como Chile, la infección por VRS se presenta como brote epidémico anual durante el invierno entre mayo y septiembre. De acuerdo a nuestra epidemiología, el mayor número de hospitalizaciones por infecciones respiratorias agudas bajas ocurren en forma paralela a los brotes epidémicos del VRS, que durante los meses fríos causan el 75% de las bronquiolitis y el 50% de las neumonías en menores de 2 años, concentrándose el mayor número de casos entre los 2 a 5 meses de edad. La principal vía de transmisión viral es la vía aérea, de persona a persona, a través de aerosoles o de secreciones depositadas en fomites, donde el virus puede permanecer infectivo por algunas horas. El período de incubación es de 2 a 8 días, la excreción viral dura entre 1 a 11 días en lactantes hospitalizados y la enfermedad respiratoria aguda alcanza una duración de 7 a 12 días.

La primoinfección por VRS produce diversas manifestaciones clínicas; desde una infección asintomática, una infección respiratoria alta leve hasta enfermedades respiratorias de curso grave como es la bronquilitis y la neumonía grave de curso fatal (Hall CB.; Darville y Yamauchi, 1998). La infección comienza con la replicación del virus en el epitelio de la nasofaringe y luego se disemina por el tracto respiratorio inferior - en 1 a 3 días - a través de las células del epitelio respiratorio, por deglución de las secreciones contaminadas o por los macrófagos infectados (Hall CB.; Darville y Yamauchi, 1998; Collins *et al.*, 1996; Falsey y Walsh, 2000). Como consecuencia de la infección se produce necrosis y descamación del epitelio de las vías pequeñas, destrucción de cilios, edema y aumento de la producción de mucus. Todos estos son fenómenos propios de la bronquiolitis con el consecuente aumento del trabajo respiratorio, aumento de la resistencia de las vías aéreas, alteración de la relación ventilación/perfusión, etc.

El VRS pertenece a la familia Paramixoviridae, género *Pneumovirus*. Estructuralmente está constituido por una hebra de ARN de polaridad negativa de 15,2 Kb de longitud. Su cubierta consta de una cápsula de simetría helicoidal envuelta en un manto bi lipídico. Su material genético contiene 10 genes que codifican un total de 10 proteínas. La estructura de VRS contiene 3 glicoproteínas de transmembrana: la G, F y SH. Las glicoproteínas G y F, son los principales inmunógenos del virus e inducen la producción de anticuerpos (Ac) neutralizantes. La matriz viral consta de dos proteínas no glicosiladas: las proteínas M y M2; tres proteínas asociadas a la nucleocapside: la nucleoproteína N, la fosfo proteína P y la polimerasa L; y dos proteínas no estructurales: NS1 y NS2, presentes en muy poca cantidad al interior del virión, pero que se acumulan dentro de la célula del hospedero (Cane, 2001; Avendaño *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 1996).

La glicoproteína F (gpF) es una glicoproteína de transmembrana tipo I de 574 aminoácidos (aa), muy conservada entre las distintas cepas del virus. Su función radica en facilitar la entrada del virus en la célula hospedera e inducir la formación de sincicios entre células infectadas con células no infectadas, permitiendo la propagación del virus entre las células del epitelio respiratorio, provocando daño y lisis celular. Para llevar a cabo su función, requiere ser activada y para esto utiliza una proteasa celular que corta la proteína precursora gpFo. La eficiencia de este proceso podría relacionarse con la virulencia del virus dependiendo de la

secuencia aminoacídica de la gpF (Carballal, 1998; Collins *et al.*, 1996). La fusión entre la membrana celular y la envoltura viral permite la entrada de la nucleocápsula viral con su material genético para que se inicie la replicación viral propiamente tal; para esto, la polimerasa viral se encarga de transcribir los diez RNA mensajeros que codifican para las proteínas virales. Es importante señalar que esta RNA polimerasa no corrige los errores ocurridos durante la síntesis de los nuevos RNAs favoreciendo, de este modo, la variabilidad del virus (Carballal, 1998; Collins *et al.*, 1996). El proceso de replicación viral determina lisis celular, formación de sincicios e inducción de la respuesta inmune que también participa en el daño tisular (Cane, 2001; Avendaño *et al.*, 2003; Sullender, 2000).

La glicoproteína G (gpG) corresponde a una glicoproteína de transmembrana tipo II altamente glicosilada, de 289 a 299 aa (Collins *et al.*, 1996). Es la proteína de ubicación más externa en la superficie del virión y participa en la adsorción viral, permitiendo la unión del virus a las células hospederas del epitelio respiratorio. Esta glicoproteína es la más variable dentro de la estructura del VRS, pudiendo variar el 47% de sus aminoácidos (Johnson *et al.*, 1987); esto determina una alta variabilidad antigénica, la que estaría además aumentada por su alto contenido de azúcares. La alta variabilidad genética de la gpG ha permitido identificar serogrupos y diversos genotipos del VRS.

El VRS presenta alta variabilidad antigénica en sus proteínas, especialmente en la proteína G. De acuerdo a la antigenicidad de esta proteína, se distinguen dos serogrupos de VRS: A y B. Cada serogrupo presenta variantes genómicas que permiten caracterizar al VRS también en distintos genotipos, a través del análisis filogenético de la secuencia nucleotídica del gen de la gpG. De este modo, inicialmente se reconocieron 5 genotipos entre los VRS serogrupo A y 4 genotipos entre los VRS serogrupo B. Sin embargo, en el último tiempo se han reconocido nuevos genotipos como el argentino BA, los sudafricanos SAA1, SAB1, SAB2 y SAB3 y los uruguayos URU1 y URU2 (Peret *et al.*, 1998; Venter *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2005). Los VRS A contienen una mayor variación genética con respecto a los VRS B, pero en este segundo grupo las diferencias antigénicas y genéticas son más amplias (Johnson *et al.*, 1987). La traducción clínica y epidemiológica de la alta variabilidad genética del virus ha sido objeto de múltiples estudios. Por ejemplo, algunos trabajos han observado una depuración del virus más rápida en pacientes infectados por el serogrupo B, pero sin diferencias significativas en cuanto

al requerimiento y tiempo de hospitalización por uno u otro grupo de VRS y tampoco respecto de la necesidad de los cuidados intensivos y, o de ventilación mecánica (Devincenzo, 2004). Otros trabajos han logrado asociar el grupo A con mayor gravedad (Walsh *et al.*, 1997; Hall *et al.*, 1990) y otros el grupo B (Simoes, 1999; Hornsleth *et al.*, 1998). En el caso de Chile circulan los dos serogrupos de VRS, habiendo un predominio de VRS A durante los brotes, con un aumento de VRS B en los años pares (Palominos *et al.*, 2004). Durante el período 2001-2003, se estudiaron los genotipos circulantes en la población chilena, encontrando una mayor frecuencia del VRS GA5 en un 56% de los niños estudiados, seguidos por el grupo BA (19%), SAB3 (10%), GA2 (9%), URU1 (4%) y GB5 (1%) (Luchsinger, 2005). También existen VRS capaces de infectar a animales como bovinos, ovinos, caprinos y aves como los pavos, sin embargo estas no se transmiten al hombre (Mejías *et al.*, 2005; Palominos y Avendaño, 2003).

### **VRS y respuesta inmune.**

La diversa evolución clínica de la primoinfección por VRS no se explica completamente por la presencia de uno u otro genotipo de VRS. Desde la experiencia fallida con la vacuna inactivada en la década de los años 60, se estudia en forma ininterrumpida la enfermedad por VRS, especialmente las formas graves de la infección, con el objeto de entender su patogenia y los factores que inciden en su evolución y pronóstico a mediano y largo plazo. En estos estudios se ha descubierto la importancia de dos factores relevantes. Por un lado, se ha asociado a algunos polimorfismos de ciertos genes humanos con una mayor predisposición de debutar con una enfermedad grave por VRS durante la primoinfección (Rämet *et al.*, 2000). Por otro lado, la calidad de la respuesta inmunológica inducida por el virus sería distinta en los individuos. Conocer como estos elementos influyen en la patogenia y evolución de la enfermedad, nos permitiría implementar terapias más racionales, utilizar marcadores pronósticos de gravedad y también estudiar futuras y mejores vacunas, que controlen esta infección.

Durante los primeros dos meses de vida existe protección parcial a la infección grave por VRS por la actividad de los anticuerpos maternos (Ac) transmitidos pasivamente. Sin embargo, estos Ac disminuyen gradualmente durante los primeros 6 meses de vida, quedando el lactante menos protegido para enfrentar la infección por VRS, especialmente entre los 2 y 4

meses de vida. Por esta situación, en nuestro país la autoridad tiene campañas de prevención durante los brotes epidémicos de VRS, todos los inviernos, con el fin de prevenir muertes por VRS en este grupo de pacientes (Campañas de Invierno, MINSAL).

En otra línea de estudios, algunos autores han demostrado asociaciones entre una mayor susceptibilidad de hacer una enfermedad grave por VRS y ciertos polimorfismos genéticos de diversos genes humanos. Por ejemplo, las proteínas del surfactante pulmonar (SP), que constituyen la primera interacción del virus con el sistema inmune innato y juegan un papel muy importante en mantener la tensión superficial alveolar, además de participar activamente en los mecanismos de opsonización del patógeno. Se ha observado que estas proteínas secretadas a nivel alveolar, pueden favorecer una mayor susceptibilidad o mayor resistencia de presentar enfermedad grave por VRS en aquellos individuos con determinados polimorfismos genéticos para los genes que codifican las proteínas SP-A y SP-D del surfactante pulmonar (Mejías *et al.*, 2005; Rämét *et al.*, 2000). Otras moléculas fundamentales en la protección de la infección por VRS son las citoquinas. La expresión de estas moléculas no solo dependen del patógeno que induce la producción de citoquinas, sino también de la constitución genética del hospedero. Se han estudiado diferentes polimorfismos de los genes codificantes de citoquinas y para algunos de ellos se ha observado una fuerte asociación entre un determinado polimorfismo y la gravedad clínica de la enfermedad por VRS. Hacking y colaboradores observaron que el aumento de la transcripción de IL-8 en algunos individuos se asociaba a una mayor susceptibilidad de presentar una enfermedad grave por VRS y que este aumento de la quimioquina se relaciona con un determinado polimorfismo del gen de IL-8. También se han encontrado otros polimorfismos que se asocian a enfermedad grave por VRS en los genes de IL-4, IL-9, IL-10 y TNF- $\alpha$ , entre otros (Hacking *et al.*, 2004; Openshaw y Tregoning, 2005).

Desde hace varios años se discute el papel de la respuesta Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub> en la evolución clínica de la enfermedad causada por VRS. En algunos individuos se produciría un desbalance de la respuesta de linfocitos CD4 inducida por el virus, que influiría negativamente en la evolución de la enfermedad. En individuos con enfermedad grave predominaría la respuesta efectora tipo Th<sub>2</sub> sobre la respuesta Th<sub>1</sub>, comparado en general con el tipo de respuesta esperada para las infecciones virales, donde predomina la respuesta Th<sub>1</sub>. Este desbalance entre ambas

respuestas efectoras se observó por primera vez en la década de los años 60s, cuando se introdujo la vacuna Anti-VRS no infectiva, inactivada en formalina. La aplicación de esta vacuna provocó una enfermedad más grave y de mayor mortalidad en lactantes vacunados desafiados naturalmente al virus silvestre que los niños controles no vacunados. Esto determinó la discontinuación de estos estudios y de la vacuna. A raíz de estos eventos, a lo largo de los años siguientes se han realizado diversos estudios *in vitro* y en animales que tratan de comprender el fenómeno deletéreo que produjo la vacuna. Entre ellos, se han estudiado perfiles de citoquinas, habiéndose demostrado un predominio de citoquinas del tipo Th<sub>2</sub> con una disminuida producción de IFN- $\gamma$  (Mejías *et al.*, 2005), producto insigne de la respuesta Th<sub>1</sub>. Esto fue corroborado en estudios *in vitro* con células periféricas mononucleares las cuales fueron infectadas con VRS y adenovirus; frente a este último hay una respuesta con INF predominante a diferencia de VRS que responde con mayor producción de IL-10 (Fernández *et al.*, 2005). Diferencias similares fueron encontradas con otras citoquinas, como la producción de IL-6, una citoquina proinflamatoria, propia de la respuesta TH<sub>2</sub>, donde sus niveles fueron mayores en adenovirus (Kawasaki *et al.*, 2002).

Lo anterior también se observa en otros estudios que han dado diferencias en los patrones de citoquinas secretados por células mononucleares de adultos y lactantes. La respuesta de las células mononucleares de los recién nacidos en el día 5 post-infección mostró niveles detectables de citoquinas en el siguiente orden: IL-6 > TNF- $\alpha$  > IL-10 > IFN- $\gamma$  > IL-12. La respuesta fue evidente ya en el primer día post-infección, excepto en los niveles de IFN-gamma, el cual no fue detectable en el primer día. No se detectaron niveles de IL-2, IL-4, IL-5 e IL-13 en el primer día. Los niveles de citoquinas de la respuesta inmune innata fueron mayores en neonatos que en adultos. Sin embargo, los patrones de citoquinas de la respuesta adaptativa fueron mayores en las células de los adultos (Krishnan *et al.*, 2003).

Un ejemplo clásico del desbalance en la producción de citoquinas en la respuesta inmune frente al VRS es el caso del IFN- $\gamma$ , clave en el equilibrio Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> esperado. Con una baja producción de IFN- $\gamma$ , el perfil de citoquinas Th<sub>2</sub> predomina y persiste, lo cual favorecería la respuesta de tipo alérgica que muestran estos pacientes con una marcada eosinofilia pulmonar (Openshaw, 2002). Es importante señalar que el desarrollo del sistema inmune es lento en el período prenatal, comparado con la rapidez que adquiere al final del embarazo y

durante los primeros meses de vida. Junto con esto se ha demostrado una mayor tendencia de responder a través de la vía de respuesta tipo Th<sub>2</sub> durante este período del desarrollo (Openshaw, 2002). En efecto, se ha encontrado por ejemplo una hipermetilación en la región del gen de INF- $\gamma$  en neonatos que afectaría la eficiencia de transcripción del este gen (Openshaw y Tregoning, 2005), explicando de alguna manera la baja producción de INF a esa edad.

En relación a la respuesta inmune celular, que posee un papel crucial en la evolución de la enfermedad, se ha observado que la disminución de células CD4<sup>+</sup> reduce la gravedad de la enfermedad, por un lado, y por otro, las células CD8<sup>+</sup> inhiben la eosinofilia producida por las células Th<sub>2</sub>. Trabajos sobre células CD4<sup>+</sup> V $\beta$ 14<sup>+</sup>, que corresponden a linfocitos helper que expresan en su TCR la cadena V $\beta$ 14 correspondiente a una familia de cadenas variables  $\beta$  del TCR, tienen una alta asociación con el daño pulmonar. También es posible que la proteína G se comporte como una proteína súper antígeno para esta subpoblación de linfocitos. Por su lado la subpoblación CD8<sup>+</sup>, citotóxica, se caracteriza por ser una población que elimina al virus, pero si su actividad aumenta significativamente puede exacerbar la enfermedad (Openshaw y Tregoning, 2005). Esto último ha sido comprobado en modelos animales, en los cuales se observa un síndrome agudo de distress respiratorio, habitualmente de curso fatal.

Por lo tanto, podemos decir que los estudios en general proponen 3 afirmaciones que explicarían la gravedad de la enfermedad causada por VRS desde el punto de vista inmunológico: a) una predisposición genética frente al virus, b) una respuesta adaptativa ineficiente y c) una respuesta adaptativa con dirección Th<sub>2</sub>.

En definitiva, diversos factores se relacionarían con la gravedad clínica de VRS: por un lado el virus, cuyo papel no está claramente establecido debido a resultados contradictorios; el hospedero en el cual algunos polimorfismos de genes -como los del surfactante pulmonar- lo predispondrían a enfermar gravemente; y por último, la respuesta inmune que el hospedero es capaz de instaurar al interactuar con el virus. En el presente estudio hemos evaluado los genotipos virales involucrados en los brotes y la respuesta inmune celular de los individuos primoinfectados por VRS al inicio de la infección. Estas dos evaluaciones las hemos asociado a

dos diferentes evoluciones clínicas de la enfermedad: una evolución grave y una evolución leve de la infección.

## **HIPÓTESIS**

La gravedad de la primoinfección por VRS en lactantes menores de 1 año se asocia a un perfil de respuesta Th<sub>1</sub> disminuido y no al genotipo viral.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el perfil de la respuesta inmune celular en lactantes hospitalizados por primoinfección respiratoria aguda baja por VRS adquirida en la comunidad en relación a la gravedad de la enfermedad y al genotipo viral involucrado.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### **a) Evaluación Inmunológica del hospedador**

Comparar el perfil de subpoblaciones de los linfocitos T, de citoquinas Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub> y de quimioquina en sangre periférica entre lactantes menores de un año hospitalizados por primoinfección respiratoria aguda baja por VRS adquirida en la comunidad que presentan una evolución grave, una evolución leve o moderada y controles sanos.

### **b) Evaluación Genética del Virus.**

Identificar los genotipos de VRS involucrados en la primoinfección respiratoria aguda baja adquirida en la comunidad en lactantes menores de un año hospitalizados que presentan una evolución grave y una evolución leve o moderada.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **Pacientes.**

Se estudiaron lactantes menores de un año, hospitalizados por primoinfección respiratoria aguda por VRS adquirida en la comunidad en el Hospital Roberto del Río durante los meses de Junio 2005 a Septiembre de 2006. La primoinfección respiratoria aguda por VRS se caracteriza por un cuadro de fiebre, coriza, tos, disnea, taquipnea, distress respiratorio, signos clínicos de condensación pulmonar asociada o no a obstrucción bronquial, cuyo diagnóstico específico de infección por VRS haya sido realizado mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), aislamiento viral en cultivos celulares y, o reacción de la polimerasa en cadena (PCR) en tiempo real, en una muestra obtenida en un período igual o menor a 72 horas de evolución intrahospitalaria.

**Criterios de inclusión.** Lactantes menores de un año que se hospitalizan en su primer evento de IRAB (infección respiratoria que compromete bajo la carina) adquirida en la comunidad. El enrolamiento de los pacientes se hizo en un período igual o menor a 72 horas de hospitalización (los períodos de incubación para VRS varían entre 3 y 5 días).

**Criterios de Exclusión.** Lactantes menores de un año prematuros, inmunodeprimidos, con afecciones cardiorrespiratorias (cardiopatía congénita, miocardiopatía, etc.), síndrome bronquial obstructivo recidivante, asma bronquial, fibrosis quística, displasia broncopulmonar y con antecedentes de hospitalizaciones previas por infecciones respiratorias agudas y/o ventilación mecánica.

**Controles.** Lactantes menores de un año sin antecedentes de hospitalizaciones previas. Corresponden a lactantes que acuden a un control sano o que son hospitalizados en servicios de cirugía del Hospital Roberto del Río, durante los meses de Diciembre a Marzo de 2006 (meses de baja frecuencia de IRAB, especialmente de etiología viral) sin patología infecciosa, que requieren de cirugía electiva.

**Consentimiento informado.** Previa información a los padres por escrito de las implicancias del estudio se solicitó su consentimiento, según normas aprobadas por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina y del Área Norte de Santiago.

### **Toma de muestras:**

De cada paciente se extrajeron dos muestras, sangre periférica y aspirado nasofaríngeo (ANF).

#### **A) Sangre con EDTA para:**

- Citometría de flujo: 1 ml de sangre entera.
- Determinación de Citoquinas: 10 alícuotas de suero de 125 ul cada una.

**Manejo de la muestra:** se tomó 5 ml de sangre en tubos K<sub>3</sub>-EDTA, procedimiento efectuado por personal calificado del programa de virología. 1 ml de ella se colocó en un tubo Eppendorf, a temperatura ambiente bajo campana de flujo laminar, para su posterior análisis mediante citometría de flujo. Los ml restantes se centrifugaron a 2.000 r.p.m. por 20 minutos para obtener el plasma, el cual se extrajo bajo campana y se dividió en alícuotas de 125 ul que se mantuvieron a -80°C, hasta la determinación de las citoquinas mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

#### **B) ANF:**

Aislamiento viral: 0,5 ml de la muestra  
IFI: 0,5 ml de la muestra

PCR: 0,5 ml de la muestra  
Genotipificación viral

**Manejo de la muestra:** Se tomó una muestra de ANF en 4 ml de medio de Hanks, por personal calificado del programa de virología. Esta fue transportada al laboratorio de virología en frío a 4°C y procesada de inmediato. La mitad de la muestra se centrifugó a 2.000 r.p.m. por 20 minutos para sedimentar las células en las cuales se realizó la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Del sobrenadante, 0,5 ml se inocularon en un cultivo de células Hep-2 para el aislamiento viral, (procedimientos hechos por personal calificado). El resto de la muestra se dividió en alícuotas de 1 ml con 500 ul de solución chomczynski con fenol (Winkler) y fue guardada a -80°C, hasta que se realizó la técnica de transcripción reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), después de lo cual se procedió al proceso de genotipificación viral.

### **Evaluación Clínica de los pacientes.**

Los pacientes fueron enrolados y en una ficha personal se registraron datos clínicos como presencia de: fiebre, tos, disnea, taquipnea, distress respiratorio, signos clínicos de condensación pulmonar asociada, obstrucción bronquial, etc.; parámetros de gravedad como

necesidad y duración de hospitalización, ya sea básica, en UCI o en cuidados intermedios. También se registró los requerimientos de oxígeno, mayor fracción inspirada de oxígeno (FIO<sub>2</sub>), duración de la hospitalización, la necesidad de re-hospitalización por complicaciones derivadas de la infección por VRS y eventos de muerte.

La construcción de los grupos de gravedad se hizo por médicos pediatras, especialistas en enfermedades infecciosas y broncopulmonares. Ellos construyeron un sistema de puntaje para evaluar la gravedad clínica que los pacientes alcanzaron a lo largo de toda la evolución de la enfermedad. El puntaje considera la hospitalización de un niño con VRS, el tiempo de hospitalización, la necesidad de oxígeno del paciente, el tiempo y modo en que se administra el oxígeno y la máxima concentración de oxígeno que recibió el lactante durante su hospitalización. Se definió que individuos con puntajes iguales o mayores a la mediana obtenida (7 puntos) eran pacientes que habían presentado una evolución grave, mientras que aquellos con puntajes inferiores a la mediana (7 puntos) correspondían a pacientes con enfermedad leve o moderada. Aplicando la correlación lineal de Pearson a los puntajes obtenidos por ambos grupos se obtuvo una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p= 0.0000157$ ).

El detalle de los criterios de gravedad utilizados se presenta en el Anexo 1.

### **Inmunotipificación mediante citometría de flujo.**

La Citometría de flujo (CMF) es una técnica sencilla que se aplica en la rutina diaria de muchos laboratorios clínicos y de investigación, puesto que proporciona resultados de forma rápida y que pueden ser aplicables al diagnóstico. Gracias a su gran especificidad esta metodología permite distinguir entre células diferentes, y puede detectar una población celular en una muestra en la que predominan otras poblaciones celulares. La principal característica de la CMF es que puede ofrecer información simultánea de varios parámetros distintos en cada una de las células analizadas y compara los parámetros entre distintas células. Permite el análisis de dos parámetros de dispersión, SSC/FSC (granularidad/tamaño) y tres de fluorescencia (en equipos con un solo láser): FL1, FL2 y FL3, y de una cuarta fluorescencia en equipos con dos láseres (Pucciarelli, 2005).

Con la sangre extraída de 75 paciente infectados por VRS y 19 controles se efectuó un hemograma y con 1 ml de sangre total, transportada a temperatura ambiente al laboratorio de

Inmunología de la Universidad de los Andes, se procedió al análisis de esta a través de CMF el mismo día de su extracción.

El protocolo seguido en este análisis fue: Para cada muestra se necesitó 12 tubos falcon, en cada tubo falcón se agregó 40 ul de sangre y 40 ul de PBS (Buffer fosfato Salino, pH 7,4; Dulbecco's), luego se adicionaron Anticuerpos Monoclonales (Anexo 2) según la distribución mostrada en el Anexo 3. Se homogenizó cada tubo y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Posterior a la incubación se agregó 4 ml de reactivo de lisis (Compuesto por:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KHCO}_3$ , EDTA y  $\text{H}_2\text{O}$ ) a todos los tubos para eliminar glóbulos rojos y dejar solo células blancas, se cubrieron con parafilm para homogeneizarlos bien y luego fueron incubados por 15 minutos en oscuridad. Se realizaron 2 lavados con 4 ml de PBS, seguidos de centrifugación de 6 minutos a 1600 r.p.m. por 2 veces (Centrifuga TC6 Sorval) eliminando el sobrenadante entre cada centrifugación cuidando de no dejar caer el pellet. Finalmente, se agregaron 600 ul de Paraformaldehído (Sigma) 2 %/PBS y se refrigeraron a 4° C hasta su lectura en el citómetro de flujo Coulter Epics-XL (dentro de las 12 horas siguientes).

En primera instancia se seleccionó de acuerdo a tamaño y granularidad celular la población linfocitaria que se deseaba estudiar (población de baja granularidad). En una segunda elección las células a estudiar se seleccionaron de acuerdo a granularidad y la emisión de fluorescencia específica de la población que se desea estudiar (Ej.: en el caso de subpoblaciones linfocitarias se seleccionó aquellas células con baja granularidad y que presentaban el marcador CD45). Luego se observaron las diferentes fluorescencias en un gráfico de puntos dividido en 4 cuadrantes que resultan de la interpretación de los histogramas que va dejando la agrupación de las células según la presencia de una, dos o ninguna fluorescencia (fl). De este modo se puede interpretar los valores de fluorescencia para cada evento y sus combinaciones positiva fl1-negativa fl2; negativa fl1-positiva fl2 y así sucesivamente. Los resultados fueron entregados en forma de porcentajes (el 100% corresponde al total de eventos en el gráfico). Se estandarizó el análisis a un total de 5.000 eventos por muestra. Una vez hecha la adquisición en el citómetro los gráficos de puntos fueron contrarrestados con los histogramas de la adquisición y según los inicios y términos de las poblaciones en el histograma correspondiente, se ubicaron los cuadrantes para diferenciar las poblaciones. Para verificar que la lecturas y las posiciones de los cuadrantes fueran correctas en el caso de las subpoblaciones linfocitarias se comparaban

lecturas con los otros tubos, es así como por ejemplo en el caso de la población CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> del tubo 1 esta era comparada con la población CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> del tubo 2. En el caso de los otros marcadores (RA-RO, CD25, HLADR y marcadores NK), el cero se ajustó a un tubo que contenía solo marcador de la población buscada, es así como por ejemplo en el caso de CD25<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> el cero se ajustó con un tubo que contenía solo el marcador CD3.

Los resultados se registraron en una planilla Excel, incluyendo los valores porcentuales para cada marcador, obtenidos directamente en el caso de las subpoblaciones linfocitarias y en el caso de los marcadores de activación, tras la sustracción de valor alcanzado en el tubo blanco (sin el marcador). Con esta planilla en porcentaje se calcularon los valores absolutos en todos los pacientes que disponían de recuento de linfocitos en el hemograma.

Desde el punto de vista inmunológico, los lactantes menores de un año tienen un sistema inmune inmaduro en desarrollo y muestran una alta dispersión en el número de sus células inmunes circulantes. Es por ello que incluimos en el análisis de las poblaciones linfocitarias, ambos recuentos celulares, sus valores absolutos y sus valores porcentuales. Esto nos permitió confirmar o rechazar tendencias cercanas a diferencias significativas, en las comparaciones que realizamos con los valores absolutos.

### **Determinación de Citoquinas.**

La determinación de citoquinas contó con plasma de 78 pacientes y 26 controles sanos los cuales fueron tomados al azar para completar la planilla de sembrado de cada ELISA con 80 sueros entre controles y pacientes. El orden de la siembra para cada ELISA fue hecho al azar, intentando repetir en cada cuantificación la misma cohorte de muestras según la disponibilidad de suero de cada paciente. Las muestras fueron colocadas en cajas para criotubos que fueron transportadas en un caja de plumavit con hielo seco, con más de un día anticipación de hacer el Kit, al laboratorio de inmunología de la Universidad de los Andes, una vez llegado a destino se volvieron a guardar a -80°C.

Se estudiaron las siguientes citoquinas: INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , citoquinas sintetizadas principalmente por la subpoblación de Linfocitos T Helper 1; IL-6, IL-13 e IL-10, citoquinas sintetizadas

principalmente por la subpoblación de Linfocitos T Helper 2; IL-8 que corresponde a una quimioquina; e IL-17 citoquina sintetizada por la subpoblación de linfocitos T Helper 17.

Su determinación se realizó mediante "Kits" ELISAs comerciales de la marca Biosource<sup>R</sup> importados por la empresa Bioschile, en el caso de: TNF- $\alpha$ , con un mínimo de detección de 0,09 pg/ml (número de catálogo KHC3014; kit ultrasensible); IL-6 con un mínimo de detección de 104 fg/ml (número de catálogo KHC0134); IL-13, con un mínimo de detección de 0,5 pg/ml (número de catálogo KHC0134; kit ultrasensible); IL-10, con un mínimo de detección de 0,2 pg/ml (número de catálogo KHC0104; kit ultrasensible); e IL-8, con un mínimo de detección de 100 fg/ml (número de catálogo KHC083; kit ultrasensible) todos ELISA Sándwich. En el caso de INF- $\gamma$  e IL-17 su determinación fue hecha por "Kits" ELISA de la marca R&D Systems (INF- $\gamma$  número de catálogo DIF50 con un mínimo de detección de 8 pg/ml e IL-17 número de catálogo D1700 con un mínimo de detección de 15 pg/ml) ambos correspondientes a ELISAs directos. Estos "Kits" proveen todos los reactivos. Los protocolos usados fueron específicos para cada "Kit" y son detallados por el fabricante a través de un manual con todas las especificaciones técnicas de cada kit (sensibilidad, protocolo, desviación estándar, etc.).

#### Determinación de TNF- $\alpha$ :

El método utiliza un kit ultrasensible en el cual su curva de calibrado va de 0 a 32 pg/ml siendo su límite de detección 0.09 pg/ml. Se llevo el kit a temperatura ambiente mientras se descongelaban las muestras también a temperatura ambiente. Se reconstituyó el estándar a 380 pg/ml se mezcló suave y se dejó por 10 minutos hasta su completa reconstitución, luego partiendo de él se construyó la curva de calibrado de forma seriada. Se abrió la placa, se agregó 50 ul de buffer de incubación a todos los pocillos, a continuación se agregó 50 ul de diluyente buffer del estándar a los pocillos donde se sembraron las muestras y se comenzó a sembrar, primero 100 ul de los estándares de la curva de calibrado (se hizo en duplicado en las dos primeras columnas) y 50 ul de plasma de los pacientes; luego se agregó 50 ul de Ac anti-TNF- $\alpha$  biotinilado (primer anticuerpo) en todos los pocillos, se cubrió e incubó 2 horas a 37°C. Se lavó la placa 4 veces con la solución de lavado proporcionada por el Kit agregando solución de lavado en los pocillos, mezclando, descartando el líquido y finalmente golpeando suavemente la placa contra una toalla absorbente. Se agregó 100 ul de la streptavidina-HRP a todos los pocillos (se preparó siguiendo las indicaciones del inserto, minutos antes de agregarlo;

corresponde al segundo anticuerpo anti-Ac anti-TNF- $\alpha$  con la enzima peroxidasa en su extremo) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Se hizo un segundo lavado exactamente igual al anterior. Luego se agregó 100  $\mu$ l de cromógeno estabilizado (solución que es catalizada por la enzima; tetrametilbenzidina) a todos los pocillos, notando inmediatamente como se tornaban de color azul los en los pocillos. Se incubó en oscuridad y fue seguida la reacción visualmente. Cuando la curva de calibrado estuvo totalmente desarrollada en un intervalo de alrededor de 25 minutos se detuvo la reacción con 100  $\mu$ l de la solución de detención ( $H_2SO_4$ ). Se leyó la placa a 450 nm inmediatamente.

Los datos arrojados por el lector de ELISA fueron llevados y ordenados en una planilla Excel. Con las densidades ópticas de la curva y su duplicado se sacó un promedio el cual fue puesto en un grafico de dispersión en el eje de las X y en el eje Y la concentración de la interleuquina correspondiente a cada lectura. Se construyó una línea de tendencia con un  $r^2$  mayor a 0.99 de tipo lineal y con la fórmula de la recta entregada se calcularon las concentraciones en las muestras. En el caso de lecturas en las muestras por sobre 1,8 de D.O. se construyó una curva de tipo polinomial de orden 2 o según la necesidad de ajuste hacia el cero en lecturas muy bajas. Con los grupos de gravedad se hicieron comparaciones de tipo Pacientes vs Sanos, pacientes Graves vs niños Sanos, pacientes Leves vs niños Sanos, pacientes Graves vs pacientes Leves.

### **Análisis filogenéticos del VRS**

Los métodos descritos fueron realizados en las dependencias del Programa de Virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile e incluyen la obtención del DNA complementario (DNAC) del VRS, la amplificación del gen G, la determinación de la secuencia nucleotídica y los análisis filogenéticos.

**Extracción RNA:** A cada alícuota de ANF, guardada con Chomczynski – fenol a  $-80^\circ C$ , tras su descongelación se le agregó 200  $\mu$ l de cloroformo. Tras incubarse por 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó por 15 minutos a 14.000 rpm en  $4^\circ C$  (centrífuga Biofuge). La fase sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf que se incubó con 500  $\mu$ l de isopropanol al 100% y 1  $\mu$ l de glicógeno por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol 75% frío, se centrifugó

por 2 minutos a 14.000 rpm a 4°C (centrífuga Biofuge), se descartó el sobrenadante y se mantuvo a 37°C por 20-30 minutos. Se resuspendió en 20 ul de agua estéril con inhibidor de RNAsa (20 U/ul). Finalmente se calentó a 57°C por 10 minutos y se almacenó a -80°C.

**RT-PCR:** A partir del RNA viral extraído se obtuvo el DNA complementario por transcripción reversa con el partidor F844 (400ng/ul) (Anexo 4). El protocolo usado para cada muestra fue: 200 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (M-MLV, Promega®); solución Buffer PCR 5X; 1mM de una mezcla de dNTP (Promega®), 20 U de inhibidor de RNAsa (Promega®); 5 ul de RNA y agua libre de nucleasas (Promega®) hasta completar un volumen de 20 ul. La mezcla se incubó a 37°C por 60 minutos y luego a 95°C por 5 minutos en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer®).

Posteriormente, se amplificó un fragmento del gen que codifica para la glicoproteína G del manto del virus, que incluye su región más variable (región externa de la glicoproteína), con los partidores específicos FV (-) y GAB (+) (Anexo 4). El protocolo usado fue: Solución Buffer PCR Invitrogen® 10X; MgCl<sub>2</sub> (1,5mM); 1 ul de una mezcla de dNTP a 20mM; 2 unidades de Taq DNA polimerasa platinum (Invitrogen®); 50 pmoles de cada partidor; 10 ul de DNA complementario; y agua libre de nucleasas hasta completar 100 ul. La reacción se realizó en un termociclador convencional GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer®) con el siguiente programa: 94°C por 5 minutos, luego 35 ciclos de: 94°C por un minuto, 55°C por un minuto, 72°C por un minuto, y extensión a 72°C por 10 minutos. El tamaño de la banda esperada era de 653 pb en los VRS del grupo A y 656 pb en los VRS del grupo B, los que se detectaron en un gel de agarosa al 1,5%, cargando 10 ul del producto PCR con 2 ul de solución de carga. Los amplificados observados de gran intensidad se purificaron con columnas de purificación (FavorGen®), según instrucciones del proveedor. La estimación de la masa se realizó en relación al marcador de masa de DNA estándar (Winkler®), en un gel de agarosa al 1,5% cargando 5 ul del producto purificado más 2 ul de solución de carga.

Los amplificados de cantidad insuficiente se sometieron a una PCR semianidada con los partidores GAB y F1AB (Anexo 4), con el protocolo anteriormente descrito. Esta vez la banda esperada fue de 489 pb para los VRS A y 492 pb para los VRS B. Aquellos con masa estimada adecuada, se purificaron, ya sea directamente en la solución de PCR o, si se observaban

bandas inespecíficas, a partir del gel de agarosa, con un kit de purificación (FavorGen®). Tras la purificación, los amplificadores se enviaron a los laboratorios Macrogen Korea para la determinación de las secuencias nucleotídicas con los partidores F1AB y GAB (5 pico moles/ul).

**Análisis filogenéticos:** Los cromatogramas resultantes fueron editados con el programa BioEdit®. Se definió el grupo, A o B, utilizando las secuencias localizadoras correspondientes (aaaaaagtc para VRS A y aaaagaga para VRS B). Las secuencias de 270 nucleótidos, que corresponden a la segunda región variable del gen G, se alinearon con 116 secuencias de referencia de VRS A y con 95 secuencias de referencia de VRS B publicadas en GenBank, a las que se agregaron secuencias chilenas de años anteriores (comunicación personal). La alineación fue hecha con el programa Mega 3.1 con la opción de alineamiento ClustalW, en el caso de VRS A, usando los siguientes parámetros: Gap opening penalty=10, gap extensión penalty=0,2, Transition Weight=0,5 y delay divergent Gaps=30%. Para las secuencias del VRS B, el alineamiento se realizó manualmente en el mismo programa. Los árboles se obtuvieron con 139 secuencias de VRS del grupo A, y 124 del B en el mismo programa Mega 3.1, aplicando los métodos de distancia del vecino más próximo (Neighbor Joining,N-J) con el método de Kimura de 2 parámetros y de máxima parsimonia (MP). Para verificar la división de las ramas del árbol se realizaron remuestreos (bootstrap) con 500 replicas.

### **Análisis Estadístico.**

La estadística de este trabajo se hizo en el programa SigmaStat versión 3.1.

Se utilizó T test o Mann-Whitney para datos paramétricos, según correspondieran los datos a una distribución normal o no, para comparar edad entre los grupos de pacientes, días de hospitalización, días de oxígeno y % de FIO<sub>2</sub> máximo; en el caso de los criterios ingreso a UCI y ventilación mecánica se usó el método para datos no paramétricos  $\chi^2$  con una corrección Yates.

Los resultados obtenidos en la Citometría de flujo y la determinación de citoquinas se analizaron a través del método estadístico para datos paramétricos ANOVA para la comparación entre los grupos de evolución graves, leves y controles sanos, y para la comparación del total de pacientes infectados con VRS y controles sanos se usó los métodos para el análisis de datos paramétricos T test o Mann-Whitney según correspondan los datos a una distribución normal o no.

Los análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas obtenidas del gen G se realizó utilizando programas de tipo Bio-informáticos (BioEdit<sup>®</sup> y MEGA 3.1). La comparación con otras secuencias ya descritas, por los métodos de máxima parsimonia y N-J, permite establecer el genotipo correspondiente. La significancia de un genotipo u otro asociado a gravedad se evaluó mediante  $\chi^2$ .

## **RESULTADOS**

### **Características generales de los pacientes**

Se incluyó un total de 102 pacientes infectados con VRS al estudio. De ellos, 83 fueron evaluables para este estudio. El resto de ellos no fue incluido debido a que no se confirmó el diagnóstico de infección por VRS en el laboratorio o porque la muestra fue insuficiente para realizar el estudio de los marcadores que se presentan.

La distribución por edad y género de los casos VRS positivos y de la población control se presenta en el cuadro 1. No se observaron diferencias de género, pero sí en la edad. En los controles la mediana alcanzó los 5 meses, mientras que en los casos solo 2 meses ( $p=0,003$ ).

La distribución de los pacientes VRS positivos de acuerdo a los criterios de gravedad definidos en el estudio se observan en el cuadro 2. La distribución de los pacientes fue homogénea y cada uno de los indicadores empleados fue capaz de distinguir de manera significativa a los pacientes con enfermedad grave por VRS, de los pacientes con enfermedad leve o moderada. Entre ambos grupos de lactantes con VRS no observaron diferencias de edad ( $p=0,931$ ) y género.

### **Inmunotipificación de las subpoblaciones linfocitarias.**

La inmunotipificación de las subpoblaciones linfocitarias se realizó en 75 de los 83 pacientes VRS positivos evaluables en primera instancia, 37 graves y 38 leves. En 8 casos la muestra fue insuficiente o no se dispuso del hemograma necesario para conocer el recuento absoluto de linfocitos. De la misma manera, de los 26 lactantes sanos que se enrolaron, en sólo 19 fue posible evaluar las subpoblaciones linfocitarias (cuadros 3a y 3b). El análisis de los valores absolutos fue la principal referencia, pero debido a que los lactantes menores de un año presentan una alta dispersión en sus poblaciones celulares, también se consideró el análisis de los valores porcentuales en todos los marcadores utilizados. De esta manera podemos verificar o descartar las tendencias observadas que pudieron alcanzar diferencias significativas o también identificar tendencias que no se manifestaron en valores absolutos.

La comparación de los valores absolutos y porcentuales para las subpoblaciones linfocitarias estudiadas no mostró diferencias significativas entre los pacientes VRS positivos y los controles (cuadros 3a y 3b). Sin embargo, en la subpoblación de linfocitos inmaduros (células  $CD4^+CD3^-$ )

los pacientes infectados con VRS muestran valores absolutos y porcentuales menores que los controles sanos ( $p= 0,06$ ; gráficos 1 y 2), pero esta tendencia no alcanza a ser significativa para ninguno de los valores analizados.

Al comparar los valores absolutos de los pacientes VRS positivos que tuvieron una evolución grave con los controles sanos y los pacientes con enfermedad leve o moderada podemos observar que los primeros presentan recuentos de linfocitos T ( $LTCD3^+$ ) por debajo de las medianas de los otros 2 grupos de individuos, pero no de manera significativa ( $p=0.069$ ); (cuadro 3a y gráfico 3). Esta diferencia no se verifica en el análisis de los valores porcentuales. En relación a la población de linfocitos citotóxicos/supresores ( $LTc/s, CD3^+CD8^+$ ), en los pacientes graves esta subpoblación linfocitaria es significativamente menor que en controles y pacientes con evolución leve ( $p=0,03$ ), (cuadro 3a y gráfico 4). Esta disminución, aunque no significativa, también se observa en el análisis de los valores porcentuales (cuadro 3b). La disminución de esta subpoblación en particular, explica, de cierto modo, la tendencia a la disminución del recuento total de linfocitos T observada en los pacientes graves. Finalmente cabe destacar la población de linfocitos T helper ( $LTh; CD3^+CD4^+$ ); en esta no se alcanza a visualizar una tendencia clara en los resultado obtenidos. Sin embargo, en el grupo con infección leve los valores absolutos muestran una mediana considerablemente mayor que en el grupo de pacientes graves y muy similar al grupo control (cuadro 3a y gráfico 5).

### **Inmunotipificación de linfocitos vírgenes o naive, de memoria y activación.**

De los 83 lactantes enrolados en este estudio, la evaluación de esta población de linfocitos se completó entre 70 y 63 lactantes con infección por VRS y en 19 de los 26 controles. En los cuadros 4a y 4b se analizan los valores absolutos y porcentuales de los linfocitos vírgenes ( $CD45RA^+CD45RO^-$ ), linfocitos recién activados ( $CD45RA^+CD45RO^+$ ) y linfocitos de memoria ( $CD45RA^-CD45RO^+$ ). Además se incluyen subpoblaciones de linfocitos T activados (células  $CD3^+CD25^+$  y células  $CD3^+HLADR^+$ ).

Tanto en los recuentos absolutos, como en los valores porcentuales de la población de linfocitos vírgenes no se observan diferencias entre los pacientes VRS positivos y los controles ( $p= 0.764$  y  $p= 0.561$  respectivamente), como tampoco en el análisis realizado de acuerdo a la gravedad clínica de los individuos estudiados ( $p= 0.085$  y  $p= 0.617$  valores absolutos y porcentuales

respectivamente). En linfocitos recién activados (células RA<sup>+</sup>RO<sup>+</sup>), pero que aún no han alcanzado las características fenotípicas de un linfocito de memoria tampoco se observan diferencias significativas. Respecto a los linfocitos de memoria (CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>), los recuentos absolutos de los pacientes VRS positivos muestran valores muy inferiores a los valores observados en los controles. Estos bajos recuentos, que no alcanzan una diferencia significativa ( $p= 0.077$ ) se verifican con el análisis de los valores porcentuales ( $p= 0.012$ ). Al analizar de acuerdo a la gravedad de los pacientes, la diferencia se produce entre los pacientes graves y los controles. En efecto, los pacientes graves muestran valores absolutos ( $p= 0.017$ ) y porcentuales ( $p= 0.024$ ) que resultan significativamente menores que los controles sanos, que se traduce en una mayor inmadurez en esta población (cuadros 4a y 4b, gráficos 7 y 8).

El análisis de los linfocitos T activados donde hemos distinguido 2 subpoblaciones, CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CDHLADR<sup>+</sup>, la situación no es homogénea. No se observan diferencias para la subpoblación CD3<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup>, pero sí en los linfocitos T que expresan CD25<sup>+</sup>. Estas células se encuentran significativamente aumentadas en pacientes con VRS en comparación con los controles mostrando una alta tendencia en valores absolutos ( $p= 0.057$ ) y claramente significativos para los valores porcentuales ( $p= 0.01$ ). Es interesante destacar que las diferencias observadas y la mayor expresión de estas células, al valorar los recuentos absolutos, se concentra en los pacientes con VRS que tuvieron una evolución leve. Al contrario, en los pacientes con infección grave la activación de linfocitos T según el recuento en valores absolutos fue deficiente (*ver medianas graves y sanos*), (cuadros 4a y 4b, gráficos 9 y 10).

### **Inmunotipificación de Linfocitos NK (LNK).**

El análisis de los valores absolutos y porcentuales obtenidos de los LNK se presenta en las tablas 5a y 5b. De los 83 pacientes VRS se incluyeron en este análisis 60 lactantes y 15 de los 26 controles. Los valores absolutos de los LNK que expresan receptor para moléculas MHC I (CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>) fueron significativamente menores en los pacientes VRS positivos que en los lactantes sanos ( $p= 0.035$ ) (cuadro 5a, gráfico 11). Situación que se repite en el análisis de los valores porcentuales ( $p < 0.001$ , gráfico 12). Además, tanto en los casos leves como en los lactantes graves esta población está disminuida respecto de los controles sanos ( $p < 0.001$ ), (cuadro 5b). La misma población de células NK que expresa receptor para moléculas MHC I, pero que aún no ha sido activada (CD94<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup>) de los niños VRS positivos también muestran

valores absolutos y porcentuales menores que los controles sanos ( $p= 0.029$  y  $p< 0.001$  respectivamente). Esta diferencia es marcada en pacientes graves ( $p= 0.046$ ) y confirma con valores porcentuales ( $p<0.001$ ) (gráficos 13 y 14). Entre los LNK activados que expresan receptor para moléculas MHC I ( $CD57^+CD94^+$ ) no se observan diferencias entre población sana y lactantes con VRS, tanto para valores absolutos como en valores porcentuales. Al contrario, el número y porcentaje de células NK activadas, pero que no presentan receptores para moléculas MHC I ( $CD94^+CD57^+$ ) es significativamente mayor en pacientes VRS que en los controles, independientemente de la gravedad de estos pacientes ( $p= 0.031$  y  $p=0.002$  valores absolutos y porcentuales respectivamente) (gráficos 15 y 16).

### **Determinación de citoquinas**

Los resultados de las citoquinas los podemos ver en el cuadro 6. En ella podemos ver el número total de cada grupo para cada determinación. Debido a que la adquisición de controles sanos era dificultosa, priorizamos los controles sanos en algunas citoquinas y en otras como IL-17 usamos un mínimo de 10. En el anexo 5 se observan las curvas de calibración de los ELISAs utilizados a su vez como controles de la técnica. Todas las curvas tuvieron un  $r^2$  mayor a 0,99 y solo en dos casos se utilizó la curva polinomial de 2º grado; en el caso de INF- $\gamma$  debido a los bajos valores detectados por el Kit y así aprovechar al máximo los valores cercanos a 0 y en IL-6 por la lectura de valores máximos que se alejan del trayecto lineal de las absorbancias obtenidas con el ELISA.

El análisis de TNF- $\alpha$  se realizó en 61 pacientes con VRS y 13 controles. No se detectaron diferencias entre los pacientes VRS positivos y los controles. Tampoco encontramos diferencias en el análisis de ANOVA, que comparó pacientes graves, leves y sanos. Sin embargo, como se observa en el gráfico 17 los niños graves tienden a tener una menor concentración que leves y sanos, a pesar de incluir dos pacientes cuyas concentraciones fueron muy altas respecto a los otros pacientes graves. Estos dos pacientes alcanzaron un puntaje clínico más alto, 12 y 14 puntos, pero se encuentran muy alejados del intervalo del 95% de confianza, además fueron pacientes que tuvieron una infección intrahospitalaria con bacterias. La exclusión del análisis de estos dos casos permitió apreciar mejor la tendencia hacia menores concentraciones de TNF- $\alpha$  en el grupo de los pacientes graves respecto a los sanos (cuadro 6\* y el gráfico 18), aunque sin alcanzar significación estadística ( $p=0,07$ ). Al excluir estos pacientes del análisis general, entre

los grupos VRS VRS totales y sanos, también se produce una tendencia ( $p=0,089$ ) con una menor concentración de esta citoquina en el grupo con VRS.

El análisis de IL-6 (gráfico 19) contó con 52 pacientes con primoinfección por VRS y 23 lactantes sanos. Entre el total de pacientes infectados con VRS y controles sanos se dieron diferencias significativas ( $p= 0.001$ ), donde el grupo de pacientes VRS graves fue el que más influyó en esa diferencia ( $p= 0.003$ ). Entre el grupo de pacientes leves y graves, no se observan diferencias significativas, a pesar de la baja mediana del grupo con menor gravedad. También podemos observar en el grupo de controles sanos una baja producción de esta citoquina con una mediana de 0 pg/ml.

La citoquina IL-13 (gráfico 20) se analizó en 63 pacientes VRS y 14 controles sanos. Se observan diferencias significativas entre los pacientes infectados por VRS y los lactantes sanos ( $p= 0.005$ ). En los pacientes con VRS esta interleuquina mostró valores más bajos que los pacientes sanos, especialmente los lactantes con enfermedad leve ( $p=0.014$ ). Pese a las bajas concentraciones detectadas, el alto nivel del  $r^2$  de la curva de calibración (anexo 5), permite descartar un error técnico que haya afectada solo a las muestras durante el procedimiento.

El estudio de la quimioquina IL-8 (gráfico 21) se realizó en 61 pacientes VRS positivos y 15 controles. Los niños con enfermedad grave por VRS tuvieron concentraciones de IL-8 más elevada que los controles sanos, igualmente los lactantes con enfermedad leve ( $p= 0.007$ ). No hubo diferencias entre lactantes graves y lactantes sanosleves. Sin embargo, los valores obtenidos fueron bastantes bajos lo que podría llevar a desconfiar en los resultados, pero ya que la curva de calibrado tuvo un alto  $r^2$  los valores son confiables, con lo que también podemos descartar errores técnicos (anexo 1).

Para las citoquinas INF- $\gamma$  (gráfico 23), IL-10 (gráfico 24) e IL-17 (gráfico 25) no hubo diferencias significativas entre pacientes con VRS y controles sanos.

## **Genotipificación**

Se determinó la secuencia nucleotídica de un fragmento del gen G de VRS en 23 aislados del grupo A y en 29 del B (eficiencia= 51%).

### VRS del grupo A

El 79,2% (214/270) de las bases de las secuencias nucleotídicas de los VRS A chilenos del periodo 2005-2006 (cuadro 7) fueron conservadas, sin que se detectaran deleciones ni inserciones. Las distancias genética entre ellas fueron 0.00 - 0.37 (cuadro 8) y entre las secuencias deducidas de aminoácidos (cuadro 9) de 0.0 a 0.36, entre VRS chilenos, y hasta 0.449 con las cepas de referencia A2 y Long (cuadro 10).

Los árboles filogenéticos obtenidos mediante NJ y máxima parsimonia de las cepas chilenas y las 118 cepas de referencias (Figs. 1 y 2) fueron similares y coincidieron con los previamente publicados (Arbiza *et al*, 2005). Los virus chilenos se agruparon en dos genotipos: GA1 (0,27 %) y GA2 (42,3%) (cuadro 11, gráfico 25).

### VRS del grupo B.

El 84,2% (283/336) de las bases nucleotídicas de los VRS B chilenos analizados (cuadro 12) fueron conservadas. Las distancias genéticas entre ellas estuvieron en un rango entre de 0-17,6% (cuadro 13). Las distancias de las secuencias aminoacídicas deducidas (cuadro 14) variaron entre 0 y 23,8% entre los VRS chilenos y entre 22,2% a 42,9% respecto a la cepa de referencia CH18537 (cuadro 15).

Los árboles filogenéticos obtenidos por NJ y máxima parsimonia de las cepas chilenas y 97 cepas de referencias (Figs. 3 y 4) fueron coincidentes y similares a lo previamente descrito. Se identificaron 2 genotipos entre los aislados chilenos: GB Uru1 y GBA. Durante el 2005, predominó el grupo B, con una mayor prevalencia del genotipo GBA (76,6%; tabla 11, gráfico 25). Las cepas chilenas de este genotipo también contienen la inserción de 60 nucleótidos, característica de este grupo, y que corresponde a una duplicación casi exacta de los 60 nucleótidos siguientes. Las distancias de sus secuencias nucleotídicas estuvieron entre 0 y 0,184.

Las cepas agrupadas como Uru1, un nuevo genotipo descrito en Uruguay, presentaron una inserción de 9 nucleótidos, 3 nucleótidos más que la inserción descrita en las cepas uruguayas (Mon/7/01), lo que determinó la presencia de dos lisinas extras en la secuencia deducida de aminoácidos (cuadro 14). Las distancias nucleotídicas de estas cepas chilenas fue de 0 a 0,092 y de 0,005 a 0,087 respecto a cepas chilenas de años anteriores y de 0,043 a 0,164 con respecto a las cepas de referencia.

De acuerdo a nuestros resultados no se encontraron diferencias significativas entre la gravedad clínica de los pacientes y los genotipos involucrados en las infecciones ( $p=0,238$ ; gráfico 26). Sin embargo, el bajo número encontrado de algunas cepas como las URU1, no permiten concluir respecto a la asociación entre gravedad y ese genotipo.

## **DISCUSIÓN**

En este trabajo se analizó la problemática inmuno-linfocitaria de la primoinfección por VRS adquirida en la comunidad en lactantes chilenos menores de un año. El diseño propuesto nos permitió evaluar el comportamiento de citoquinas plasmáticas, el recuento de poblaciones linfocitarias, con algunos marcadores de activación, y el genotipo involucrado en las infecciones entre los distintos individuos estudiados. Si bien, la infección por VRS produce preferentemente una enfermedad localizada en el aparato respiratorio, su difícil acceso, especialmente el pulmón, nos obligó a estudiar el comportamiento del sistema inmune a través de una vía sistémica, a partir de muestras de sangre periférica. Esta última vía es de fácil acceso clínico y las observaciones obtenidas desde estas muestras, las podemos extrapolar a los fenómenos inmunológicos que están ocurriendo a nivel pulmonar.

La construcción de los grupos de gravedad tuvo la dificultad en los casos que obtuvieron 6 y 7 puntos, donde la diferencia clínica de un punto es muy estrecha. Sin embargo, este problema siempre se presentaría, excepto si solo se tomara uno o dos criterios para discernir entre graves y leves, por ejemplo los más utilizados en otros estudios es la necesidad de oxigenar a los pacientes. También se consideró más de un criterio clínico pues pensamos que la gravedad de un cuadro no está subordinada a una sola consecuencia clínica. Por otro lado, al comparar las características de los grupos leves y graves (cuadro 2) se observa que los dos grupos son diferentes en todas las características medidas, lo que reafirma que la construcción de los grupos fue eficiente. Con respecto a la edad de los pacientes (cuadro 1), observamos diferencias entre el grupo control y los pacientes infectados por VRS, esta diferencia observada entre ambos grupos podría ser una dificultad para el estudio. Sin embargo, en ambos grupos la mediana fue inferior a los 6 meses, por lo que hemos aceptado esta dificultad, debido a lo delicado que es tomar muestras de sangre a niños sanos con tan poco meses de edad y sin una causal ampliamente justificada.

Desde el punto de vista inmunológico, a esta edad, muestra distintos perfiles de respuesta en sus citoquinas (Kristjansson *et al.*, 2005), donde la predisposición genética del hospedero parece ser uno de los factores relevantes, como también el tipo de patógeno que induce la respuesta inmune. Desde los ensayos con vacuna inactivada de VRS y en los estudios de otras infecciones virales, se conoce que en general los virus inducen preferentemente un perfil de

citoquinas de tipo Th<sub>1</sub>, con una mayor producción de IFN- $\gamma$ . Sin embargo, en los pacientes infectados por VRS, especialmente en aquellos que presentan una evolución grave, se observa una mayor producción de citoquinas IL-4 e IL-6, ambas citoquinas de respuesta tipo Th<sub>2</sub> (Maldonado *et al.*, 2001). Así lo demuestran los antecedentes de estudios *in vitro* como *in vivo*, donde la infección por VRS induce una respuesta inmune distinta a la de otros virus. Sin embargo, son pocos los estudios *in vivo* donde se analiza la respuesta de subpoblaciones linfocitarias y algunos marcadores de activación directamente en niños infectados con VRS.

La respuesta de subpoblaciones linfocitaria vista en el total de niños infectados con VRS en comparación con los controles sanos no tuvo diferencias significativas (Cuadro 3a y 3b). Al separar los grupos de estudio según la evolución clínica de los pacientes, graves o leves, y los controles sanos, se manifiestan diferencias en las comparaciones de los linfocitos T totales (LT) donde el grupo leve presenta un mayor número de LT que el grupo de pacientes graves (gráfico 3). Esta diferencia se obtiene por la disminución de la población de linfocitos T citotóxicos o supresores (LTc/s)(gráfico 4). Es interesante destacar también que en los pacientes graves no hubo un incremento de la población de linfocitos T helper como era de esperarse frente a una infección (gráfico 5). Estas dos subpoblaciones se encuentran disminuidas en el grupo de pacientes VRS graves. Estos resultados sugieren un gran compromiso de la respuesta inmune celular en los primeros días de la infección, respuesta que podría condicionar la evolución clínica de la enfermedad en los días siguientes.

Los resultados obtenidos en la población de LTh difieren de los estudios realizados en ratones donde la eliminación de esta población celular disminuiría los efectos patogénicos del virus y por ende la presentación clínica de la enfermedad (Graham *et al.*, 1991; Connors *et al.*, 1992; Alwan *et al.*, 1992), este es el consenso más aceptado en los estudios. En nuestros pacientes, aquellos que tuvieron una evolución leve, tuvieron una mayor población de LTh respecto de los lactantes graves, pero esta diferencia no fue significativa por lo que no se puede concluir sobre esta población más allá de los resultados (Cuadro 3a; gráfico 5). Sin embargo, los menores recuentos de LTh observados en el grupo grave, obliga a plantear nuevos estudios de esta población celular en pacientes humanos debido a la diferencia observada con respecto a los modelos animales.

Asimismo, en el modelo murino, la población de LTc/s es el principal encargado de la eliminación viral y su actividad se correlacionaría positivamente con la gravedad de la enfermedad (Connon *et al.*, 1988; Graham *et al.*, 1991). Por el contrario, en nuestro estudio, se observó una menor población de células LTc/s en los lactantes graves respecto de los pacientes con enfermedad leve y los controles (cuadro 3a; gráfico 4). Este compromiso de la población de LTc/s con respecto al desarrollo clínico también fue observado por Welliver *et al.* (2007), quienes demostraron la profunda depleción de esta población celular en tejido pulmonar de lactantes que fallecen por VRS, lo cual no fue manifestado en lactantes muertos infectados por virus influenza. En otro estudio de la población chilena durante el período 2002-2004 en donde se midió a través de citometría de flujo subpoblaciones linfocitarias se observó que la población de LT CD8<sup>+</sup> supresores de los pacientes graves estuvo disminuida (Fondecyt n° 1020544). Lamentablemente en ese estudio no se tuvo acceso a valores absolutos y no hubo diferencias en la población de LT CD8<sup>+</sup> totales como en nuestro estudio. Dado estos antecedentes podemos pensar que los recuentos menores observados en linfocitos T CD8<sup>+</sup> en pacientes graves podrían deberse a una disminución de la subpoblación supresora que cumpliría con una función regulatoria sobre el sistema inmune, no obstante, no podemos descartar que la menor presencia de LTc/s en pacientes con enfermedad grave se relacione con una falta de eliminación viral eficaz, que podría traducirse en una evolución más grave de la enfermedad, esta mayor carga viral asociada a cuadros de graves, fue encontrada en el estudio de Welliver *et al.* (2007) en pacientes fallecidos. También debemos considerar que las diferencias con los modelos animales obedecen por un lado, a que en este estudio se evalúa la respuesta inmune directamente en niños infectados naturalmente desde una comunidad y por otro que aquí observamos el comportamiento del sistema inmune desde una ventana periférica y no directamente en el aparato respiratorio, como se realiza frecuentemente en estudios en animales.

Por otro lado, los resultados obtenidos en las poblaciones de LTh y LTc/s podrían coincidir con estudios de pacientes asmáticos en los cuales se ha encontrado una deficiencia de LT supresores más significativa que la disminución de la población de LTh, medidos también en sangre periférica. La deficiencia de LT supresores en los casos asmáticos tendría como consecuencia una producción exagerada de IgE, molécula asociada con la patogenia del asma (Kus *et al.*, 1985; Walker *et al.*, 1991; Schauer *et al.*, 1991). Lamentablemente nuestro estudio

no midió directamente LT supresores como para confirmar esos resultados en nuestros pacientes, aunque por los antecedentes anteriormente dados, la población de LT supresores en la evolución clínica de los pacientes infectados con VRS parece ser muy importante y futuros estudios debiesen esclarecer su papel en la respuesta inmunológica.

Con respecto a linfocitos con marcadores  $CD4^+CD3^-$  no hay antecedentes sobre su medición en otros trabajos. En este trabajo se pudo observar una disminución de esta población con respecto a los controles sanos, en especial en el grupo grave (cuadro 3a y 3b; gráficos 1 y 2). La función de esta población está asociada a la organización de tejidos linfoides durante el desarrollo de la respuesta inmune, y desde hace poco se les ha asociado con la función de mantener una actividad helper apoyando la maduración del LB en los centros germinales (Lane *et al.*, 2005). También se les ha asociado con la diferenciación de la respuesta  $LTh_2$ , pues la presencia de receptores de  $CD4^+CD3^-$  en el LTh está aumentada en los  $LTh_2$  en presencia de IL-4 (Kim *et al.*, 2003). Con estos antecedentes, no es posible descartar que la disminución de esta población celular en pacientes infectados con VRS, se deba a una mayor concentración de estas células en los tejidos infectados y, por ello su número en circulación resultara disminuido. Esta hipótesis concordaría con los significativamente mayores niveles de IL-6, citoquina del tipo Th2, detectados en pacientes graves, de la cual nos referiremos más adelante. Por otro lado, no se observó un aumento de linfocitos en maduración o de LB por lo que no sabemos claramente que está sucediendo en esta población dentro del pulmón, quizás estudios en el futuro directos sobre esta población, idealmente de tipo dinámico, nos ayuden a explicar su tendencia a la disminución en circulación.

El marcador CD45 representa al antígeno leucocitario común que está implicado en la transmisión de señales intracelulares. De él existen diferentes isoformas cuya expresión en la superficie de los linfocitos T cambia durante la diferenciación celular. La isoforma CD45RA, caracteriza a las células T vírgenes y se pierde progresivamente al ser estimulados los linfocitos, dando paso a la isoforma CD45RO asociada con los linfocitos T de memoria (Sánchez-Guerrero *et al.*, 1998). Midiendo los recuentos de células que expresan estos marcadores de superficie celular podemos evaluar el estado de maduración del sistema inmune de los individuos. En estudios en pacientes asmáticos se observa una tendencia al aumento de LT de memoria en sangre periférica (Poulter *et al.*, 1992; Sánchez-Guerrero *et al.*, 1998; Corrigan *et al.*, 1993), al

contrario de los valores menores de LT de memoria que nosotros detectamos en el grupo grave respecto a los controles sanos e, incluso, a los lactantes con enfermedad leve (cuadro 4a y 4b; gráficos 7 y 8). Una posible explicación, independiente de la infección viral, es la diferencia de edad, entre el grupo estudio y los controles. Sin embargo, el menor número de LT de memoria de los pacientes que tuvieron una enfermedad grave, sólo puede ser explicada por una mayor inmadurez inmunológica de estos niños, lo que estaría jugando un rol importante en la evolución de la enfermedad ya que esta inmadurez no se observa en el grupo de niños con enfermedad leve. Lo sucedido con los LT CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, LT en proceso de maduración, también es una sorpresa. Esta población tiende a estar disminuida en los grupos de pacientes infectados con VRS respecto de los controles sanos (cuadro 4b). Este fenómeno puede estar asociado también a la diferencia de madurez inmunológica de los lactantes con VRS, donde se observa poca movilización de LT vírgenes hacia LT de memoria, a pesar de la infección con VRS. Para establecer mejor estas diferencias, es necesario evaluar la instalación de memoria inmunológica desde el inicio de la infección, durante la instalación de los síntomas y durante la efervescencia de la enfermedad.

El antígeno de superficie celular CD25 se asocia a la activación temprana de linfocitos T y se trata de una molécula asociada al receptor de interleuquina 2. Además desde hace un tiempo, la molécula CD25 se ha asociado a una función T regulatoria principalmente en células CD4<sup>+</sup> (Shevach, 2000) y últimamente en células CD8<sup>+</sup> (Bienvenu *et al.*, 2005), los cuales tendrían una vital importancia en enfermedades de tipo autoinmunes. En este estudio, en general hubo un aumento de este marcador en los pacientes infectados con VRS, pero solo en el grupo leve este aumento fue significativo con respecto al grupo control (cuadro 4a y 4b; gráficos 9 y 10). A pesar que no hubo diferencias significativas entre los grupos leves y graves, el grupo leve muestra una tendencia al incremento del marcador CD25 por sobre el grupo grave. Estudios en pacientes asmáticos adultos, este marcador aparece aumentado con respecto al grupo control (Emel *et al.*, 2001), resultados que difieren a los nuestros realizados en niños. En lactantes se ha encontrado una disminución de la población CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Román *et al.*, 1997) durante los episodios graves de infección respiratoria baja con VRS, efectivamente, si bien en nuestro estudio no se midió esta población directamente, la población CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> estuvo disminuida en el grupo grave mientras que la población CD25<sup>+</sup> fue especialmente mayor en pacientes leves

que en pacientes graves. A la luz de estos antecedentes parece ser que el aumento del marcador CD25 está asociado a un cuadro clínico de menor gravedad.

Con respecto al marcador HLA-DR no observamos diferencias (cuadro 4a). Esto no debería resultar sorprendente, ya que se trata de un marcador de activación tardía y la medición en nuestros pacientes se realizó dentro de los primeros 5 días de enfermedad. Podríamos inferir entonces, que de haber diferencias, estas no se observarían hasta más avanzada la evolución de la infección. Quizás un estudio de seguimiento de los pacientes podría esclarecer si se produce alguna diferencia en este marcador durante el curso de la enfermedad.

La población total de linfocitos natural killer (LNK) no presentó diferencias entre los grupos estudiados (cuadro 3a y 3b), aunque, si hubo diferencias en su marcador de reconocimiento de la molécula MHC clase I (Concom-Góngora *et al.*, 2004; López, 1999) (cuadro 5a y 5b). Esto significa que si bien el número de células NK no varía significativamente ante la infección por VRS, si varían sus capacidades. El marcador asociado al reconocimiento de la MHC clase I (CD94<sup>+</sup>) muestra una expresión disminuida en la población infectada con VRS, sobre todo en la población de pacientes graves, tanto en la población total de linfocitos NK (gráfico 11 y 12), como en la población de linfocitos NK no activados (gráfico 13 y 14). La población de linfocitos NK activados que expresan la molécula de reconocimiento de antígenos MHC clase I también aparecen disminuidos, aunque no de manera significativa respecto de los controles sanos (cuadro 5a y 5b). Con estos resultados podemos hipotetizar que la infección por VRS es capaz de disminuir la expresión de la molécula CD94 en los pacientes infectados, disminución que resulta más significativa en el grupo de pacientes graves. Con respecto al marcador de activación de las células NK, este no mostró diferencias significativas entre los grupos, al contrario de lo que esperábamos. Sin embargo, cuando observamos los linfocitos NK activados, pero no asociados al reconocimiento de antígenos MHC clase I, estos están aumentados en los pacientes infectados respecto de los controles sanos (gráfico 15 y 16). En resumen, ni el número de linfocitos NK como tampoco su activación son significativamente diferentes entre los grupos. Sin embargo, la molécula asociada al reconocimiento de la MHC clase I tiende a estar disminuida en los linfocitos NK. Esta situación podría afectar la discriminación de estas células entre células sanas y células infectadas provocando un descontrol en la función efectora de los linfocitos NK, especialmente en la población que evoluciona con una enfermedad grave.

En el estudio de interleuquinas (IL) se usó la técnica de ELISA, la cual está sujeta a factores variables que determinan en gran medida los resultados obtenidos. La variabilidad tanto intra como inter ensayo está sujeta al error humano, la experiencia, la calidad de los reactivos, la temperatura ambiental, llegando incluso a diferencias de más del 50% entre diferentes manufacturas (Aziz *et al.*, 1999), debido a esto es de una gran importancia los resultados obtenidos en la curva de calibración de cada ELISA, puesto que sirven de controles para la técnica (anexo 2). Se cuantificaron un total de 7 interleuquinas. Un problema que tuvimos que resolver fue la organización de los sueros de los controles sanos en cada una de las interleuquinas, debido a que no obtuvimos un gran número de alícuotas de este grupo. Por esta razón algunos ELISAs se realizaron con un número bajo de controles sanos.

De la población LTh<sub>1</sub> se cuantificó INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (cuadro 6). Del primero no se obtuvieron diferencias significativas aunque si hubo una tendencia en el grupo grave de presentar valores menores que el grupo de pacientes con enfermedad leve y que los controles sanos, tendencia observada ya en varios estudios *in vitro* (Copenhaver *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2006; Graaf *et al.*, 2005) e *in vivo* (Fernández *et al.*, 2005; Bont *et al.*, 1999). En ellos la disminución de INF- $\gamma$  se asocia a la infección por VRS y a la gravedad clínica de los pacientes, por lo tanto pese a que en nuestro estudio no observamos diferencias significativas (gráfico 22), los resultados son los esperados para esta citoquina. En otras infecciones respiratorias causadas por virus, como adenovirus, la producción de INF- $\gamma$  aumenta respecto de los controles sanos (Fernández *et al.*, 2005). También la producción y presencia de INF- $\gamma$  se ha interpretado como una respuesta protectora, especialmente frente a la exacerbación de la respuesta inmune liderada por subpoblación LTh<sub>2</sub>, por eso la no respuesta a través de INF- $\gamma$  por los pacientes infectados también es un dato significativo a la hora de evaluar el sistema inmune de los pacientes. Con respecto al TNF- $\alpha$  se ha encontrado dos interpretaciones: una probando la importancia del TNF- $\alpha$  en la fase de activación de la respuesta inmune en la cual se necesitan ciertos niveles de esta citoquina para lograr una activación de macrófagos, LB y LNK, ya que cumple como una de las principales moléculas proinflamatorias de la respuesta de LTh<sub>1</sub>. El otro aspecto de esta interleuquina es su importancia en la fase efectora de la respuesta inmune, donde tanto un exceso de producción de TNF- $\alpha$  como una producción sostenida de la misma llevan a una exacerbación de la respuesta efectora (Rutigliano y Graham, 2004; Hoebee *et al.*, 2004). En nuestro trabajo se observó una tendencia a la disminución de esta citoquina en el grupo de

pacientes graves comparado con los otros grupos de individuos (gráfico 17). En solo dos casos graves se observó una producción casi 5 veces mayor que el resto del grupo. En ellos el puntaje clínico correspondió a los más altos del grupo grave. Nosotros pensamos que estas muestras pueden corresponder a la interpretación de que un exceso de TNF- $\alpha$  exagera la respuesta efectora y por esta razón esos dos pacientes tuvieron una evolución grave. Sin embargo, no podemos descartar una sobre infección intrahospitalaria por otro patógeno durante su evolución y con ello una exacerbación de TNF- $\alpha$ . Descartando estos dos pacientes del análisis, en los pacientes graves por VRS observamos una menor producción de TNF- $\alpha$  (gráfico 18). La menor producción de estas dos citoquinas medidas en sangre periférica puede estar asociada a una respuesta LTh<sub>1</sub> disminuida tal como lo planteamos en nuestra hipótesis.

Con respecto a la respuesta de LTh<sub>2</sub> se cuantificaron tres citoquinas, IL-10, IL-6 e IL-13 (cuadro 6). La IL-10 es uno de los principales anti inflamatorios de la respuesta Th<sub>2</sub> que contrarrestaría la capacidad proinflamatoria de las citoquinas con perfil Th<sub>1</sub> (Moore *et al.*, 2001). Sin embargo, en la actualidad la real actividad de esta citoquina y su significado están siendo estrechamente revisados. Es así como nuestros resultados coinciden con estudios anteriores tanto in vivo (Fernández *et al.*, 2005) como in vitro (Pinto *et al.*, 2006), en los cuales no observamos diferencias significativas (gráfico 23). Sin embargo, por otra parte y a pesar de los resultados obtenidos para esta citoquina, cuando se han estudiado polimorfismos del gen de IL-10 y su relación con las gravedad clínica de pacientes con VRS, si se observa una participación de esta citoquina en el desarrollo de la enfermedad (Hoebee *et al.*, 2004).

La IL-6 ha sido estudiada y asociada con la infección con VRS en estudios anteriores. En nuestro estudio confirmamos la participación de IL-6 en la inmunopatogénesis (Matsuda *et al.*, 1995; Arnold *et al.*, 1995) de la enfermedad. En efecto, en el grupo de niños graves es en quienes obtuvimos los valores más altos de esta citoquina y de manera significativa con los controles sanos (gráfico 19). Si bien, la comparación con el grupo de lactantes con enfermedad leve no fue significativa, la producción de esta citoquina resultó mucho menor a la observada en los pacientes graves. La IL-6 está asociada al incremento de permeabilidad vascular, a leucocitosis, síntesis de proteínas de fase aguda y lo más importante relacionado a nuestra hipótesis es su participación en una respuesta de tipo Th<sub>2</sub>.

La IL-13 es un mediador de la inflamación alérgica, que aumenta la proliferación de eosinófilos y un inductor de la secreción de IgE por los LB. También está muy asociada a la activación de la respuesta Th<sub>2</sub>, en especial en los asmáticos con una actividad conjunta con IL-4 (Grunig *et al.*, 1998; Wills-Karp *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999). Este trabajo encontró diferencias entre los grupos leves y controles sanos, demostrando que una menor concentración de IL-13 en la fase temprana de la infección está relacionada con una evolución clínica más leve (gráfico 20). Esto coincide de cierta manera con los estudios hechos en niños infectados con VRS y en niños asmáticos en los cuales las bronquitis severas se asocian a una mayor concentración de esta citoquina (Johnson *et al.*, 2003). Sin embargo, nuestros resultados no asociaron gravedad con mayor concentración de esta citoquina y solo podemos concluir que niños leves tienden a una menor concentración de esta interleuquina.

La IL-8 corresponde a un factor quimiotáctico principalmente de neutrófilos e induce su desgranulación en las zonas de inflamación. Sin embargo, su rango de acción es más amplio abarcando linfocitos, monocitos, células endoteliales y fibroblasto, por lo que se ha planteado su participación en procesos inflamatorios graves y crónicos (Mukaida, 2003). De esta manera la IL-8 se asocia a cuadros inflamatorios como es el caso de la bronquitis en niños infectados por VRS (Arnold *et al.*, 1994; Mastrorarde *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 1999). Este trabajo coincide con los estudios sobre IL-8, la cual se presenta en mayor concentración en los pacientes infectados, tanto en leves como en graves (cuadro 6; gráfico 21). También en este trabajo, al igual que en el de Bont *et al.*, nosotros encontramos diferencias entre pacientes ventilados y no ventilados ( $p < 0.001$ ) con mayores concentraciones de IL-8 en pacientes ventilados mecánicamente. Con estos resultados corroboramos a IL-8 como un marcador de gravedad, en especial desde el punto de vista de la necesidad de ventilación mecánica, en etapas tempranas de la infección. Futuros estudios debieran diseñarse para validar la utilidad clínica de este marcador en VRS y otras infecciones respiratorias.

La IL-17 corresponde a una citoquina de estudios recientes asociada a una respuesta de LTh llamada Th<sub>17</sub>, la cual responde con un perfil de citoquinas diferentes y antagonistas en relación a las conocidas respuestas Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub> (Weaver *et al.*, 2006). En el último tiempo se ha asociado a enfermedades autoinmunes como la psoriasis, artritis reumatoidea y otras patologías antiguamente asociadas a respuestas inflamatorias del tipo Th<sub>1</sub> (Kikly *et al.*, 2006). Sin

embargo, hoy se sabe que Th<sub>17</sub> corresponde a un perfil de respuesta inmune diferente. En este trabajo se cuantificó la concentración de esta citoquina con la idea de evaluar su participación en la respuesta inmunológica en los niños infectados por VRS, debido a lo significativo que fue la cuantificación de IL-6 (Kikly *et al.*, 2006), ya que la actividad de ambas citoquinas estarían relacionadas en el perfil de respuesta tipo Th<sub>17</sub>. Lamentablemente, los resultados no fueron orientadores. Pensamos que debido a lo novedoso de la cuantificación de esta interleuquina los valores que arrojan los ELISAs todavía no son confiables ya que el método todavía requiere de mejor calibración. La base de esta conclusión está sustentada en lo bajo de las lecturas obtenidas por ELISA y las pocas compañías que tienen dentro de sus productos Kits para la cuantificación de esta citoquina. Sin embargo, parece interesante su estudio junto con las otras interleuquinas asociadas a la respuesta Th<sub>17</sub> como son IL-23 y TGF-β<sub>1</sub>.

En resumen en el análisis podemos observar un perfil de citoquinas en los pacientes graves: con una tendencia a una menor concentración de IFN-γ, TNF-α y un aumento de la IL-6 e IL-8. Al contrario, los pacientes leves se caracterizaron por una disminución de IL-13 y un aumento de IL-8. La respuesta de citoquinas en general podemos ver que es muy baja excepto en IL-6 e IL-8, esto puede estar asociado al menor recuento de células linfocíticas en pacientes graves que observamos en este estudio, como es el caso de LT en especial LTc/s y en el marcador de activación CD25 con respecto al grupo leve. Estos resultados coinciden con lo encontrado en niños fallecidos con VRS en los cuales se encontraron niveles muy bajos de citoquinas como también de células T (Welliver *et al.*, 2007). Por lo tanto, al parecer la respuesta inmunológica a la infección con VRS que determina un cuadro clínico grave, no está necesariamente subordinado a un perfil de respuesta inmunológica exacerbado como se piensa hace muchos años. Más bien, al parecer se asocia a una respuesta inmune inadecuada, exacerbada en algunos factores inmunológicos y disminuidos en otros claves, como lo son los LT, para un control normal de la infección, esto según como hemos observado el comportamiento de los pacientes leves y graves en este estudio.

Los análisis filogenéticos realizados permitieron establecer los genotipos de VRS aislados de niños infectados en un período de 2 años en Santiago, Chile. El predominio de virus del grupo B observado en uno de estos años (gráfico 25) es un fenómeno detectado en forma esporádica en el mundo y que rompe la ciclicidad del aumento del grupo B en años pares (1994, 1998 y 2002).

Palominos *et al.*, 2004) detectada en los programas de vigilancia de los últimos 12 años en nuestro país. Estos aumentos de VRS B cada cierto tiempo pueden obedecer a presiones selectivas de parte del sistema inmunológico del hospedero, la cual no solo es observada con el cambio de grupo sino también con cambios en los genotipos predominantes en cada período.

El genotipo BA, predominante en el 2005, se ha descrito en forma reciente en Buenos Aires (Trento *et al.*, 2003) y, en Chile entre los años 2001-2003 (Luchsinger, 2005). Al parecer es un subgrupo que se está estableciendo a través del tiempo, pero que hasta ahora no se ha asociado a cuadros de mayor o menor gravedad, observación que ratificamos en este estudio. Entre los VRS del grupo A, el subgrupo predominante fue el GA2, a diferencia del predominio de GA5 detectado en estudios anteriores chilenos. Este cambio probablemente se deba a una presión selectiva de parte de los hospederos.

Dentro de los virus chilenos, uno agrupó muy cerca de la cepa de referencia Long, un aislado de la década del '60 que es cercana al genotipo GA1. Ambas cepas sólo difieren en un aminoácido, y puesto que son tan distantes en el tiempo, es posible plantear que VRS no solo evoluciona divergentemente sino también en forma convergente.

Las 3 cepas chilenas agrupadas como URU1 presentaron una inserción de 9 nucleótidos, tres más que las descritas en Uruguay, determinando la inserción de 2 nuevos aminoácidos. Aunque los niños infectados con estos virus no desarrollaron una enfermedad grave, su pequeño número no permite concluir sobre su asociación con la gravedad clínica.

Como es frecuente en los virus ARN, VRS es capaz de mutar y presentar inserciones nucleotídicas en su genoma. Esta gran variabilidad, que puede expresarse en cambios antigénicos, explicaría las frecuentes reinfecciones por este virus y determina una dificultad para el desarrollo de una vacuna eficiente basada en la glicoproteína G del virus.

Respecto a la gravedad clínica de la enfermedad por VRS, los estudios publicados son discordantes, y es así como algunos asocian una mayor gravedad al grupo A (Walsh *et al.*, 1997; Hall *et al.*, 1990) y otros al grupo B (Hornsleth *et al.*, 1998; Simoes, 1999). En nuestro estudio, no encontramos una asociación entre genotipo y cuadros clínicos de gravedad (gráfico

26), lo que coincide con lo anteriormente observado en trabajos nacionales (comunicación personal).

## CONCLUSIONES

- 1) Los resultados apoyan la hipótesis de que un perfil de respuesta Th<sub>1</sub> disminuido está asociado a cuadros de mayor gravedad. Sin embargo, no fueron las únicas citoquinas disminuidas. Citoquinas de tipo Th<sub>2</sub> también resultaron disminuidas a excepción de IL-6, demostrando en general, una respuesta efectora insuficiente del sistema inmune.
- 2) La respuesta de linfocitos T estuvo disminuida en los pacientes graves, sobre todo en la población de LTc/s y población de LT activados (CD25+). También la falta de respuesta observada en los recuentos de las poblaciones linfocitarias es una manifestación más de la pobre respuesta efectora de los individuos. Debido a estos resultados proponemos que la gravedad de la infección por VRS está asociada a una ineficiente respuesta inmune adaptativa.
- 3) Aquellos pacientes con un menor recuento de linfocitos de memoria tienden a desarrollar una enfermedad más grave. A juzgar por los resultados esta inmadurez del sistema inmune podría estar asociada a una menor capacidad efectora del sistema inmunológico.
- 4) La respuesta de LNK en la infección con VRS está falta del reconocimiento del sistema MHC clase I por la ausencia del antígeno CD94, lo cual podría explicar una respuesta deleterea e indiscriminada de LNK sobre el pulmón del hospedero.
- 5) La genotipificación de las cepas involucradas en las infecciones no asoció genotipos particulares con cuadros de mayor gravedad.
- 6) La presión selectiva hacia el VRS produce un cambio en los genotipos dominantes a través de los años como también favorece la aparición de nuevas cepas. El grupo más afectado por esos cambios fue el grupo de VRS B con nuevas inserciones y en el cual hubo una gran prevalencia del nuevo genotipo BA. El grupo de VRS A se comportó más estable, pero tuvo una mayor prevalencia del genotipo GA2 a diferencia de años anteriores.
- 7) Existen un gran déficit de estudios directos *in vivo* en los pacientes involucrados en la infección, y al parecer existen diferencias con los modelos animales, por lo que estudios de campo en la población afectada es imprescindible para seguir comprendiendo los factores involucrados en la enfermedad por VRS.

**Cuadro 1.** Distribución de las edades y mediana de edad de los casos incluidos en el estudio.

Grupo	Nº	Género		Descripción edad		
		masculinos	Femeninos	mediana	desv. Stdr	p
VRS	83	42	41	2	1,925	0,003*
Sanos	26	16	10	5	3,201	

\*comparación entre VRS y Sanos

**Cuadro 2.** Características de los pacientes VRS positivos según gravedad clínica.

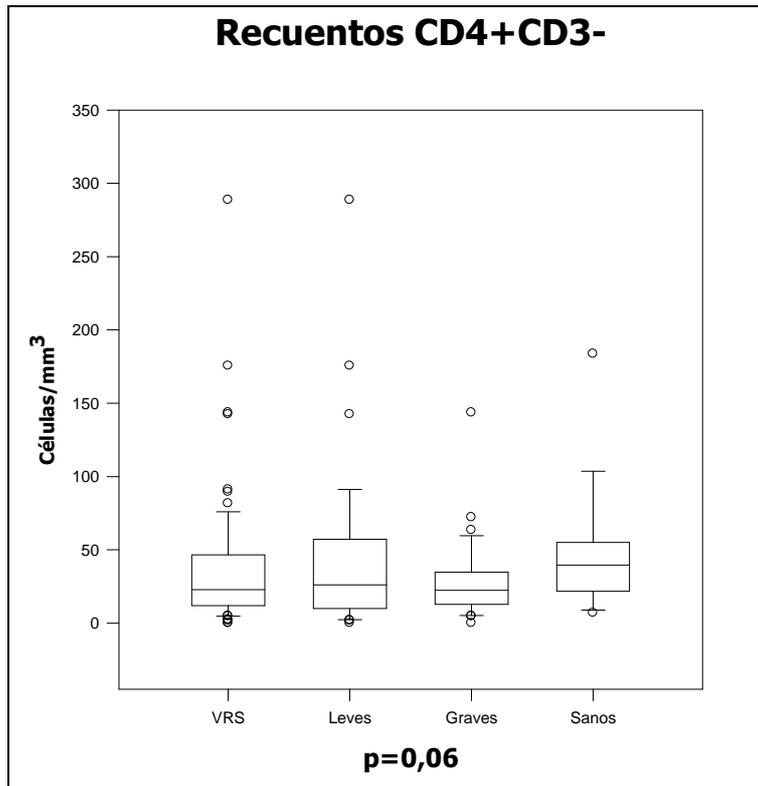
Características	Casos	Grupos VRS		p
		Graves	Leves	
Nº Pacientes	83	42	41	
Edad (mediana)	83	2	2	0,931
Días. Hospitalización				<0,001
(Mediana)	6	9	4	
Ingreso a UCI	11	11	0	0,0014
Ventilación mecánica	11	11	0	0,0014
Días. Oxígeno				<0,001
(Mediana)	4	7	2	
% -FIO2 máxima				<0,001
(Mediana)	30.0	32	28	

**Cuadro 3a.** Inmunotipificación de subpoblaciones linfocitarias en valores absolutos.

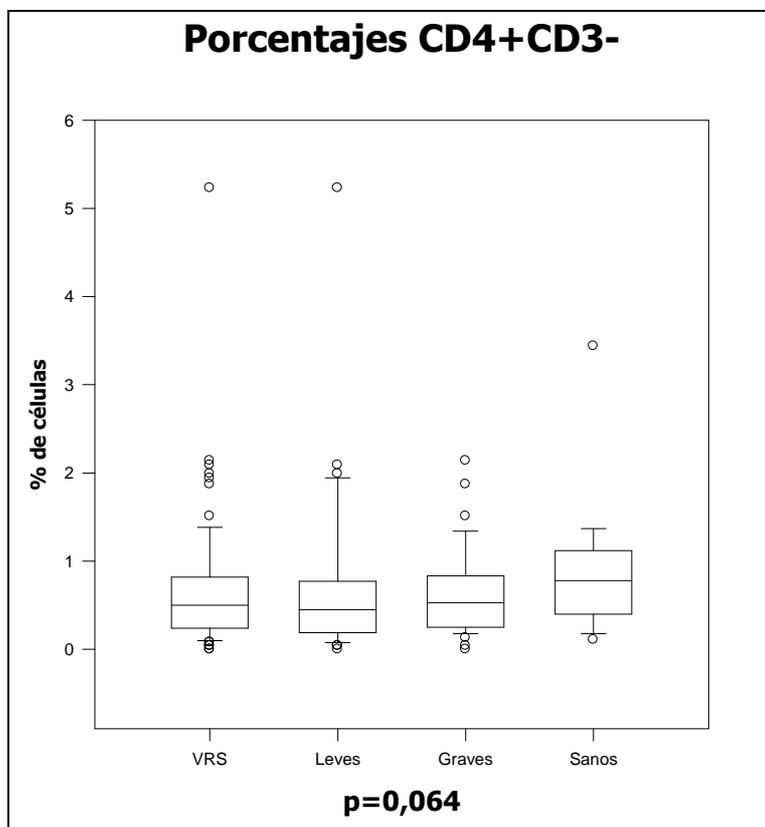
MARCAJE	Grupos	n	media	mediana	Dv Std	Error Std	min	max	Método		P=
CD3+total	VRS	75	4555,7	4329,2	2577,8	297,7	500,2	14748,1	t test	VRS-Sanos	0,95
Linfo T	Leves	38	5197,6	5005,1	2615,1	424,2	500,2	14748,1	ANOVA	Leves-Graves	0,069
	Graves	37	3896,5	3632,5	2397,7	394,2	576,5	10840,3			
	Sanos	19	4595,4	4577,3	1888,1	433,2	631,8	7540,8			
CD4+CD3+	VRS	75	3393,8	3142,4	1825,6	210,8	365,6	8689,5	t test	VRS-Sanos	0,571
Linfo T Helper	Leves	38	3778,5	3510,2	1668,8	270,7	365,6	7322,9	ANOVA		0,128
	Graves	37	2998,6	2665,9	1916,3	315,0	422,9	8689,5			
	Sanos	19	3138,9	3212,0	1353,7	310,6	553,3	5398,7			
CD8+CD3+	VRS	75	1302,2	1059,7	1037,0	119,7	87,1	7308,5	M-W	VRS-Sanos	0,158
Linfo T c/s	Leves	38	1546,8	1395,1	1248,8	202,6	147,2	7308,5	ANOVA	Leves-Graves	0,03
	Graves	37	1051,0	927,5	692,7	113,9	87,1	2949,9		Graves-Sanos	
	Sanos	19	1530,9	1453,5	883,8	202,8	110,5	3224,8			
CD19+	VRS	75	998,3	820,2	789,1	91,1	131,2	4622,3	M-W	VRS-Sanos	0,706
Linfo B	Leves	38	1108,5	978,1	929,2	150,7	131,2	4622,3	ANOVA		0,675
	Graves	37	885,1	724,8	605,4	99,5	216,8	2786,6			
	Sanos	19	965,3	933,6	536,1	123,0	209,3	2464,1			
CD56+CD3-	VRS	75	456,5	350,4	370,7	42,8	34,8	1716,5	M-W	VRS-Sanos	0,498
Linfo NK	Leves	38	496,8	347,1	415,3	67,4	40,6	1535,6	ANOVA		0,725
	Graves	37	415,2	350,4	318,9	52,4	34,8	1716,5			
	Sanos	19	462,5	440,9	285,0	65,4	50,0	1224,6			
CD4+CD3-	VRS	75	36,6	22,8	44,1	5,1	0,0	288,6	M-W	VRS-Sanos	0,06
Linfo inmaduros	Leves	38	43,1	24,5	55,9	9,1	0,0	288,6	ANOVA		0,153
	Graves	37	29,9	22,5	26,3	4,3	0,0	143,6			
	Sanos	19	48,2	39,6	41,1	9,4	7,0	183,6			
CD8+CD3-	VRS	75	198,3	152,5	178,2	20,6	18,6	1022,8	M-W	VRS-Sanos	0,547
Linfo Citotoxicos	Leves	38	198,8	144,6	181,0	29,4	20,4	847,8	ANOVA		0,767
	Graves	37	197,8	173,0	177,7	29,2	18,6	1022,8			
	Sanos	19	168,4	157,5	143,5	32,9	15,6	591,6			
CD56+CD3+	VRS	75	208,0	157,0	246,8	28,5	5,6	1716,8	M-W	VRS-Sanos	0,418
Linfo NKT	Leves	38	230,4	168,5	283,7	46,0	5,6	1716,8	ANOVA		0,396
	Graves	37	185,0	121,2	203,5	33,5	17,2	1068,5			
	Sanos	19	203,0	177,3	150,7	34,6	37,6	668,3			

**Cuadro 3b.** Inmunotipificación de subpoblaciones linfocitarias en valores porcentuales.

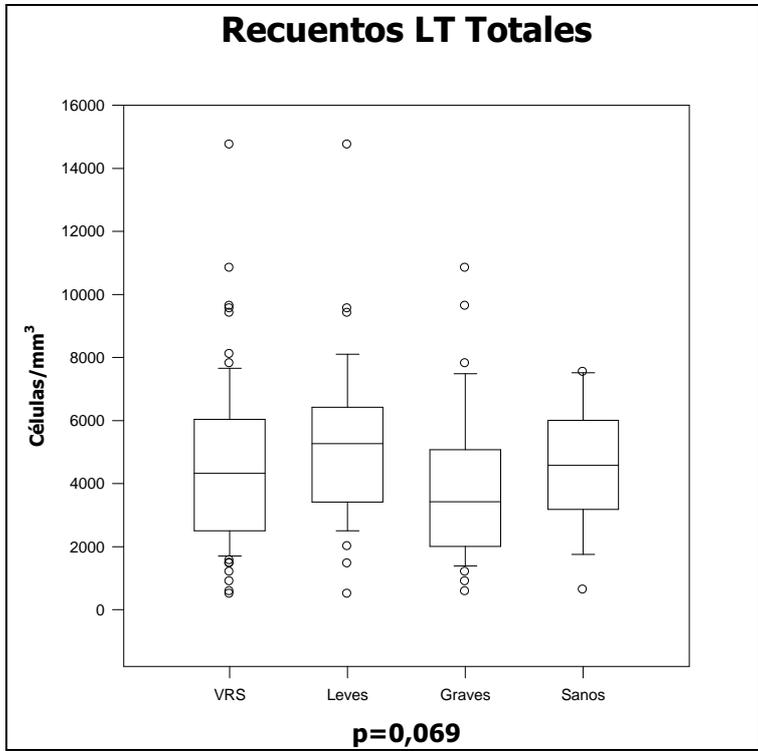
MARCAJE	Grupos	n	media	mediana	Dv Std	Error Std	min	max	Método		P=
CD3+total	VRS	75	74,9	74,7	12,5	1,4	25,1	94,4	M-W	VRS-Sanos	0,851
Linfo T	Leves	38	76,9	75,8	10,6	1,7	52,3	94,4	ANOVA		0,518
	Graves	37	72,8	74,0	14,0	2,3	25,1	93,5			
	Sanos	19	76,1	74,3	6,2	1,4	66,6	93,0			
CD4+CD3+	VRS	75	56,7	58,1	11,6	1,3	19,8	81,2	t test	VRS-Sanos	0,21
Linfo T Helper	Leves	38	57,1	58,2	9,8	1,6	31,3	76,2	ANOVA		0,431
	Graves	37	56,2	56,4	13,3	2,2	19,8	81,2			
	Sanos	19	53,0	53,6	10,1	2,3	25,3	66,7			
CD8+CD3+	VRS	75	20,6	20,2	6,5	0,8	6,9	44,7	M-W	VRS-Sanos	0,113
Linfo T c/s	Leves	38	21,7	20,5	7,2	1,2	9,8	44,7	ANOVA		0,164
	Graves	37	19,4	19,6	5,7	0,9	6,9	32,8			
	Sanos	19	24,6	22,1	10,1	2,3	10,3	50,5			
CD19+	VRS	75	17,3	16,9	10,3	1,2	3,4	63,7	t test	VRS-Sanos	0,689
Linfo B	Leves	38	16,0	16,4	8,6	1,4	3,4	37,2	ANOVA		0,429
	Graves	37	18,7	17,1	11,7	1,9	4,5	63,7			
	Sanos	19	16,4	16,7	5,5	1,3	3,8	24,6			
CD56+CD3-	VRS	75	7,8	7,4	5,0	0,6	0,9	29,7	t test	VRS-Sanos	0,853
Linfo NK	Leves	38	7,1	6,0	4,5	0,7	0,9	18,8	ANOVA		0,438
	Graves	37	8,5	7,9	5,4	0,9	1,1	29,7			
	Sanos	19	7,6	7,1	3,0	0,7	3,2	12,6			
CD4+CD3-	VRS	75	0,7	0,5	0,7	0,1	0,0	5,2	M-W	VRS-Sanos	0,063
Linfo inmaduros	Leves	38	0,7	0,5	0,9	0,2	0,0	5,2	ANOVA		0,107
	Graves	37	0,6	0,5	0,5	0,1	0,0	2,1			
	Sanos	19	0,9	0,8	0,7	0,2	0,1	3,4			
CD8+CD3-	VRS	75	3,5	2,9	2,7	0,3	0,3	15,1	M-W	VRS-Sanos	0,277
Linfo Citotoxicos	Leves	38	2,9	2,3	2,3	0,4	0,3	12,3	ANOVA	Leves-Graves	0,052
	Graves	37	4,1	3,5	3,0	0,5	0,7	15,1		Graves-Sanos	
	Sanos	19	2,7	2,9	1,7	0,4	0,5	6,1			
CD56+CD3+	VRS	75	3,3	2,5	2,6	0,3	0,6	14,0	M-W	VRS-Sanos	0,314
Linfo NKT	Leves	38	3,2	2,6	2,4	0,4	0,6	10,5	ANOVA		0,599
	Graves	37	3,3	2,5	2,9	0,5	0,7	14,0			
	Sanos	19	3,3	3,3	1,5	0,4	1,1	6,9			



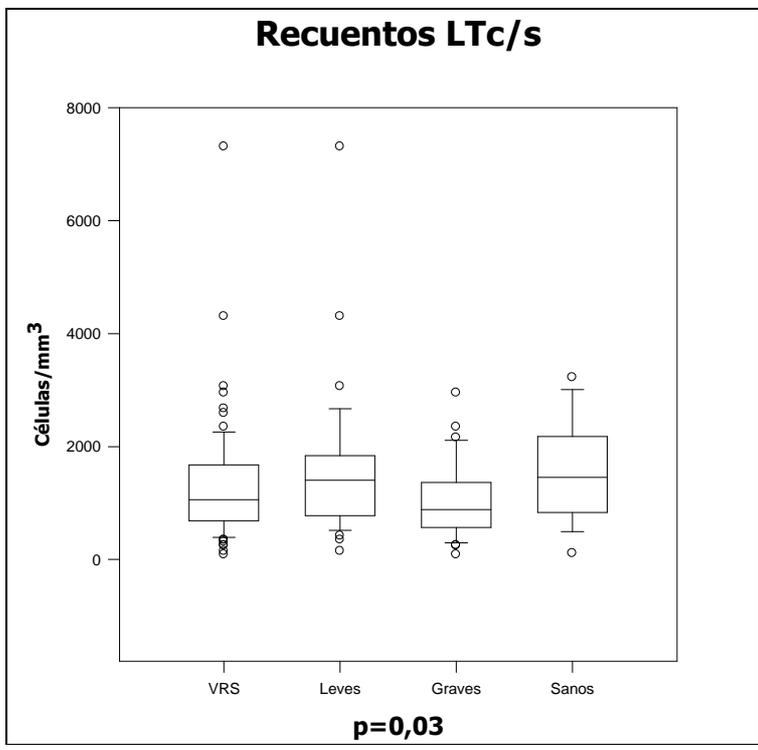
**Gráfico 1.** Distribución de CD4+CD3- en valores absolutos en niños, de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. En el gráfico debemos apreciar la tendencia del los pacientes VRS positivos a tener valores menores que los controles sanos ( $p=0,06$ ).



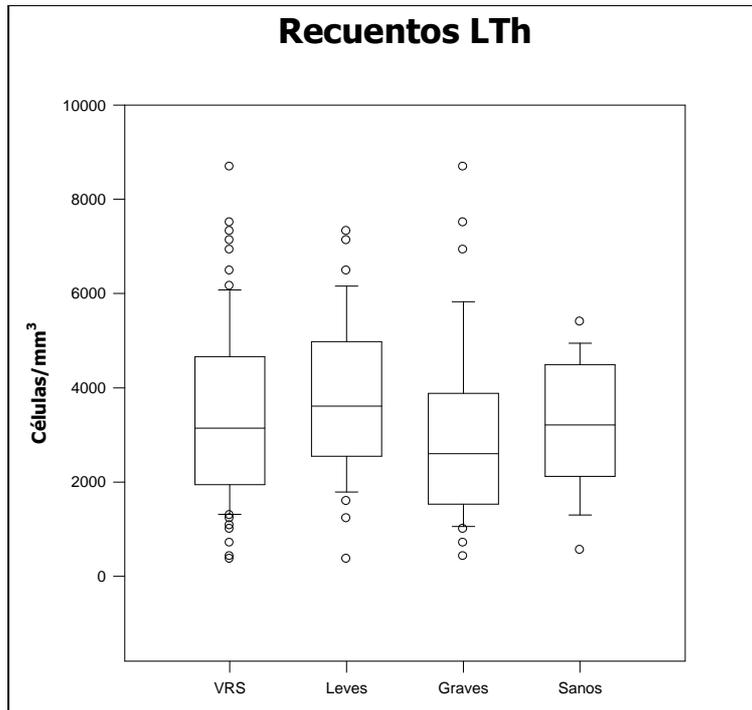
**Gráfico 2.** Distribución de CD4+CD3- en valores porcentuales en niños, de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. Debemos apreciar en el gráfico los controles sanos en comparación a la población infectada por VRS ( $p=0,064$ ).



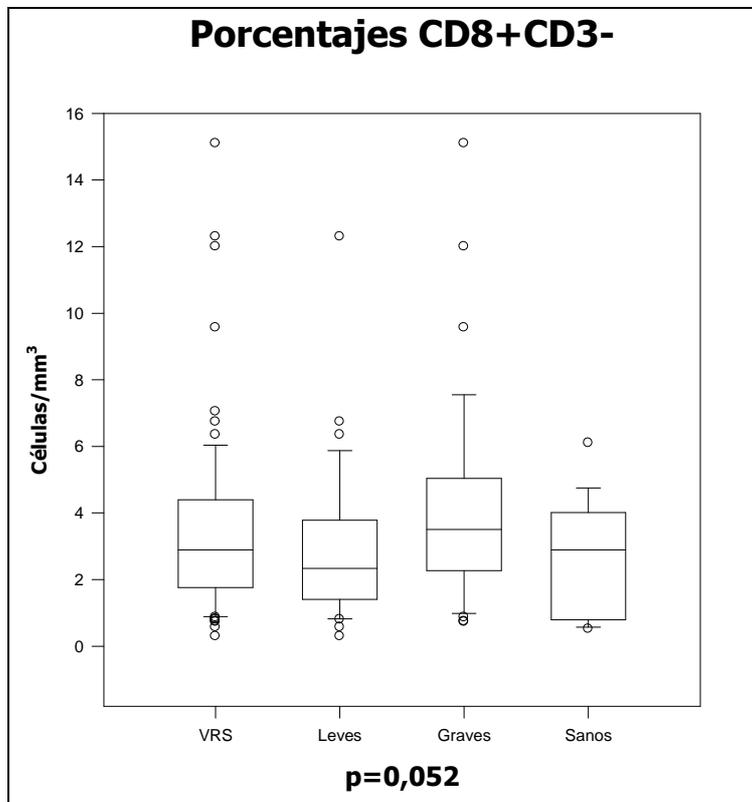
**Gráfico 3.** Distribución de LT en valores absolutos en niños, de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. En el gráfico se puede apreciar la tendencia entre la población leve y grave ( $p=0.069$ ).



**Gráfico 4.** Distribución de LTc/s en valores absolutos en niños, de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. En el gráfico debemos apreciar la diferencia del grupo grave con respecto al grupo leve y sano ( $p=0,03$ ).



**Gráfico 5.** Distribución de LTh en valores absolutos en niños, de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos.



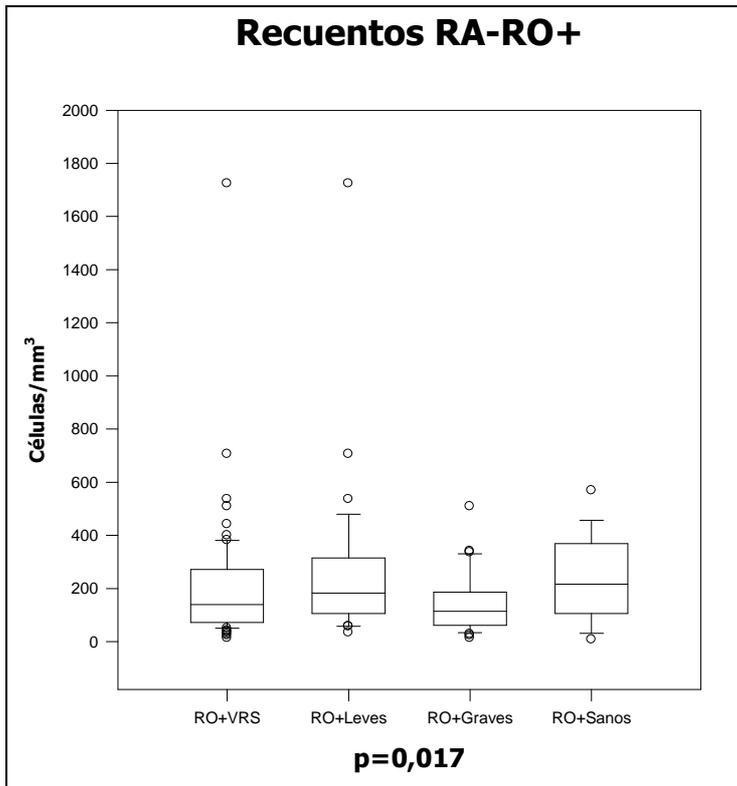
**Gráfico 6.** Distribución de Lc en valores porcentuales en niños, de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. En el gráfico debemos apreciar la distribución más alta en el grupo grave con respecto al grupo leve y el grupo de controles sanos (p=0,052).

**Cuadro 4a.** Inmunotipificación de linfocitos vírgenes, de memoria y marcadores de activación en valores absolutos.

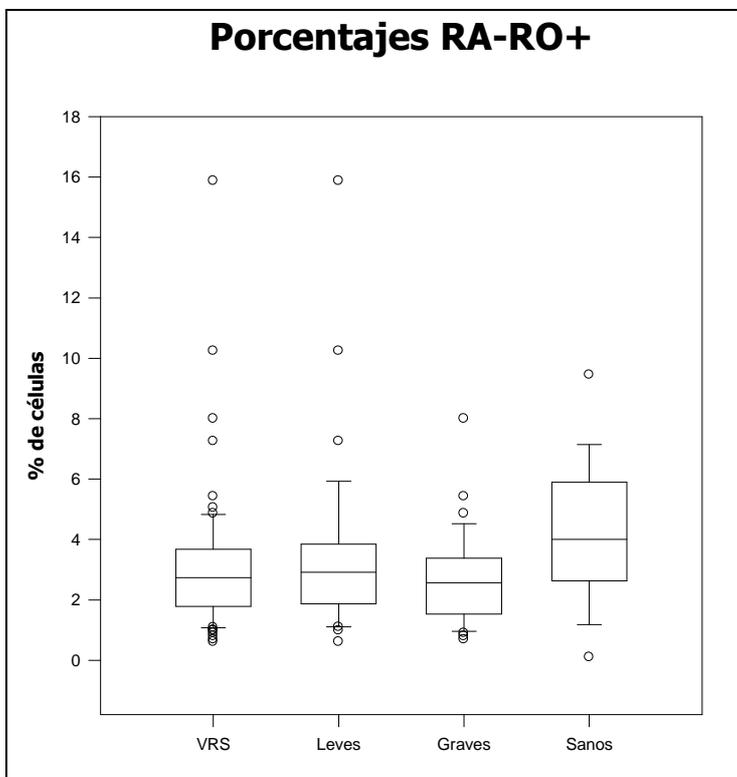
MARCAJE	Grupos	n	media	mediana	Dv Std	Error Std	min	max	Método		P=
RA+RO-	VRS	70	5096,1	4600,0	2838,5	339,3	379,4	15033,8	t test	VRS-Sanos	0,764
Linfo Vírgenes	Leves	35	5797,4	5387,6	2974,0	502,7	2030,6	15033,8	ANOVA	Leves-Graves	0,085
	Graves	35	4394,8	3772,3	2548,3	430,7	379,4	9823,9			
	Sanos	19	4886,4	4798,2	2002,3	459,4	786,9	9012,5			
RA+RO+	VRS	70	162,7	116,7	195,4	23,4	0,9	1212,3	M-W	VRS-Sanos	0,108
Linfo recién activados	Leves	35	185,0	131,0	246,5	41,7	0,9	1212,3	ANOVA		0,265
	Graves	35	140,5	79,9	125,5	21,2	32,4	556,8			
	Sanos	19	211,9	215,2	176,0	40,4	5,4	626,1			
RA-RO+	VRS	70	200,6	138,7	230,2	27,5	12,7	1724,0	M-W	VRS-Sanos	0,077
Linfo memoria	Leves	35	257,2	182,4	297,3	50,2	33,7	1724,0	ANOVA	Graves-Sanos	0,017
	Graves	35	144,0	114,3	112,0	18,9	12,7	508,5			
	Sanos	19	247,4	216,2	157,3	36,1	7,5	568,4			
CD3+CD25+	VRS	64	273,2	234,5	169,4	21,2	50,6	855,4	M-W	VRS-Sanos	0,057
Linfo T activados	Leves	31	315,7	293,1	178,7	32,1	80,8	855,4	ANOVA	Leves-Sanos	0,019
	Graves	33	233,2	174,5	152,2	26,5	50,6	741,5			
	Sanos	19	199,0	203,9	143,4	32,9	26,3	498,4			
CD3+HLADR+	VRS	63	486,6	338,2	509,4	64,2	24,2	2034,0	M-W	VRS-Sanos	0,538
Linfo T activados	Leves	30	493,6	356,9	502,8	91,8	24,2	2034,0	ANOVA		0,782
	Graves	33	480,2	286,2	523,0	91,1	32,3	1703,5			
	Sanos	19	512,4	463,9	409,3	93,9	0,4	1468,8			

**Cuadro 4b.** Inmunotipificación de linfocitos vírgenes, de memoria y marcadores de activación en valores porcentuales.

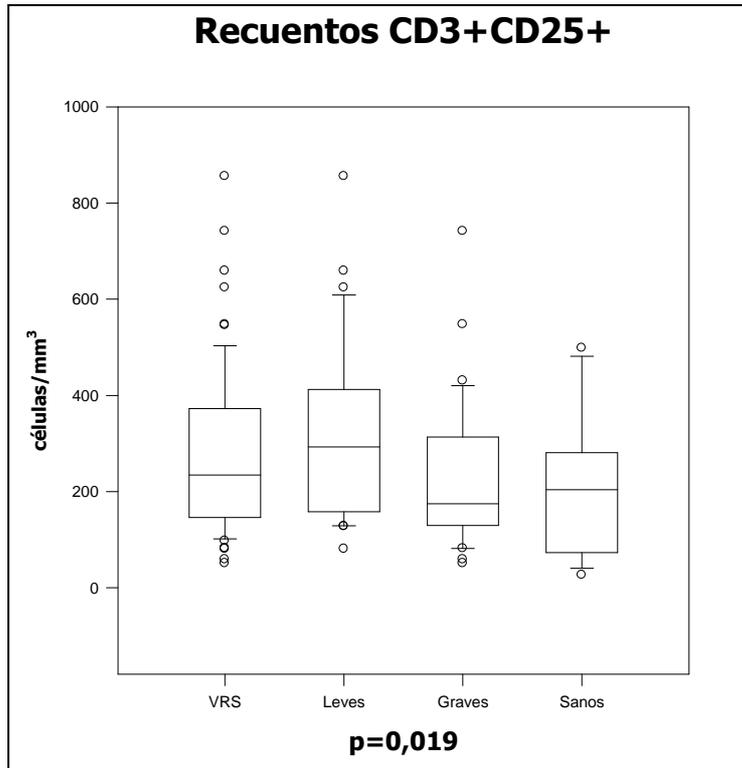
RA+RO-	VRS	70	80,6	83,5	10,6	1,3	32,2	92,2	M-W	VRS-Sanos	0,561
Linfo Vírgenes	Leves	35	79,9	82,4	10,3	1,7	49,0	92,2	ANOVA	Leves-Graves	0,617
	Graves	35	81,3	84,2	11,0	1,9	32,2	90,8			
	Sanos	19	81,6	81,3	5,0	1,1	70,5	90,7			
RA+RO+	VRS	70	2,6	1,9	2,3	0,3	0,0	11,2	M-W	VRS-Sanos	0,089
Linfo recién activados	Leves	35	2,3	1,7	2,3	0,4	0,0	11,2	ANOVA	Leves-Sanos	0,07
	Graves	35	2,9	2,1	2,3	0,4	0,5	9,5			
	Sanos	19	3,4	2,9	2,4	0,5	0,2	8,4			
RA-RO+	VRS	70	3,1	2,7	2,3	0,3	0,6	15,9	M-W	VRS-Sanos	0,012
Linfo memoria	Leves	35	3,4	2,9	2,8	0,5	0,6	15,9	ANOVA	Graves-Sanos	0,024
	Graves	35	2,7	2,6	1,5	0,3	0,7	8,0			
	Sanos	19	4,3	4,0	2,3	0,5	0,1	9,5			
CD3+CD25+	VRS	64	5,7	5,8	1,7	0,2	2,1	8,8	t test	VRS-Sanos	0,003
Linfo T activados	Leves	31	5,6	5,5	1,6	0,3	2,1	8,7	ANOVA	Leves-Sanos Graves-Sanos	0,01
	Graves	33	5,9	6,2	1,8	0,3	2,7	8,8			
	Sanos	19	4,3	3,9	2,2	0,5	0,9	8,0			
CD3+HLADR+	VRS	63	11,1	7,4	10,9	1,4	0,3	55,1	M-W	VRS-Sanos	0,8
Linfo T activados	Leves	30	8,7	7,7	7,2	1,3	0,6	27,2	ANOVA		0,444
	Graves	33	13,4	7,4	13,1	2,3	0,3	55,1			
	Sanos	19	10,9	9,8	8,4	1,9	0,1	27,6			



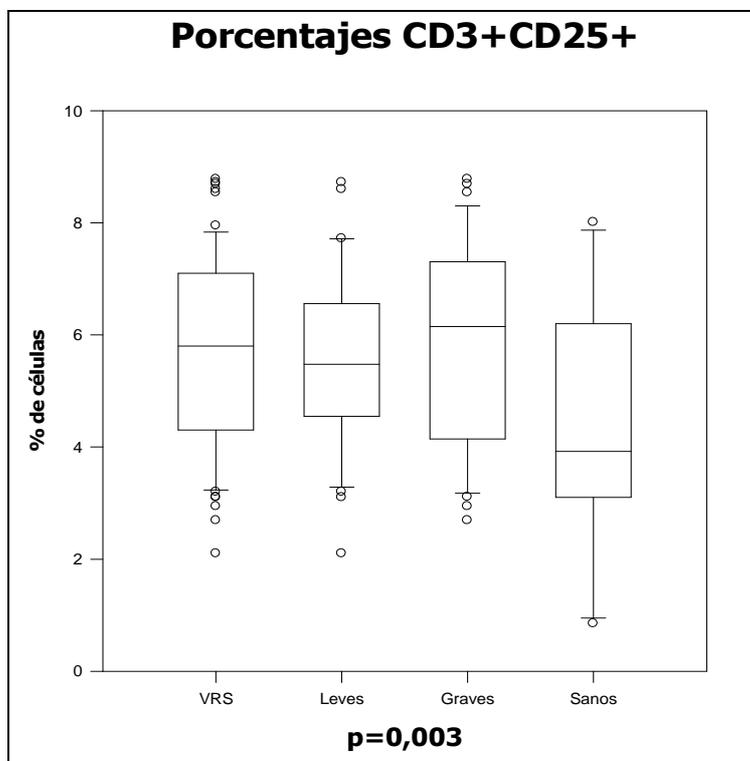
**Gráfico 7.** Distribución de linfocitos de memoria en valores absolutos en niños, de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. En la imagen debemos apreciar el grupo grave que aparece disminuido al compararlo con el grupo sano ( $p=0,017$ ).



**Gráfico 8.** Distribución de linfocitos de memoria den valores porcentuales en niños, de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. En la imagen podemos apreciar como los grupos infectados por VRS tienden a un menor porcentaje de linfocitos de memoria. La comparación de los grupos VRS y graves con el grupo sano da un  $p=0,012$ , y la comparación de los grupos graves con sano el  $p=0,024$ .



**Gráfico 9.** Distribución de linfocitos T activados (CD25+) en valores absolutos en niños, de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. En la imagen debemos apreciar la tendencia el grupo leve en activar sus linfocitos T con respecto a los grupos graves y controles sanos (p=0,019).



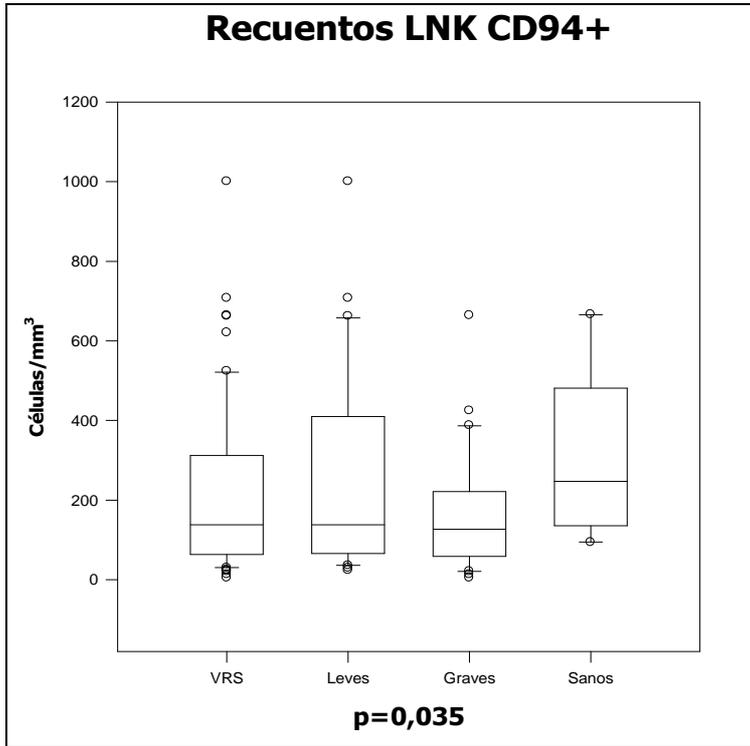
**Gráfico 10.** Distribución de linfocitos T activados (CD25+) en valores porcentuales en niños, de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. En la imagen debemos apreciar el mayor porcentaje de linfocitos T activados en los grupos infectados por VRS con respecto al grupo control (p =0,003).

**Cuadro 5a.** Inmunotipificación de linfocitos Natural Killer en valores absolutos.

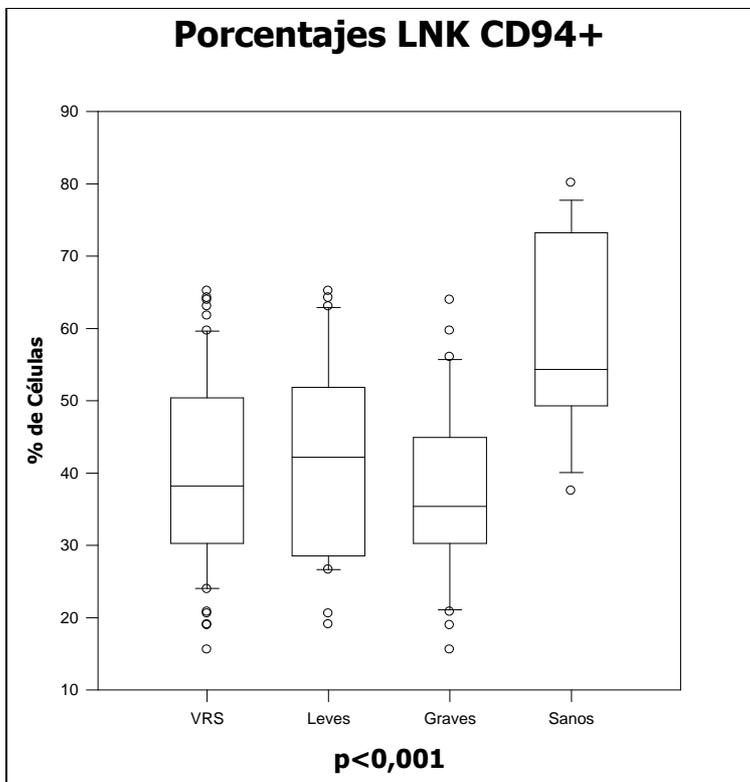
MARCAJE	Grupos	n	media	mediana	Dv Std	Error Std	min	max	Método	P=	
CD56+CD57+	VRS	60	87,9	52,8	83,6	10,8	0,3	356,9	M-W	VRS-Sanos	0,868
NK activados	Leves	30	93,7	52,3	98,4	18,0	2,8	356,9	ANOVA		0,984
	Graves	30	82,0	57,1	66,8	12,2	0,3	214,9			
	Sanos	15	107,9	62,2	117,9	30,4	4,4	389,5			
CD56+94+	VRS	60	211,3	138,0	207,9	26,8	5,4	1000,6	M-W	VRS-Sanos	0,035
NK con receptor MHC I	Leves	30	256,1	138,0	249,6	45,6	23,9	1000,6	ANOVA	Graves-Sanos	0,063
	Graves	30	166,6	126,5	146,6	26,8	5,4	663,9			
	Sanos	15	298,3	247,2	200,1	51,7	93,9	666,5			
CD94+CD57-	VRS	60	159,5	98,7	171,4	22,1	5,1	918,3	M-W	VRS-Sanos	0,029
NK no activados receptor MHC I	Leves	30	198,6	108,9	210,6	38,4	9,7	918,3	ANOVA	Graves-Sanos	<0,001
	Graves	30	120,4	79,6	110,8	20,2	5,1	531,1			
	Sanos	15	207,7	170,0	133,0	34,3	66,8	577,3			
CD94+CD57+	VRS	60	52,3	32,1	59,0	7,6	0,3	304,6	M-W	VRS-Sanos	0,364
NK activado con receptor MHC I	Leves	30	57,9	32,1	69,2	12,6	0,7	304,6	ANOVA		0,609
	Graves	30	46,6	28,4	47,0	8,6	0,3	160,7			
	Sanos	15	88,5	44,7	114,9	29,7	5,7	382,7			
CD94-CD57+	VRS	60	35,4	22,7	35,5	4,6	0,0	144,0	M-W	VRS-Sanos	0,031
NK activado sin receptor MHC I	Leves	30	36,1	22,7	38,0	6,9	1,0	144,0	ANOVA		0,096
	Graves	30	34,7	22,9	33,5	6,1	0,0	134,8			
	Sanos	15	15,7	12,4	14,6	3,8	0,0	47,6			

**Cuadro 5b.** Inmunotipificación de linfocitos Natural Killer en valores porcentuales.

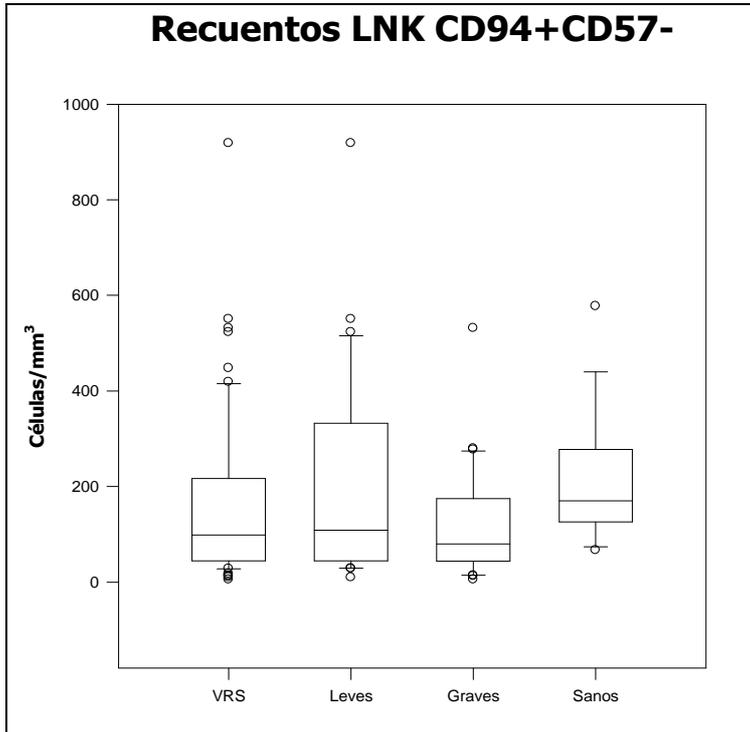
CD56+CD57+	VRS	60	18,1	15,3	11,1	1,4	0,9	50,3	M-W	VRS-Sanos	0,984
NK activados	Leves	30	16,4	13,6	10,1	1,8	4,8	46,6	ANOVA		0,573
	Graves	30	19,7	17,0	11,9	2,2	0,9	50,3			
	Sanos	15	18,5	14,5	13,4	3,5	1,3	53,6			
CD56+94+	VRS	60	39,8	38,2	12,8	1,7	15,6	65,2	t test	VRS-Sanos	<0,001
NK con receptor	Leves	30	42,3	42,2	13,5	2,5	19,1	65,2	ANOVA	Graves-Sanos	<0,001
	Graves	30	37,3	35,4	11,8	2,2	15,6	63,9			
	Sanos	15	58,7	54,3	13,7	3,5	37,5	80,1			
CD94+CD57-	VRS	60	30,0	28,3	12,0	1,5	11,4	59,8	t test	VRS-Sanos	<0,001
NK no activados con	Leves	30	32,8	30,6	14,3	2,6	11,4	59,8	ANOVA	Graves-Sanos	<0,001
	Graves	30	27,2	27,5	8,5	1,6	13,1	47,0			
	Sanos	15	43,4	39,8	13,0	3,4	23,4	69,1			
CD94+CD57+	VRS	60	10,0	8,2	7,5	1,0	0,2	40,9	M-W	VRS-Sanos	0,35
NK activado con	Leves	30	9,7	8,2	7,3	1,3	0,2	40,9	ANOVA		0,614
	Graves	30	10,3	8,5	7,8	1,4	1,0	39,1			
	Sanos	15	15,0	9,2	14,1	3,6	1,7	52,6			
CD94-CD57+	VRS	60	7,9	6,7	6,5	0,8	0,0	33,0	M-W	VRS-Sanos	0,002
NK activado sin	Leves	30	6,8	6,0	5,1	0,9	1,5	25,1	ANOVA	Graves-Sanos	0,004
	Graves	30	9,1	6,7	7,6	1,4	0,0	33,0			
	Sanos	15	3,1	3,0	2,0	0,5	0,0	6,8			



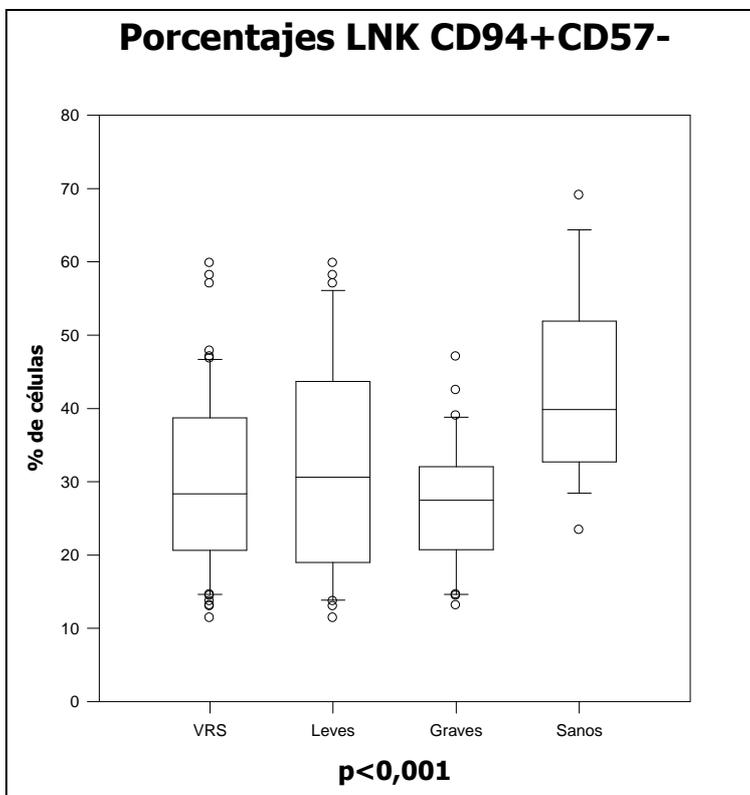
**Gráfico 11.** Distribución de LNK con receptor de MHC I en valores absolutos en niños, de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. En la imagen debemos apreciar la distribución del grupo VRS con el grupo sano ( $p=0,035$ ).



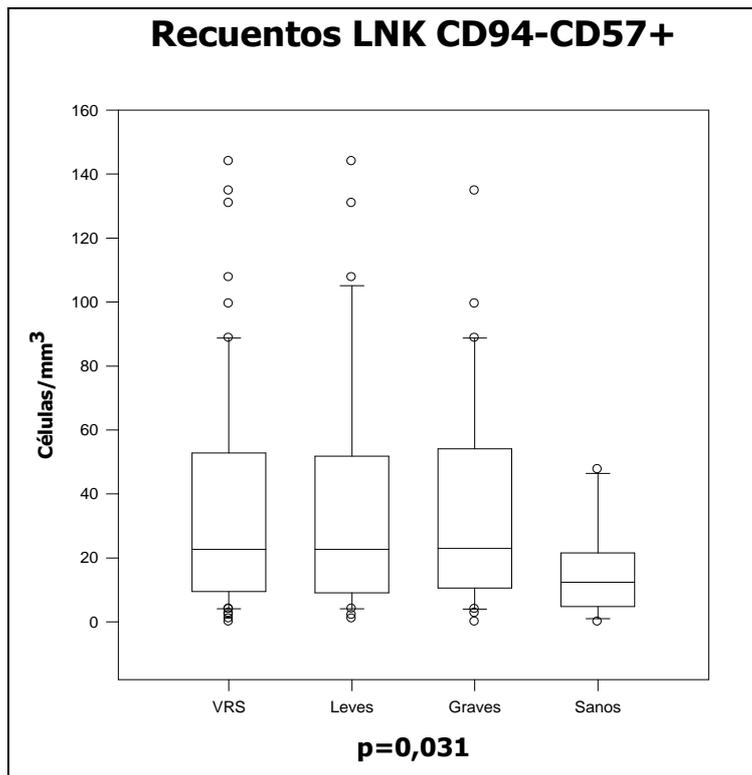
**Gráfico 12.** Distribución de LNK con receptor de MHC I en valores porcentuales en niños, de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. En la imagen podemos apreciar los 3 grupos VRS positivos con una distribución de la proporción del receptor MHC I menor que el grupo control sano ( $p<0,05$  en todas las comparaciones entre VRS positivos y sanos).



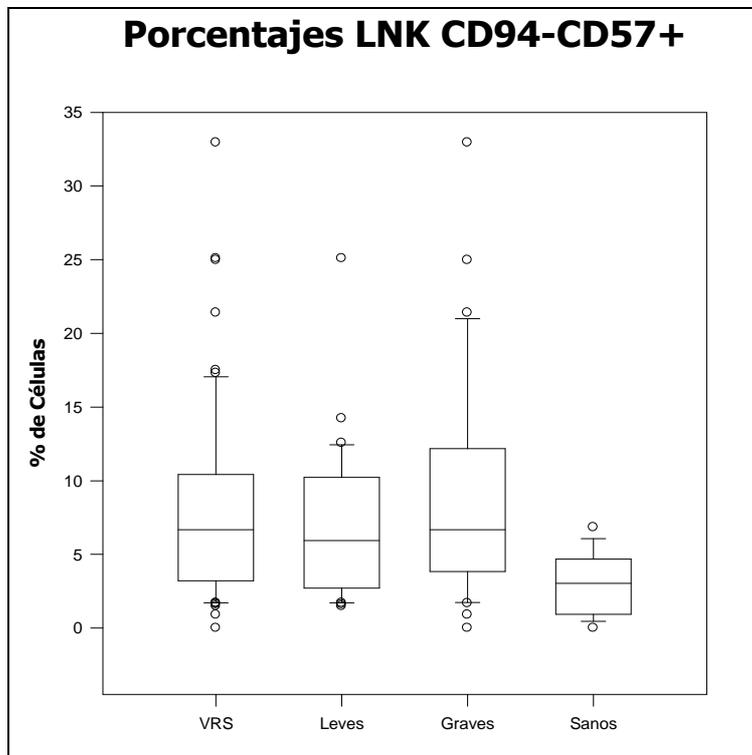
**Gráfico 13.** Distribución de LNK no activados con receptor de la molécula MHC I en valores absolutos en niños, de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. Debemos apreciar en el gráfico los grupos VRS y sanos ( $p=0,029$ ). En los grupos graves y sanos (ANOVA  $p=0,049$ ). La población total de infectados por VRS y sobre todo el grupo graves tiene un menor número de esta población de LNK.



**Gráfico 14.** Distribución de LNK no activados con receptor de la molécula MHC I en valores porcentuales de los grupos VRS, leves, graves y controles sanos. Debemos apreciar como todos los infectados por VRS tienen un menor porcentaje de esta población respecto al grupo control sano ( $p < 0,001$ ). El ANOVA arroja diferencias entre graves y sanos; y leves y sanos ( $p < 0,001$ )



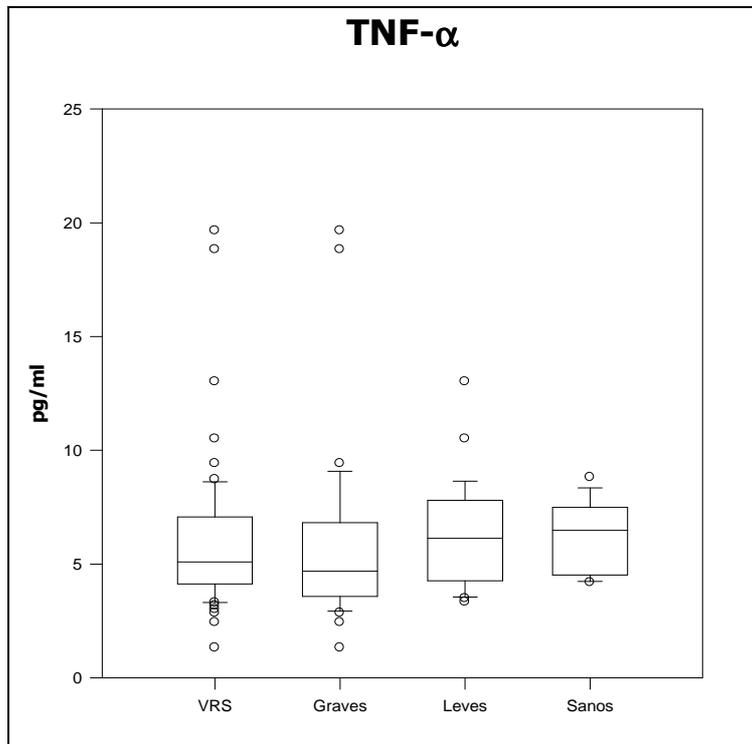
**Gráfico 15.** Distribución de LNK activados sin receptor de la molécula MHC I en valores absolutos en niños, de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. Muestra claramente como los infectados por VRS presentan un mayor número de esta población respecto a los controles sanos ( $p=0,031$ ).



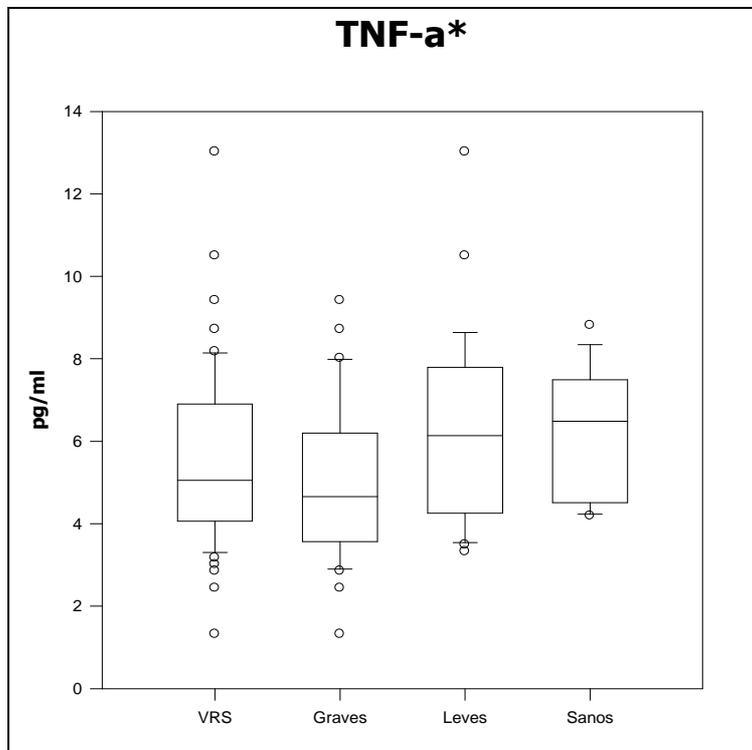
**Gráfico 16.** Distribución de LNK activados sin receptor de la molécula MHC I en valores porcentuales en niños, de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. Muestra claramente como los infectados por VRS presentan una mayor proporción de esta población respecto a los controles sanos ( $p=0,002$ ). El ANOVA ( $p=0,004$ ) da como diferentes los grupos graves y leves con respecto a los sanos.

**Cuadro 6. Resumen de resultados de la cuantificación de interleuquinas**

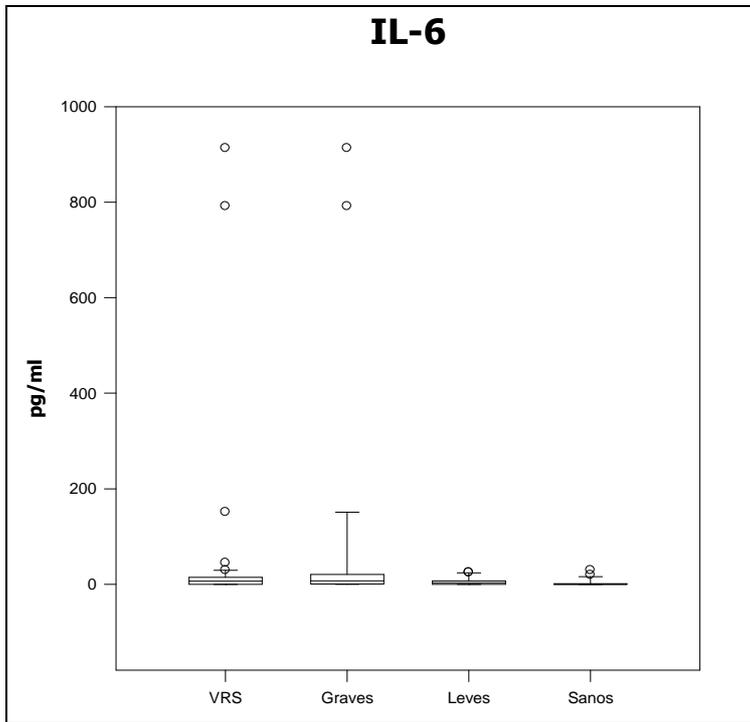
	Interleuquina	Grupo	N	Media	Mediana	Desv.	Error Std	Min	Max	Método	Comparación	p
<b>Th1</b>	<b>TNF-a</b>	VRS	61	<b>5,967</b>	<b>5,085</b>	3,242	0,415	1,323	19,66	M-W	VRS-Sanos	<b>0,112</b>
		Grave	34	<b>5,846</b>	<b>4,687</b>	3,864	0,663	1,323	19,66	ANOVA		<b>0,199</b>
		Leve	27	<b>6,119</b>	<b>6,138</b>	2,294	0,442	3,332	13,02	*ANOVA	Grave-Sanos	<b>0,07</b>
		Sano	14	<b>6,253</b>	<b>6,488</b>	1,48	0,41	4,193	8,816			
	<b>INF-g</b>	VRS	60	<b>5,565</b>	<b>3,873</b>	4,184	0,54	0,788	21,34	M-W	VRS-Sanos	<b>0,936</b>
		Grave	34	<b>5,286</b>	<b>3,873</b>	3,553	0,609	0,788	14,72	ANOVA		<b>0,988</b>
		Leve	26	<b>5,931</b>	<b>4,066</b>	4,94	0,969	1,944	21,34			
		Sano	17	<b>4,624</b>	<b>4,646</b>	2,308	0,56	0,403	9,287			
<b>Th2</b>	<b>IL-10</b>	VRS	62	<b>8,076</b>	<b>4,315</b>	8,825	1,121	1,186	49,82	M-W	VRS-Sanos	<b>0,533</b>
		Graves	33	<b>8,797</b>	<b>5,294</b>	10,251	1,784	1,263	49,82	ANOVA		<b>0,695</b>
		Leves	28	<b>6,38</b>	<b>3,835</b>	5,201	0,983	1,186	19,57			
		Sanos	12	<b>5,697</b>	<b>5,255</b>	2,858	0,825	1,494	10,21			
	<b>IL-6</b>	VRS	52	<b>43,28</b>	<b>6,208</b>	165,255	22,917	0	912,8	M-W	VRS-Sanos	<b>0,002</b>
		Graves	29	<b>72,182</b>	<b>7,144</b>	218,46	40,567	0	912,8	ANOVA	Grave-Sanos	<b>0,003</b>
		Leves	23	<b>6,838</b>	<b>2,951</b>	8,821	1,839	0	24,84			
		Sanos	23	<b>3,247</b>	<b>0</b>	7,416	1,546	0	29,51			
<b>IL-13</b>	VRS	63	<b>1,292</b>	<b>0,605</b>	2,501	0,315	0,36	14,56	M-W	VRS-Sanos	<b>0,005</b>	
	Graves	33	<b>1,322</b>	<b>0,621</b>	2,392	0,416	0,36	13,84	ANOVA	Leves Sanos	<b>0,014</b>	
	Leves	30	<b>1,26</b>	<b>0,598</b>	2,657	0,485	0,406	14,56				
	Sanos	14	<b>1,751</b>	<b>0,889</b>	1,717	0,459	0,483	5,92				
<b>Th17</b>	<b>IL-17</b>	VRS	67	<b>19,326</b>	<b>14,817</b>	27,448	3,353	0	222,4	M-W	VRS-Sanos	<b>0,66</b>
		Graves	37	<b>16,47</b>	<b>14,817</b>	10,6	1,743	1,844	38,91	ANOVA		<b>0,902</b>
		Leves	30	<b>22,848</b>	<b>13,89</b>	39,393	7,192	0	222,4			
		Sanos	10	<b>13,892</b>	<b>16,67</b>	10,454	3,306	0	27,79			
<b>Quimioquina</b>	<b>IL-8</b>	VRS	61	<b>0,986</b>	<b>0,422</b>	2,251	0,288	0	11,99	M-W	VRS- Sanos	<b>0,002</b>
		Graves	33	<b>1,396</b>	<b>0,437</b>	2,993	0,521	0	11,99	ANOVA	Grave-Sanos	<b>0,007</b>
		Leves	28	<b>0,503</b>	<b>0,418</b>	0,444	0,838	0	1,473		Leves-Sanos	
		Sanos	15	<b>0,199</b>	<b>0,118</b>	0,296	0,0765	0	1,212			



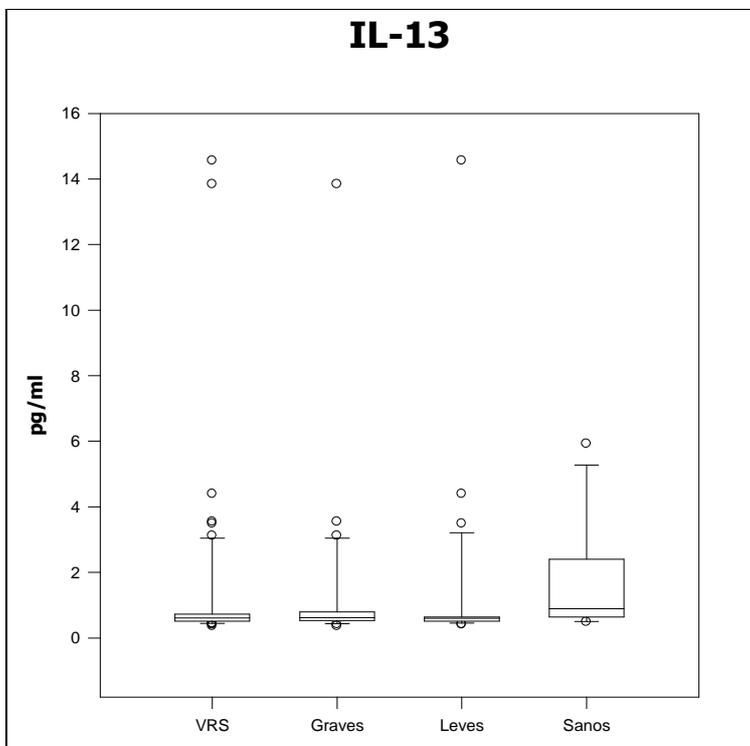
**Gráfico 17.** Distribución de la lectura de TNF- $\alpha$  en los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. En la imagen se aprecia la tendencia del grupo grave a estar disminuido con respecto a los controles sanos ( $p=0,062$ ).



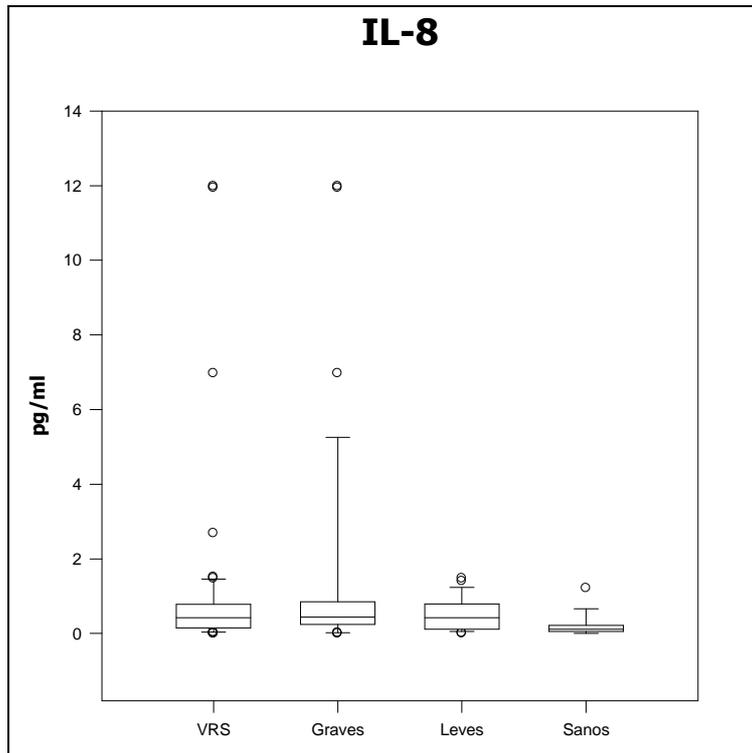
**Gráfico 18.** Distribución de la lectura de TNF- $\alpha$  en los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos, descartando las dos muestras del grupo grave que salían por mucho del intervalo de 95% de confianza. En la imagen se aprecia la tendencia del grupo grave con el grupo control y con el grupo leve ( $p=0,07$ ).



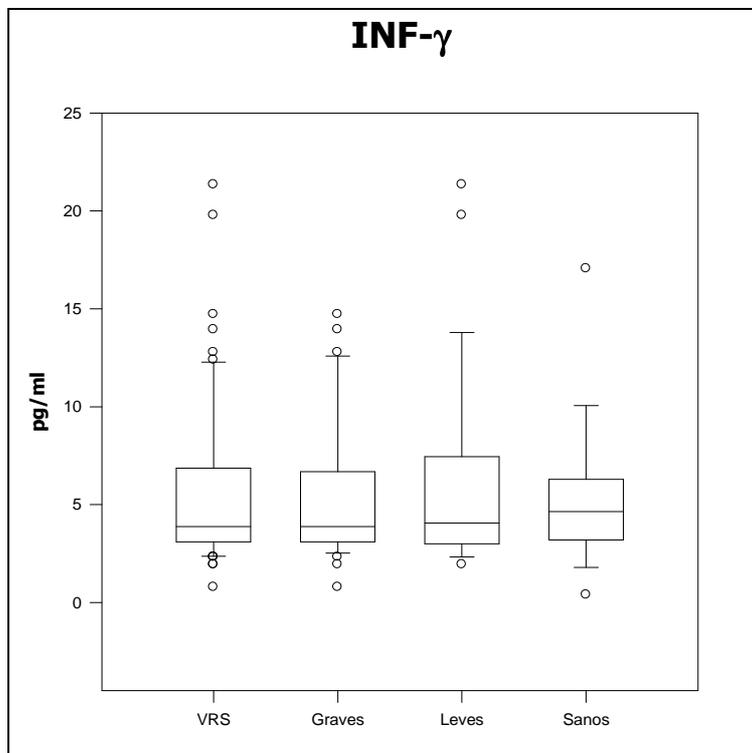
**Gráfico 19.** Distribución de la lectura de IL-6 en los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. En la imagen se observa una tendencia del grupo grave a tener una mayor concentración de esta interleuquina ( $p=0,003$ ).



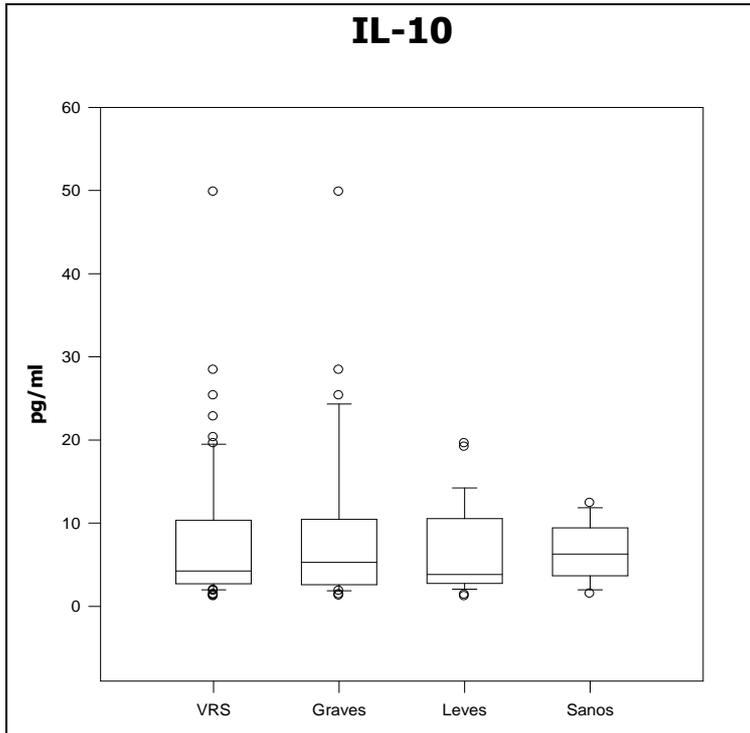
**Gráfico 20.** Distribución de la lectura de IL-13 en los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. En la imagen se observa como el grupo sano tiende a valores más altos que en los grupos VRS positivos. Los grupos total VRS, leves y graves presentaron concentraciones significativamente menores con el grupo sanos ( $p<0,05$ ).



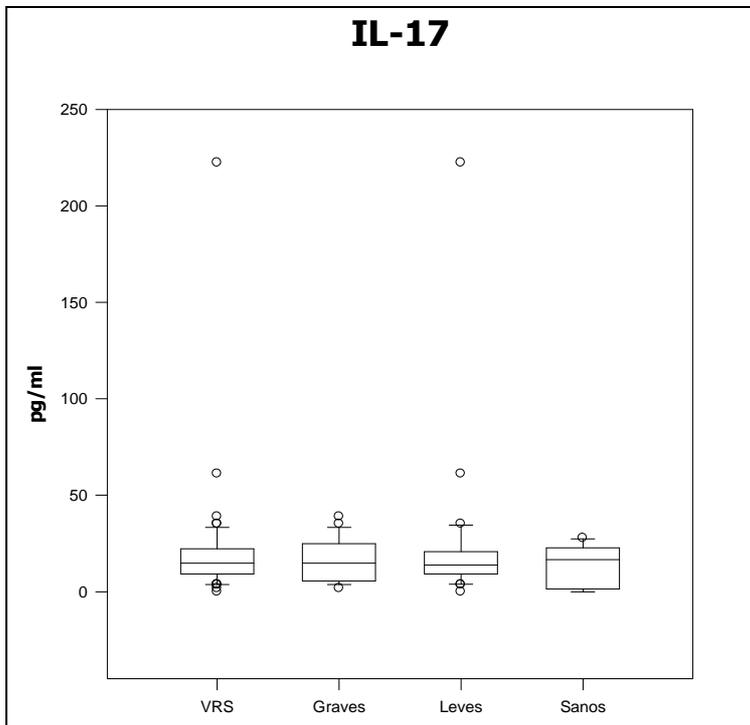
**Gráfico 21.** Distribución de las lecturas de IL-8 de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. En la imagen se puede apreciar a los grupos infectados por VRS con mayores concentraciones que el grupo de controles sanos ( $p < 0,05$ ). Entre los grupos leves y graves no hubo diferencias significativas.



**Gráfico 22.** Distribución de la lectura de INF- $\gamma$  en los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. No se observan diferencias estadísticas entre los grupos.



**Gráfico 23.** Distribución de la lectura de IL-10 en los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. No se observan diferencias estadísticas entre los grupos. Destaca el grupo grave por presentar los pacientes con los valores más altos.



**Gráfico 24.** Distribución de las lecturas de IL-17 de los grupos total con VRS, leves, graves y controles sanos. No hubo diferencias significativas.

**Cuadro 6\*.** Análisis estadístico de TNF- $\alpha$  sin dos muestras del grupo graves que estaban alejadas del resto del grupo.

<b>IL</b>	<b>Grupo</b>	<b>N total</b>	<b>Media</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desv. Stnd.</b>	<b>Método</b>	<b>Comparación</b>	<b>p</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	VRS	61	<b>5,967</b>	<b>5,085</b>	2,141	<b>t-test</b>	VRS-Sanos	<b>0,089</b>
	Grave	32	<b>5,009</b>	<b>4,655</b>	1,892	<b>ANOVA</b>	Graves-Sanos	<b>0,07</b>
	Leve	27	<b>6,119</b>	<b>6,138</b>	2,294			
	Sano	14	<b>6,592</b>	<b>6,584</b>	1,906			

**Cuadro 7.** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del extremo C-terminal del gen G de VRS del grupo A de cepas chilenas.

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	5 15 25 35 45 55
A2	AAAAAAGATC CCAAACCTCA AACCACTAAA TCAAAGGAAG TACCCACCAC CAAGCCCACA
Long	AAAAAAGATC ACAAACCTCA AACCACTAAA CCAAAGGAAG TACCCACCAC CAAGCCCACA
73_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCCCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACACACCAC CAAGCCCACA
72_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCCCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACACACCAC CAAGCCCACA
86_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCCCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACACACCAC CAAGCCCACA
67_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCTCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG CACCCACCAC CAAGCCCACA
63_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCTCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG CACCCACCAC CAAGCCCACA
76_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCCCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACATACCAC CAAGCCCACA
94_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCTCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACTCACCAC CAAGCCCACA
87_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCCCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACACACCAC CAAGCCCACA
74_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCTCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACTCACCAC CAAGCCCACA
75_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCTCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACTCACCAC CAAGCCCACA
56_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCCCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACACACCAC CAAGCCCACA
66_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCCCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACACACCAC CAAGCCCACA
P2_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCTCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACTCACCAC CAAGCCCACA
41_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCTCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG CACCCACCAC CAAGCCCACA
47_RSV	AAAAAAGAAC CCAAACCTCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACTCACCAC CAAGCTCACA
79_RSV	AAAAAAGAAC CCAAACCTCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACTCACCAC CAAGCTCACA
61_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCTCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACTCACCAC CAAGCCCACA
64_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCCCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACACACCAC CAAGCCCACA
P9_RSV	AAAAAAGATC TCAAACCTCA AACCACTAAA CCAAAGGAAG TACCCACCAC CAAGCCCACA
77_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCCCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACACACCAC CAAGCCCACA
50_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCCCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACACACCAC CAAGCCCACA
51_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCCCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACACACCAC CAAGCCCACA
11_RSV	AAAAAAGATC CCAAACCCCA AACCACAAAA CCAAAGGAAG TACACACCAC CAAGCCCACA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	65 75 85 95 105 115
A2	GAAGAGCCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCATA ACTACACTAC TCACCTCCAA
Long	GAAGAGCCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCATA ACTACACTAC TCACCAACAA
73_RSV	GAAGAGCCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCACA ACTACACTGC TCACCAACAA
72_RSV	GAAAAGTCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAAA ACTACACTGC TCACCTCCAA
86_RSV	GAAAAGTCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAAA ACTACACTGC TCACCTCCAA
67_RSV	GAAAAGTCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAAA ACTACACTGC TCACCTCCAA
63_RSV	GAAAAGTCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAAA ACTACACTGC TCACCTCCAA
76_RSV	GAAAAGTCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAAA ACTACACTGC TCACCTCCAA
94_RSV	GAAAAGTCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAAA ACTACACTGC TCACCTCCAA
87_RSV	GAAAAGTCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAAA ACTACACTGC TCACCTCCAA
74_RSV	GAAAAGTCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAAA ACTACACTGC TCACCTCCAA
75_RSV	GAAAAGTCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAAA ACCACACTGC TCACCTCCAA
56_RSV	GAAAAGTCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAAA ACTACACTGC TCACCTCCAA
66_RSV	GAAAAGCCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAAA ACTACACTGC TCACCTCCAA
P2_RSV	GAAAAGCCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAAA ACTACACTGC TCACCTCCAA
41_RSV	GAAAAGCCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAAA ACTACACTGC TCACCTCCAA
47_RSV	GAAAAGCCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAAA ACTACACTGC TCACCTCCAA
79_RSV	GAAAAGCCAA CCATCG-ACA CCACCAAAAC AAACATCAGA ACTACACTGC TCACCTCCAA
61_RSV	GAAAAGCCAA CCATCG-ACA CCACCAAAAC AAACATCAGA ACTACACTGC TCACCTCCAA
64_RSV	GAAAAGCCAA CCATCG-ACA CCACCAAAAC AAACATCAGA ACTACACTGC TCACCTCCAA

```

. . . | . . . | . . . | . . . | . . . | . . . |
      65       75       85       95      105      115
P9_RSV  GAAAAGCCAA CCATCG-ACA CCACCAAAAC AAACATCAGA ACTACACTGC TCACCTCCAA
77_RSV  GAAAAGCCAA CCATCG-ACA CCACCAAAAC AAACATCAGA ACTACACTGC TCACCTCCAA
50_RSV  GAAAAGCCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAGA ACTACACTGC TCACCTCCAA
51-RSV  GAAAAGCCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAGA ACTACACTGC TCACCTCCAA
11_RSV  GAAAAGCCAA CCATCA-ACA CCACCAAAAC AAACATCAGA ACTACACTGC TCACCTCCAA

```

```

. . . | . . . | . . . | . . . | . . . | . . . |
      125      135      145      155      165      175
A2      CACCACAGGA AATCCAGAAC TCACAAGTCA AATGGAAACC TTCCACTCAA CTTCTCCGA
Long    CACCACAGGA AATCCAAAAC TCACAAGTCA AATGGAAACC TTCCACTCAA CCTCTCCGA
73_RSV CACCACAGGA AATCCAATAC TCACAAGTCA AATGGAAACC TTCCACTCAA CCTCTCCGA
72_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAA ATACAAGTCA AAAGGAAACC CTCCACTCAA CCACTCCCGA
86_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAA ATACAAGTCA AAAGGAAACC CTCCACTCAA CCACTCCCGA
67_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAA ATACAAGTCA AAAGGAAACC CTCCACTCAA CCACTCCCGA
63_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAA ATACAAGTCA AAAGGAAACC CTCCACTCAA CCACTCCCGA
76_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAA ATACAAGTCA AAAGGAAACC CTCCACTCAA CCACTCCCGA
94_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAA ATACAAGTCA AAAGGAAACC CTCCACTCAA CCACTCCCGA
87_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAA ATACAAGTCA AAAGGAAACC CTCCACTCAA CCACTCCCGA
74_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAA ATACAAGTCA AAAGGAAACC CTCCACTCAA CCACTCCCGA
75_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAA ATACAAGTCA AAAGGAAACC CTCCACTCAA CCACTCCCGA
56_RSV CACCACAGGA AATCCAAAAA ATACAAGTCA AAAGGAAACC CCCCCTCAA CCACTCCCGA
66_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAA ACACAAGTCA AAAGGAAACC CTCCACTCAA CTACTCCCGA
P2_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAA ACACAAGTCA AAAGGAAACC CTCCACTCAA CTACTCCCGA
41_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAC ACACAAGTCA AAAGGAAACC CTCCAATCAA CTACTCCCGA
47_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAC ACACAAGTCA AAAGGAAACC CTCCAATCAA CTACTCCCGA
79_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAC ACACAAGTCA AGAGGAAACC CTCCACTCAA CCACCTCCGA
61_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAC ACACAAGTCA AGAGGAAACC CTCCACTCAA CCACCTCCGA
64_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAC ACACAAGTCA AGAGGAAACC CTCCACTCAA CCACCTCCGA
P9_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAC ACACAAGTCA AGAGGAAACC CTCCACTCAA CCACCTCCGA
77_RSV CACCACAGGA AATCCAGAAC ACACAAGTCA AGAGGAAACC CTCCACTCAA CCACCTCCGA
50_RSV CATCACGGAA AATCAAGAAA ACACAAGTCA AGAGGAAACC CTCCACTCTA CCACCTCCGA
51-RSV CATCACGGAA AATCAAGAAA ACACAAGTCA AGAGGAAACC CTCCACTCTA CCACCTCCGA
11_RSV CATCACGGAA AATCAAGAAA ACACAAGTCA AGAGGAAACC CTCCACTCTA CCACCTCCGA

```

```

. . . | . . . | . . . | . . . | . . . | . . . |
      185      195      205      215      225      235
A2      AGGCAATCCA AGCCCTTCTC AAGTCTCTAC AACATCCGAG TACCCATCAC AACCTTCATC
Long    AGGCAATCTA AGCCCTTCTC AAGTCTCCAC AACATCCGAG CACCCATCAC AACCTTCATC
73_RSV AGGCAATCTA AGCCCTTCTC AAGTCTCCAC AACATCCGAG CACCCATCAC AACCTTCATC
72_RSV AGGCAATCCA AGCCCTTCAC AAGTCTATAC AACATCCGAG TACCTATCAC AATCTCCATC
86_RSV AGGCAATCCA AGCCCTTCAC AAGTCTACAC AACATCCGAG TACCTATCAC AATCTCCATC
67_RSV AGGCAATCCA AGCCCTTCAC AAGTCTATAC AACATCCGAG TACCTATCAC AATCTCCATC
63_RSV AGGCAATCCA AGCCCTTCAC AAGTCTATAC AACATCCGAG TACCTATCAC AATCTCCATC
76_RSV AGGCAATCCA AGCCCTTCAC AAGTCTATAC AACATCCGAG TACCTATCAC AATCTCCATC
94_RSV AGGCAATCCA AGCCCTTCAC AAGTCTATAC AACATCCGAG TACCTATCAC AATCTCCATC
87_RSV AGGCAATCCA AGCCCTTCAC AAGTCTATAC AACATCCGAG TACCTATCAC AATCTCCATC
74_RSV AGGCAATCCA AGCCCTTCAC AAGTCTATAC AACATCCGAG TACCTATCAC AATCTCCATC
75_RSV AGGCAATCCA AGCCCTTCAC AAGTCTATAC AACATCCGAG TACCTATCAC AATCTCCATC
56_RSV AGGCAATCCA AGCCCTTCAC AAGTCTATAC AACATCCGAG TACCTATCAC AATCTCCATC
66_RSV AGGCAATCCA AGCCCTTCAC AAGTCTATAC AACATCCGAG TACCTATCAC AATCTCTATC

```

...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|  
 185 195 205 215 225 235

P2_RSV	AGGCAATCCA	AGCCCTTCAC	AAGTCTATAC	AACATCCGAG	TACCTATCAC	AATCTCTATC
41_RSV	AGGCAATCCA	AGCCCTTCAC	AAGTCTATAC	AACATCCGAG	TACCTATCAC	AATCTCTATC
47_RSV	AGGCAATCCA	AGCCCTTCAC	AAGTCTATAC	AACATCCGAG	TACCTATCAC	AATCTCTATC
79_RSV	AGGCAATCTA	AGCCCATCAC	AAGTCTATAC	AACATCCGAG	TACCTATCAC	AATCTCCATC
61_RSV	AGGCAATCTA	AGCCCATCAC	AAGTCTATAC	AACATCCGAG	TACCTATCAC	AATCTCCATC
64_RSV	AGGCAATCTA	AGCCCATCAC	AAGTCTATAC	AACATCCGAG	TACCTATCAC	AATCTCCATC
P9_RSV	AGGCAATCTA	AGCCCATCAC	AAGTCTATAC	AACATCCGAG	TACCTATCAC	AATCTCCATC
77_RSV	AGGCAATCTA	AGCCCATCAC	AAGTCTATAC	AACATCCGAG	TACCTATCAC	AATCTCCATC
50_RSV	AAGCAATCTA	AGCCCTTCAC	AAGTCTATAC	AACATCCGAG	TACCTATCAC	AATCTCTATC
51_RSV	AAGCAATCTA	AGCCCTTCAC	AAGTCTATAC	AACATCCGAG	TACCTATCAC	AATCTCTATC
11_RSV	AAGCAATCTA	AGCCCTTCAC	AAGTCTATAC	AACATCCGAG	TACCTATCAC	AATCTCTATC

...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. .  
 245 255 265

A2	TCCACCCAAC	ACACCACGCC	AGTAGTTACT	T
Long	TCCACCCAAC	ACAACACGCC	AGTAGTTATT	-
73_RSV	TCCACCCAAC	ACAACACGCC	AGTAGTTATT	A
72_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAGAAT	GGTAGTCATT	A
86_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAGAAT	GGTAGTCATT	A
67_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAGAAT	GGTAGTCATT	A
63_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAGAAT	GGTAGTCATT	A
76_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAGAAT	GGTAGTCATT	A
94_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAGAAT	GGTAGTCATT	A
87_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAGAAT	GGTAGTCATT	A
74_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAGAAT	GGTAGTCATT	A
75_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAGAAT	GGTAGTCATT	A
56_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAGAAT	GGTAGTCATT	A
66_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAGAAT	GGTAGTCATT	A
P2_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAGAAT	GGTAGTCATT	A
41_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAAAAT	GGTAGTTATT	A
47_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAAAAT	GGTAGTTATT	A
79_RSV	TTCATCCAAC	ACAACAAAAT	GATAGTCATT	A
61_RSV	TTCATCCAAC	ACAACAAAAT	GATAGTCATT	A
64_RSV	TTCATCCAAC	ACAACAAAAT	GATAGTCATT	A
P9_RSV	TTCATCCAAC	ACAACAAAAT	GATAGTCATT	A
77_RSV	TTCATCCAAC	ACAACAAAAT	GATAGTCATT	A
50_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAAGAT	GGTAGTCATT	A
51_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAAGAT	GGTAGTCATT	A
11_RSV	TCCATCCAAC	ACAACAAGAT	GGTAGTcCATT	A



**Cuadro 9.** Secuencias deducidas de aminoácidos del extremo c-terminal de la proteína G de los 23 VRS grupo A chilenos del período 2005-2006.

A2	KKDKPKQTTKSKEVPTTKPT	EEPTI?HHQNKHHNYTTHLQHHRKSRTHKSNGNLP	LNFLRRQSKPFSSLYNIRVPIT	FISTQHHTTPVVT
Long	KKDHPKQTTKPKEVPTTKP	EEPTI?HHQNKHHNYTTHQQHHRKSKTHKSNGNLP	LNLLFRQSKPFSSLHNIRAPIT	TLISTQHNTPVVI
73_RSV	KKDLKPQTTKPKEVPTTKP	EEPTI?HHQNKHHNYTAHQHHRKSNTHKSNGNLP	LNLLFRQSKPFSSLHNIRAPIT	TLISTQHNTPVVI
72_RSV	KKDKPKQTTKPKEVHTTKP	TEKSTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRKYKSKGNPPLNHSRRQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNRMVVI	
86_RSV	KKDKPKQTTKPKEVHTTKP	TEKSTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRKYKSKGNPPLNHSRRQSKPFTSLHNIRVPIT	ISISIQHNRMVVI	
67_RSV	KKDKPKQTTKPKEVHTTKP	TEKSTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRKYKSKGNPPLNHSRRQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNRMVVI	
63_RSV	KKDKPKQTTKPKEVHTTKP	TEKSTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRKYKSKGNPPLNHSRRQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNRMVVI	
76_RSV	KKDKPKQTTKPKEVHTTKP	TEKSTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRKYKSKGNPPLNHSRRQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNRMVVI	
94_RSV	KKDKPKQTTKPKEVHTTKP	TEKSTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRKYKSKGNPPLNHSRRQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNRMVVI	
87_RSV	KKDKPKQTTKPKEVHTTKP	TEKSTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRKYKSKGNPPLNHSRRQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNRMVVI	
74_RSV	KKDKPKQTTKPKEVHTTKP	TEKSTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRKYKSKGNPPLNHSRRQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNRMVVI	
75_RSV	KKDKPKQTTKPKEVHTTKP	TEKSTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRKYKSKGNPPLNHSRRQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNRMVVI	
56_RSV	KKDKPKQTTKPKEVHTTKP	TEKSTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSKKYKSKGNPPLNHSRRQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNRMVVI	
66_RSV	KKDKPKQTTKPKEVHTTKP	TEKPTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRKHKSKGNPPLNYSRRQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNRMVVI	
P2_RSV	KKDKPKQTTKPKEVHTTKP	TEKPTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRKHKSKGNPPLNYSRRQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNRMVVI	
41_RSV	KKEPKQTTKPKEVLTTKL	TEKPTI?HHQSKHQNYTAHLQHHRKSRTHKSKGNPPINYLRRQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNKMVVI	
47_RSV	KKEPKQTTKPKEVLTTKL	TEKPTI?HHQSKHQNYTAHLQHHRKSRTHKSKGNPPINYLRRQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNKMVVI	
79_RSV	KKDKPKQTTKPKEVLTTK	TEKPTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRTHKSRGNPPLNHLRRQSKPITSLYNIRVPIT	ISISIFIQHNMIVI	
61_RSV	KKDKPKQTTKPKEVLTTK	TEKPTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRTHKSRGNPPLNHLRRQSKPITSLYNIRVPIT	ISISIFIQHNMIVI	
64_RSV	KKDKPKQTTKPKEVLTTK	TEKPTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRTHKSRGNPPLNHLRRQSKPITSLYNIRVPIT	ISISIFIQHNMIVI	
P9_RSV	KKDKPKQTTKPKEVLTTK	TEKPTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRTHKSRGNPPLNHLRRQSKPITSLYNIRVPIT	ISISIFIQHNMIVI	
77_RSV	KKDKPKQTTKPKEVLTTK	TEKPTI?HHQNKHQNYTAHLQHHRKSRTHKSRGNPPLNHLRRQSKPITSLYNIRVPIT	ISISIFIQHNMIVI	
50_RSV	KKDKPKQTTKPKEAPTTK	TEKPTI?HHQNKHQNYTAHLQHGGKSRKHKSRGNPPLYHLRKQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNKMVVI	
51_RSV	KKDKPKQTTKPKEAPTTK	TEKPTI?HHQNKHQNYTAHLQHGGKSRKHKSRGNPPLYHLRKQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNKMVVI	
11_RSV	KKDKPKQTTKPKEAPTTK	TEKPTI?HHQNKHQNYTAHLQHGGKSRKHKSRGNPPLYHLRKQSKPFTSLYNIRVPIT	ISISIQHNKMVVI	

En rectángulo las zonas aminoacídicas que tienden a ser diferentes entre las muestras y las cepas de referencias

**Cuadro 10.** Matriz de distancias de las secuencias deducidas de aminoácidos del extremo c-terminal de la proteína G de los 23 VRS del grupo A chilenos y las cepas de referencia A2 y long.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
23	24																						
[ 1]	A2																						
[ 2]	Long	0.124																					
[ 3]	73_RSV	0.180	0.034																				
[ 4]	72_RSV	0.393	0.303	0.337																			
[ 5]	86_RSV	0.393	0.270	0.315	0.011																		
[ 6]	67_RSV	0.393	0.303	0.337	0.000	0.011																	
[ 7]	63_RSV	0.393	0.303	0.337	0.000	0.011	0.000																
[ 8]	76-RSV	0.393	0.303	0.337	0.000	0.011	0.000	0.000															
[ 9]	94_RSV	0.393	0.303	0.337	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000														
[10]	87_RSV	0.393	0.303	0.337	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000													
[11]	74_RSV	0.393	0.303	0.337	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000												
[12]	75_RSV	0.393	0.270	0.315	0.011	0.000	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011											
[13]	56_RSV	0.427	0.315	0.360	0.011	0.022	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011										
[14]	66_RSV	0.382	0.281	0.315	0.011	0.022	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.022	0.022								
[15]	P2_RSV	0.382	0.281	0.315	0.011	0.022	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.022	0.022	0.000							
[16]	41_RSV	0.348	0.258	0.281	0.067	0.090	0.067	0.067	0.067	0.067	0.067	0.067	0.067	0.090	0.067	0.067	0.067						
[17]	47_RSV	0.348	0.258	0.281	0.067	0.090	0.067	0.067	0.067	0.067	0.067	0.067	0.067	0.090	0.067	0.067	0.067	0.000					
[18]	79_RSV	0.382	0.225	0.236	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.146	0.090	0.090	0.079	0.079				
[19]	61_RSV	0.382	0.225	0.236	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.146	0.090	0.090	0.079	0.079	0.000			
[20]	64_RSV	0.382	0.225	0.236	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.146	0.090	0.090	0.079	0.079	0.000	0.000		
[21]	P9_RSV	0.382	0.225	0.236	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.146	0.090	0.090	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	
[22]	77_RSV	0.382	0.225	0.236	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.146	0.090	0.090	0.079	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000
[23]	50_RSV	0.449	0.281	0.315	0.101	0.112	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.112	0.079	0.067	0.067	0.090	0.090	0.112	0.112	0.112	0.112
[24]	51_RSV	0.449	0.281	0.315	0.101	0.112	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.112	0.079	0.067	0.067	0.090	0.090	0.112	0.112	0.112	0.112
[25]	11_RSV	0.449	0.281	0.315	0.101	0.112	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.112	0.079	0.067	0.067	0.090	0.090	0.112	0.112	0.112	0.112
		0.112	0.000	0.000																			

**Cuadro 11.** Genotipos de VRS en los pacientes estudiados 2005-2006.

Genotipo	2005			2006			Total		
	Leves	Graves	Total	Leves	Graves	Total	Leves	Graves	Total
GA1	0	0	0	1(4,5%)	0	1(4,5%)	1(0,27%)	0	1(0,27%)
GA2	3 (10%)	2(6,6%)	5(16,6%)	9(40,9%)	8(36,3%)	17(77,2%)	12(23%)	10(19,2%)	22(42,3%)
GBuru1	1(3,3%)	1(3,3%)	2(6,6%)	0	1(4,5%)	1(4,5%)	1(0,27%)	2(3,8%)	3(5,8%)
GBA	8(26,6%)	15(50%)	23(76,6%)	1(4,5%)	2(9%)	3(13,6%)	9(17,3%)	17(32,7%)	26(50%)
			30(100%)			22(100%)			52(100%)



```

#70_RSV AACC CAACAA - -AAAAA-CC AACCCCAAG ACCACAGAAA GAGACACCAG CACCCACAA
#93_RSV AACC CAACAA - -AAAAA-CC AACCCCAAG ACCACAGAAA GAGACACCAG CACCCACAA
#10_RSV AACC CAACAA - -AAAAA-CC AACCCCAAG ACCACAGAAA GAGACACCAG CACCCACAA
#8_RSV AACC CAACAA - -AAAAA-CC AACCCCAAG ACCACAGAAA GAGACACCAG CACCCACAA
#22_RSV AACC CAACAA - -AAAAA-CC AACCCCAAG ACCACAGAAA GAGACACCAG CACCCACAA
#31_RSV AACC CAACAA - -AAAAA-cC AACCCCAAG ACCACAGAAA GAGACACCAG CACCCACAA
#30_RSV AACC CAACAA - -AAAAA-CC AACCCCAAG ACCACAGAAA GAGACACCAG CACCCACAA
#37_RSV AACC CAACAA - -AAAAA-CC AACCCCAAG ACCACAGAAA GAGACACCAG CACCCACAA
#27_RSV AACC CAACAA - -AAAAA-CC AACCCCAAG ACCACAGAAA GAGACACCAG TACTCCACAA
#45_RSV AACC CAACAA - -AAAAA-CC AACCCCAAG ACCACAGAAA GAGACACCAG CACCCACAA
#39_RSV AACC CAACAA - -AAAAA-CC AACCCCAAG ACCACAGAAA GAGACAcCAG CACCCACAA
#21_RSV AACC CAACAA - -AAAAA-CC AACCCCAAG ACCACAGAAA GAGACACCAG CACCCACAA
#15_RSV AACC CAACAA - -AAAAA-CC AACCCCAAG ACCACAGAAA GAGACATCAG CACCCACAA
#53_RSV AACC CAACAA - -AAAAA-CC AACCCCAAG ACCACAGAAA GAGACATCAG CACCCACAA
#52_RSV AaCC CAACAA - -AAAAa-Cc AACCCCAaG ACCACAGAAA GAGACAccAG CACCCACAA

```

```

. . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | . . . . |
      125      135      145      155      165      175

```

```

#CH18537 -----AGAA AGAGACACCA GCATTTTCA
#1_RSV -----AGGA AGAGACACCA GCACTTCACA
#69_RSV -----AGGa AGAGACACCA GCACTTCACA
#26_RSV -----cGGA AGAGACACCA GCACTTcTGA
#6_RSV TCCACTGTGC TCGACGCAGC CACA-TCGAA GCACACGGAG AGAGACACCA GCACCTCACA
#9_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#12_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#33_RSV TCCACTGTGC TCGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACA
#35_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#28_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#36_RSV TCCACTGTGC TCGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACA
#40_RSV TCCACTGTGC TTGATAACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#43_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#44_RSV TCCACTGTGC TCGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACA
#58_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAT AGAGACACCA GCACCTCACC
#70_RSV TCCACTGTGC TCGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACA
#93_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#10_RSV TCCAcTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#8_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#22_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#31_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#30_RSV TCCACTGTGC TCGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCCACACA
#37_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#27_RSV TCCACCGTGC TCGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACA
#45_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#39_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#21_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#15_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#53_RSV TCCACTGTGC TTGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACT
#52_RSV TCCAcTGTGC TcGACACAAC CACA-TCAAA ACACACAGAA AGAGACACCA GCACCTCACA

```

```

...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
185      195      205      215      225      235
#CH18537 ATCCACCGTG CTCGACACAA TCACTCCAAA ATACACAATC CAACAGCAAT CCCTCC-ACT
#1_RSV ATCCACTGTG CTCGACACAA CCACATCAGA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCC-ACT
#69_RSV ATCCACTGTG CTCGACACAA CCACATCAGA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCC-ACT
#26_RSV GTcCACTGTG CTCGACACAA CCACaTCAGA GCaCaCaATC CAACaGCaAT CCCTcTcacT
#6_RSV ATCCATTGCG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#9_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#12_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#33_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#35_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#28_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#36_RSV ATCCATTGTG CTCGTcACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#40_RSV ATCCATTGTG CTCAACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCC-ACT
#43_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#44_RSV ATCCATTGTG CTTGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCC-ACT
#58_RSV ATCCATTGCG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACC
#70_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#93_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#10_RSV ATCCaTTGtG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACaGCaAT CCCTCT-ACT
#8_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#22_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#31_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#30_RSV ATCCATTGCG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCC-ACT
#37_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#27_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACACTC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#45_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#39_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#21_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#15_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#53_RSV ATCCATTGTG CTCGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCT-ACT
#52_RSV ATCCATTGTG CTcGACACAA CCACATCAAA ACACACAATC CAACAGCAAT CCCTCC-ACT

```

```

...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
245      255      265      275      285      295
#CH18537 CAACCACCTC CGAAAACACA CCCAGCTCCA CACAAATACC CACAGCATCC GAGCCCTCCA
#1_RSV CAACCACTCC TGAAAACACA CCCAACTCCA CACAAACACC CACAGCATCC GAGCCCTCCA
#69_RSV CAACCACTCC tGAAAACACA CCCAACTCCA CACAAACACC CACAGCATCC GAGCCCTCCA
#26_RSV CaacCACTCC TGAAAaCACA CCCaACTCCC CaCaAaCACc CaCaGcATcC GAGCCCTCca
#6_RSV CAACCACCCC CGAAAACACA CCCAACTCCA CACAAACACC CACA
#9_RSV CAACCACCCC CAAAAACACA CCCAACTTCA CACAAACACC CTCA
#12_RSV CAACCACCCC TGAAAACACA CCCAACTCCA CATAAACACC CACA
#33_RSV CAACCACCCC CGAAAACACA CCCAACTCCA CACAAACACC CACA
#35_RSV CAACCACCCC CGAAAACACA CCCAACTTCA CACAAACACC CTCA
#28_RSV CAACCACCCC CGAAAACACA CCCAACTTCA CACAAACACC CTCA
#36_RSV CAACCACCCC CGAAAACACA CCCAACTCCA CACAACCACC CACA
#40_RSV CAACCACCCC CGAAAACACA CCCAACTCCA CACAAACACC CACA
#43_RSV CAACCACCCC CGAAAACACA CCCAACTCCA CACAAACACC CACA
#44_RSV CAACCACCCC CGAAAACACA CCCAACTCCA CACAAACACC CACA
#58_RSV CAACCACCCC CGAAAACACA CCCAACTCCA CACAAACACC CACA
#70_RSV CAACCACCCC CGAAAACACA CCCAACTCCA CACAAACACC CACA
#93_RSV CAACCACCCC CGAAAACACA CCCAACTCCA CACAAACACC CACA
#10_RSV CAACCACCCC cGAAAACACA cCCaAcTCCa CACAAACaCC CaCa

```

#8_RSV	CAACCACCCC	CGAAAAACACA	CCCAACTTCA	CACAAACACC	CACA
#22_RSV	CAACCACCCC	CGAAAAACACA	CCCAACTTCA	CACAAACACC	CACA
#31_RSV	CAACCACCCC	CGAAAAACACA	CCCAACTTCA	CACAAACACC	CACA
#30_RSV	CAACCACCCC	CGAAAAACACA	CCCAACTCCA	CACAAACACC	CACA
#37_RSV	CAACCACCCC	CGAAAAACACA	CCCAACTCCA	CACAAAAACC	CACA
#27_RSV	CAACCACCCC	CGAAAAACACA	CCCAACTCCA	CACAAACACC	CACA
#45_RSV	CAACCACCCC	TGAAAAACACA	CCCAACTCCA	CACAAACACC	CACA
#39_RSV	CAACCACCCC	TGAAAAACACA	CCCAACTCCA	CACAAACACC	CACA
#21_RSV	CAACCACCCC	TGAAAAACACA	CCCAACTCCA	CACAAACACC	CACA
#15_RSV	CAACCACCCC	CGAAAAACACA	CCCAACTCCA	CACAAACACC	CACA
#53_RSV	CAACCACCCC	CGAAAAACACA	CCCAACTCCA	CACAAACACC	CACA
#52_RSV	CAACCACCCC	gGAAAAACACA	CCCAACTCCA	CAAAAAACACC	CACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|

305                    315                    325                    335                    345

#CH18537	CATTAAATCC	T-AATTAATA	AACCTAGTCA	CATGCTTAGT	TATTC
#1_RSV	CATCGAATTC	C-ACCCAAAA	AATCTAGTCA	TATGCT	
#69_RSV	CATcGAATTC	C-ACCCAAAA	AATCTAGTCA	TATGCT	
#26_RSV	CATCGAATTC	C-ACCCAAAA	AATCTAGTCA	TATGC	
#6_RSV					
#9_RSV					
#12_RSV					
#33_RSV					
#35_RSV					
#28_RSV					
#36_RSV					
#40_RSV					
#43_RSV					
#44_RSV					
#58_RSV					
#70_RSV					
#93_RSV					
#10_RSV					
#8_RSV					
#22_RSV					
#31_RSV					
#30_RSV					
#37_RSV					
#27_RSV					
#45_RSV					
#39_RSV					
#21_RSV					
#15_RSV					
#53_RSV					
#52_RSV					



[35] 8\_RSV 0.058 0.034 0.034 0.019 0.005 0.024 0.043 0.072 0.034 0.072 0.072 0.072 0.043 0.058 0.043 0.125 0.063 0.005 0.005 0.101 0.024 0.005 0.005 0.014 0.005 0.005  
0.014 0.024 0.005 0.014 0.034 0.005 0.005 0.005  
[36] 22\_RSV 0.058 0.034 0.034 0.019 0.005 0.024 0.043 0.072 0.034 0.072 0.072 0.072 0.043 0.058 0.043 0.125 0.063 0.005 0.005 0.101 0.024 0.005 0.005 0.014 0.005 0.005  
0.014 0.024 0.005 0.014 0.034 0.005 0.005 0.005 0.000

**Cuadro 14.** Secuencias deducidas de aminoácidos del extremo c-terminal de la proteína G de los 23 VRS del grupo B chilenos del período 2005-2006.

```

#BA383399B KRDPKKLAKTLKKE? - - ?TINPT?K?PTPKTTERDTSTVSQSTVLDTTT ?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHP
#CH18537 KRDPKTPAKMPKKE?--?ITNPA?K?PTLKT?-----RKRHQHFTIHRARHNSKIHNPTAIP?TQPPPKTHPAPHKYPQHSPPH*I?N*
#mon/7/01 KRDPKTPAKTLKKE??E??TINPT?K?PTPKT?-----RKRHQHLTIHCAHNNHIRTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHPQHSPPHRI?TQ
#mon/1/99 KRDPKTLAKTLKKE?--?TINPT?K?PTPKT?-----RKRHQHLTIHCAHNNHIRTHNPTAIP?TQPLLKTHPTPHKHPQHSPPHRI?TQ
#1_RSV KRDPKTLAKTLKKEKKEKETTINPT?K?PTPKT?-----RKRHQHFTIHRARHNSKIHNPTAIP?TQPLLKTHPTPHKHPQHSPPHRI?TQ
#69_RSV KRDPKTLAKTLKKEKKEKETTINPT?K?PTPKT?-----RKRHQHFTIHRARHNSKIHNPTAIP?TQPLLKTHPTPHKHPQHSPPHRI?TQ
#26_RSV KRDPKTLAKTLKKEKKEKETTINPT?K?PTPKT?-----RKRHQHF*VHCAHNNHIRAHNPTAIP?TQPLLKTHPTPHKHPQHSPPHRI?TQ
#6_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDAA?EAHGERHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHP
#9_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTSHKHP
#12_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPLLKTHPTPHKHP
#33_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHP
#35_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTSHKHP
#28_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTSHKHP
#36_RSV KRDPKTLAKTLKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHNHP
#40_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHP
#43_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHP
#44_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCA*HNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHP
#58_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHR*RHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHP
#70_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHP
#93_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHP
#10_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHP
#8_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTSHKHP
#22_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTSHKHP
#31_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTSHKHP
#30_RSV KRDPKTLAKTPDKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHP
#37_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHP
#27_RSV KRDPKTLAKTLKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHP
#45_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPLLKTHPTPHKHP
#39_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPLLKTHPTPHKHP
#21_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPLLKTHPTPHKHP
#15_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDISTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHP
#53_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDISTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPPKHPTPHKHP
#52_RSV KRDPKTLAKTPKKE?--?TINPT?K?PTPKTTERDTSTPQSTVLDTTT?KTHRKRHQHLTIHCAHNNHIKTHNPTAIP?TQPPRKHPTPHKHP

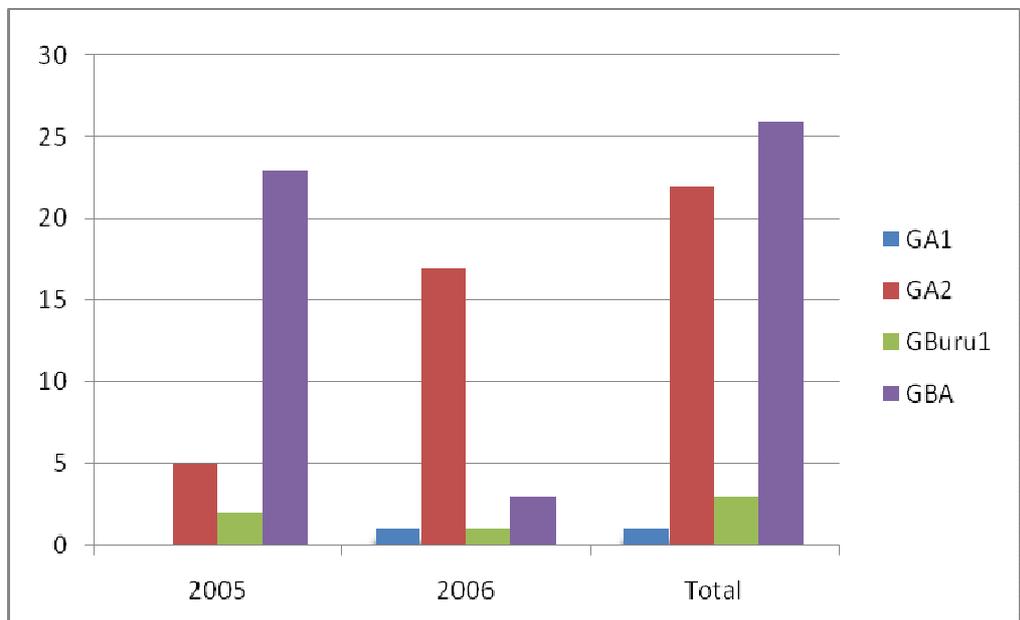
```

En cuadrado azul señala las dos lisinas extras en las cepas chilenas.

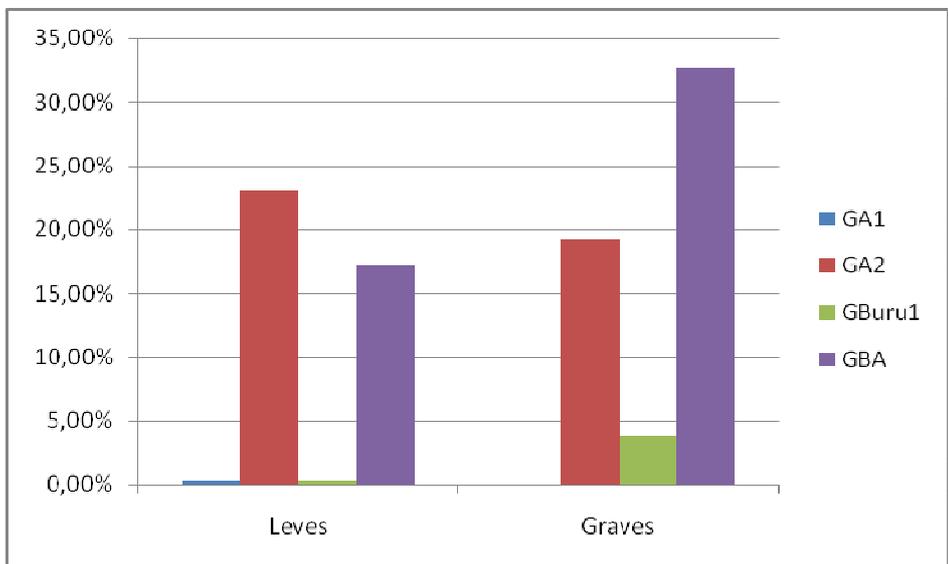
**Cuadro 15.** Matriz de distancias de las secuencias deducidas de aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína G de los 23 VRS del grupo A chilenos y las cepas de referencia A2 y long.

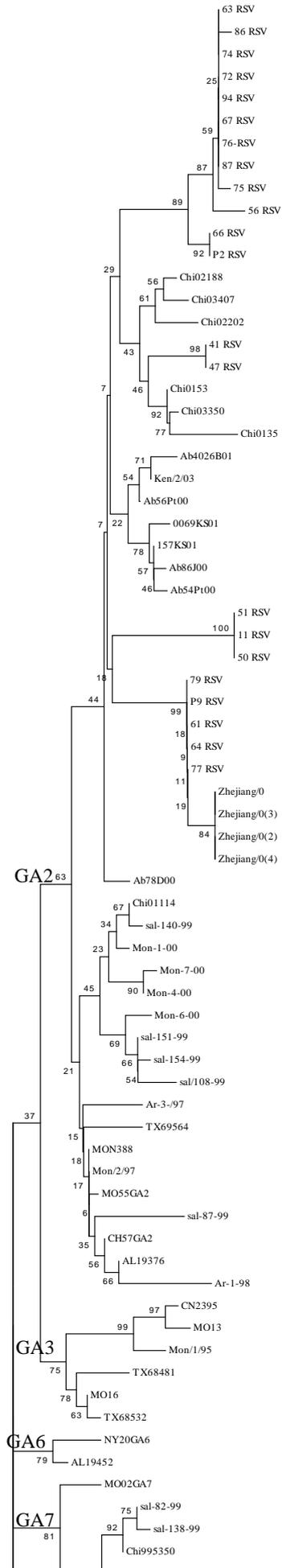
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
[ 1] CH18537																										
[ 2] 1_RSV	0.429																									
[ 3] 69_RSV	0.429	0.000																								
[ 4] 26_RSV	0.365	0.032	0.032																							
[ 5] 6_RSV	0.254	0.175	0.175	0.206																						
[ 6] 9_RSV	0.222	0.111	0.111	0.143	0.032																					
[ 7] 12_RSV	0.254	0.079	0.079	0.111	0.032	0.016																				
[ 8] 33_RSV	0.222	0.143	0.143	0.175	0.016	0.016	0.016																			
[ 9] 35_RSV	0.222	0.111	0.111	0.143	0.032	0.000	0.016	0.016																		
[10] 28_RSV	0.222	0.111	0.111	0.143	0.032	0.000	0.016	0.016	0.000																	
[11] 36_RSV	0.270	0.079	0.079	0.111	0.048	0.032	0.016	0.032	0.032	0.032																
[12] 40_RSV	0.222	0.143	0.143	0.175	0.016	0.016	0.016	0.000	0.016	0.016	0.032															
[13] 43_RSV	0.222	0.143	0.143	0.175	0.016	0.016	0.016	0.000	0.016	0.016	0.032	0.000														
[14] 44_RSV	0.222	0.143	0.143	0.175	0.016	0.016	0.016	0.000	0.016	0.016	0.032	0.000	0.000													
[15] 58_RSV	0.222	0.143	0.143	0.175	0.016	0.016	0.016	0.000	0.016	0.016	0.032	0.000	0.000	0.000												
[16] 70_RSV	0.222	0.143	0.143	0.175	0.016	0.016	0.016	0.000	0.016	0.016	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000											
[17] 93_RSV	0.222	0.143	0.143	0.175	0.016	0.016	0.016	0.000	0.016	0.016	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000										
[18] 10_RSV	0.222	0.143	0.143	0.175	0.016	0.016	0.016	0.000	0.016	0.016	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
[19] 8_RSV	0.222	0.111	0.111	0.143	0.032	0.000	0.016	0.016	0.000	0.000	0.032	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016							
[20] 22_RSV	0.222	0.111	0.111	0.143	0.032	0.000	0.016	0.016	0.000	0.000	0.032	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.000						
[21] 31_RSV	0.222	0.111	0.111	0.143	0.032	0.000	0.016	0.016	0.000	0.000	0.032	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.000	0.000					
[22] 30_RSV	0.238	0.238	0.238	0.270	0.048	0.063	0.079	0.032	0.063	0.063	0.079	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.063	0.063	0.063				
[23] 37_RSV	0.222	0.159	0.159	0.190	0.032	0.032	0.032	0.016	0.032	0.032	0.032	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.032	0.032	0.032	0.048			
[24] 27_RSV	0.333	0.079	0.079	0.127	0.048	0.032	0.016	0.032	0.032	0.032	0.048	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.095	0.063		
[25] 45_RSV	0.254	0.079	0.079	0.111	0.032	0.016	0.000	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.079	0.032	0.016	
[26] 39_RSV	0.254	0.079	0.079	0.111	0.032	0.016	0.000	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.079	0.032	0.016	0.000
[27] 21_RSV	0.254	0.079	0.079	0.111	0.032	0.016	0.000	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.079	0.032	0.016	0.000
[28] 15_RSV	0.222	0.143	0.143	0.175	0.016	0.016	0.016	0.000	0.016	0.016	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.016	0.016	0.032	0.016	0.032	0.016
[29] 53_RSV	0.222	0.143	0.143	0.175	0.016	0.016	0.016	0.000	0.016	0.016	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.016	0.016	0.032	0.016	0.032	0.016
[30] 52_RSV	0.222	0.111	0.111	0.143	0.063	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.048	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.079	0.032	0.048	0.032

**Gráfico 25.** Distribución de genotipos detectados en los aislados de VRS chilenos en 2005-2006.

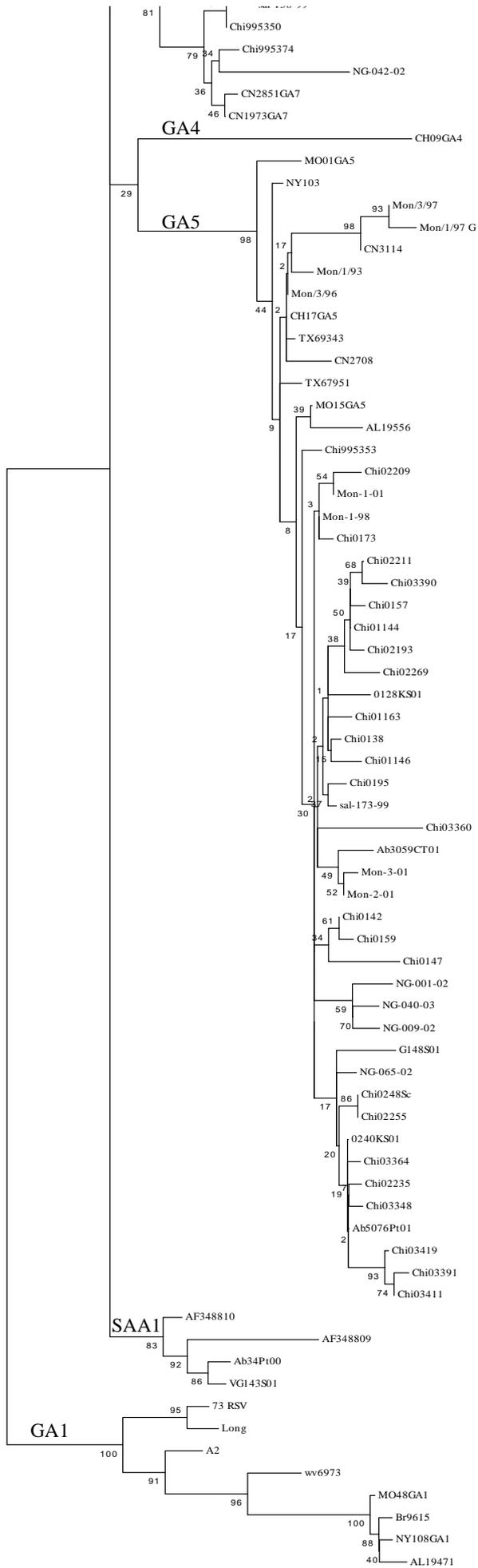


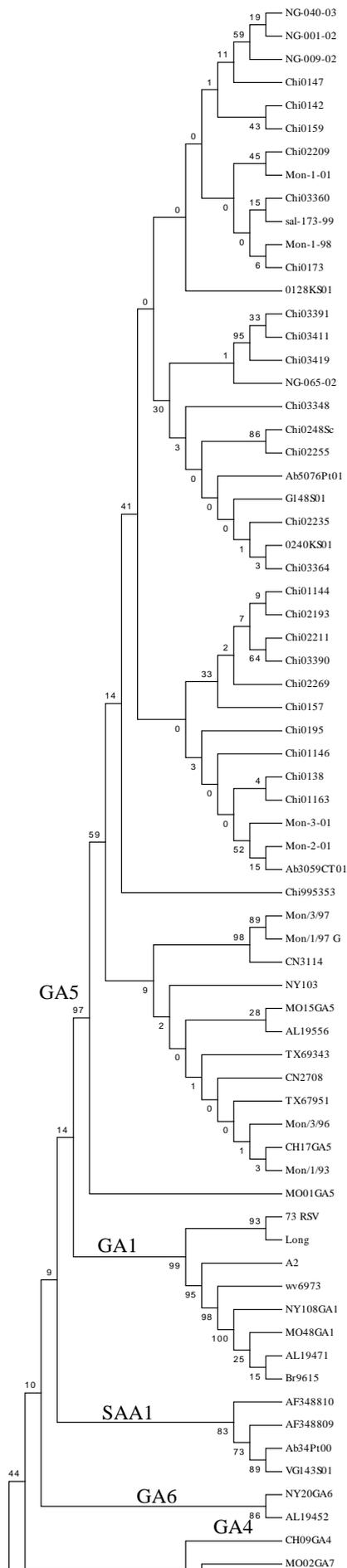
**Gráfico 26.** Distribución de genotipos de VRS de niños con IRAB según gravedad clínica (p=0,238).



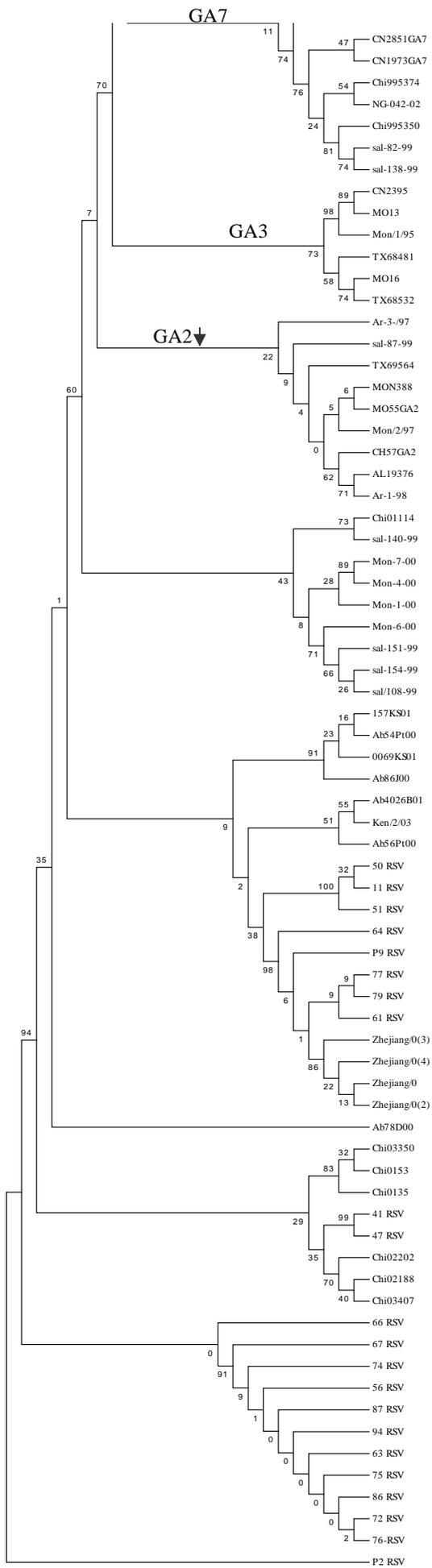


**Figura 1.** Árbol filogenético obtenido por NJ de VRS grupo A.

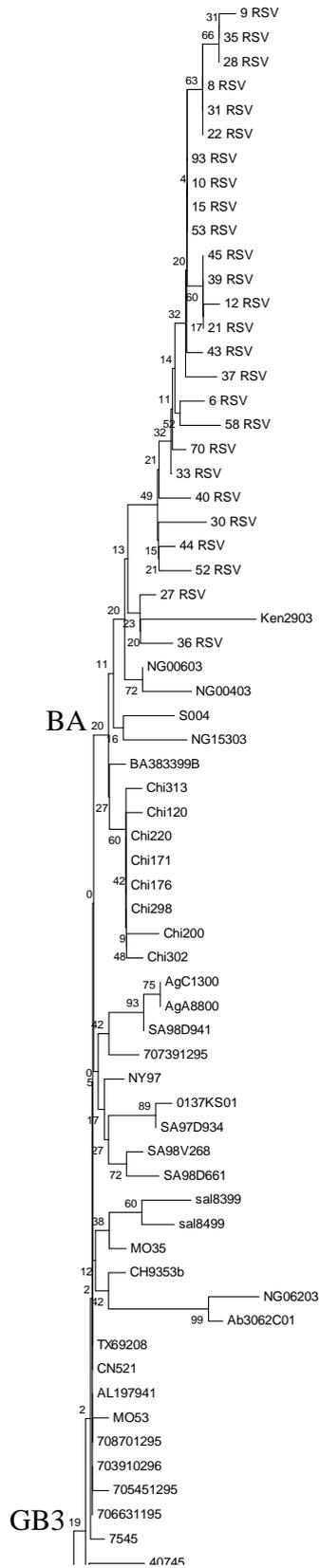


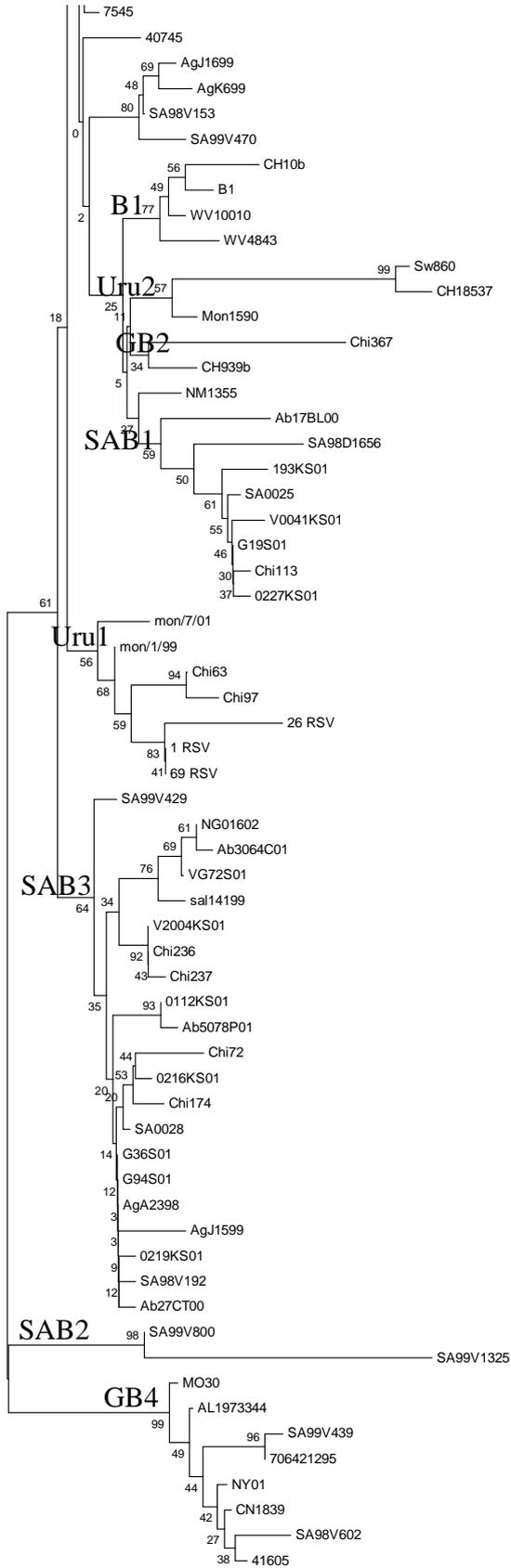


**Figura 2.** Árbol filogenético VRS grupo  
A obtenido con el método de maximaparsimonia.

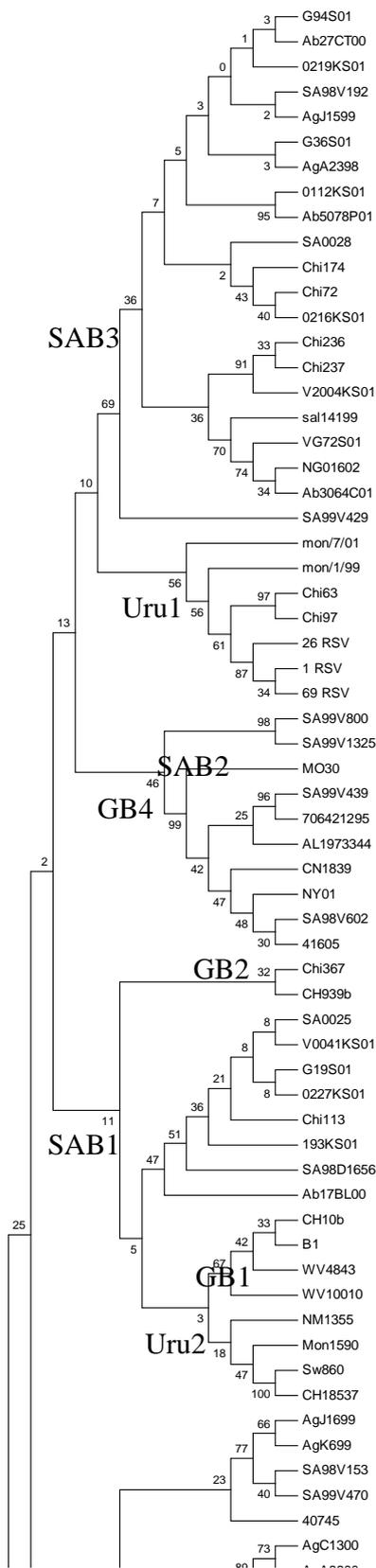


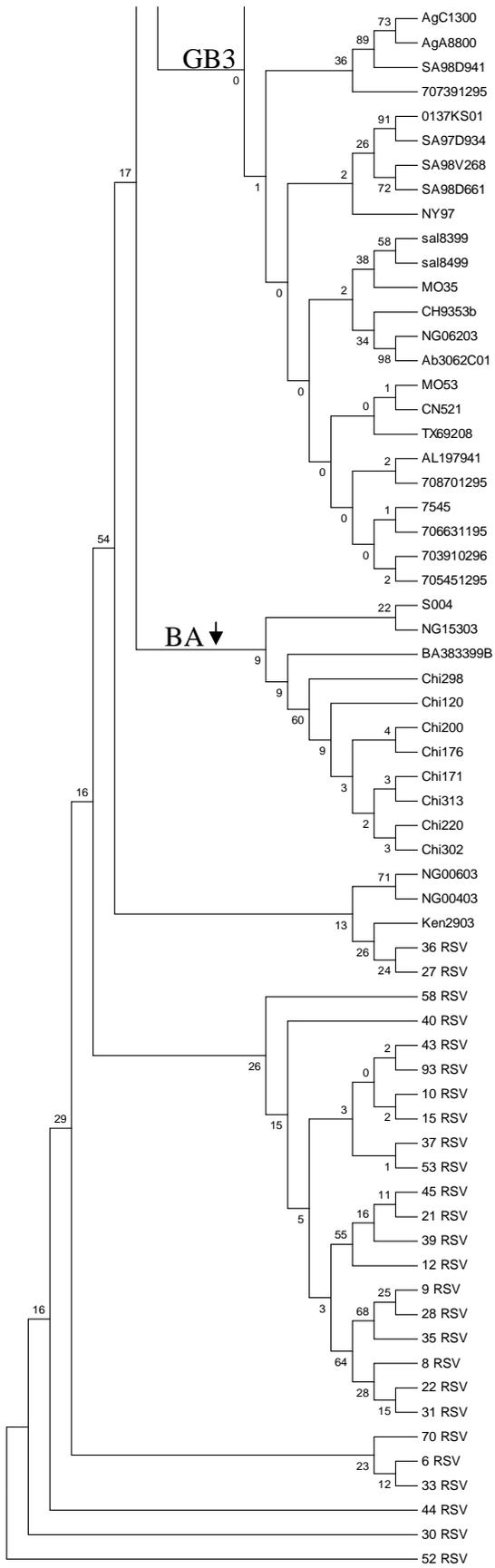
**Figura 3.** Árbol filogenético VRS grupo B obtenido con el método NJ.





**Figura 4.** Árbol filogenético VRS grupo B  
obtenido con el método de  
máxima parsimonia





## ANEXO 1

Sistema de criterios de gravedad.

Puntaje	Hospitalización	Suplemento Oxígeno	Máximo FIO <sub>2</sub>	Máximo Puntaje <sup>c</sup>
<b>0</b>	No	No	21 %	<b>0</b>
<b>1</b>	≤ 5 días	Si	22 – 30 %	<b>1-3</b>
<b>2</b>	> 5 días	< 3 días + ( 1 )	≥ 31%	<b>2-7</b>
<b>3</b>	UCI <sup>a</sup> + ( 1 or 2 )	≥ 3 días + ( 1 )	VM <sup>b</sup> + ( 1 or 2 )	<b>4 - 14</b>
<b>Máximo Puntaje por Ítem</b>	<b>1 - 5</b>	<b>1 - 4</b>	<b>1 – 5</b>	<b>1 - 14</b>

<sup>a</sup> UCI: Unidad de cuidados Intensivos; <sup>b</sup> Ventilación mecánica; <sup>c</sup> Puntajes 0-3 indica leves, 3 a 6 indica moderadas y puntajes 7-14 indica enfermos severos.

## ANEXO 2

Marcadores de superficie utilizados en Citometría de flujo.

<b>CD3</b>	Marcador de linfocitos T, se expresa en la superficie celular, importante para la expresión y transmisión de señales del TCR.
<b>CD4</b>	Marcador de linfocitos Th, correceptor de señalización y adhesión en la activación de LT restringidos por el MHC II
<b>CD8</b>	marcador de Linfocitos citotóxicos, correceptor de señalización y adhesión en la activación de linfocitos T restringidos por MHC I.
<b>CD19</b>	Marcador de Linfocitos B, forma un complejo correceptor con CD21 y CD81, que emite señales que actúan sinérgicamente con las procedentes del complejo del receptor antigénico de los linfocitos B.
<b>CD56</b>	Marcadores de células NK, CD56 es molécula de adhesión.
<b>CD45RO</b>	Marcador de linfocitos memoria T y B, corresponde a una tirosina fosfatasa esencial en la señalización mediada por el receptor antigénico de los LT y LB. Isoforma de CD45.
<b>CD45RA</b>	Marcador de linfocitos vírgenes T y B, corresponde a una tirosina fosfatasa esencial en la señalización mediada por el receptor antigénico de los LT y LB. Isoforma de CD45
<b>CD25</b>	Marcador de activación temprana de Linfocitos T, forma parte del receptor de IL-2.
<b>HLA-DR</b>	Marcador de activación tardía de linfocitos T, corresponde a un subtipo de molécula de histocompatibilidad tipo II.
<b>CD57</b>	Marcador de activación de células NK, epitopo de glicoproteína y glicolípidos, seguramente con función de adhesión
<b>CD94</b>	Marcador de receptor NK, el complejo CD94/NKG2 actúa como inhibidor de la muerte de linfocitos NK.

### ANEXO 3

Distribución de anticuerpos monoclonales

	FITC (f11)*	PE (f12)*	TC (f13)*
Tubo 1	CD3	CD4	CD45
Tubo 2	CD3	CD8	CD45
Tubo 3	CD3	CD19	CD45
Tubo 4	CD3	CD56	CD45
Tubo 5	Células	Sin	Marcaje
Tubo 6	CD45RO		CD45RA
Tubo 7			CD3
Tubo 8	CD25		CD3
Tubo 9	CD3		
Tubo 10	CD3		HLA-DR
Tubo 11			CD56
Tubo 12	CD57	CD94	CD56

\*: Son las tres fluorescencias unidas al Ac. Monoclonal según corresponda

\*\* : La leyenda de los marcadores celulares se encuentra en el Cuadro 2.

FITC: fluoresceína-5-isotiocianato

PE: ficoeritrina

TC: tercer color

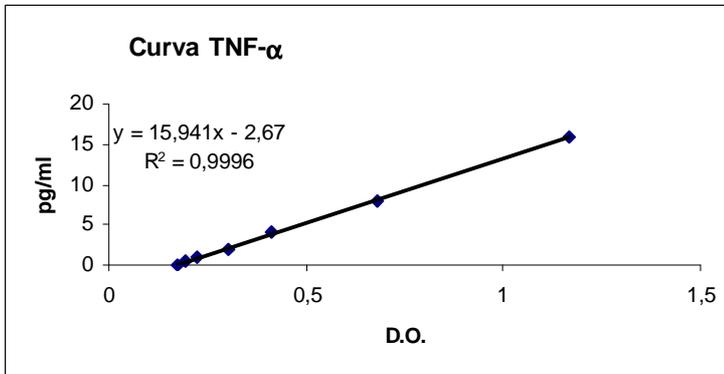
### ANEXO 4

Partidores usados en la genotipificación

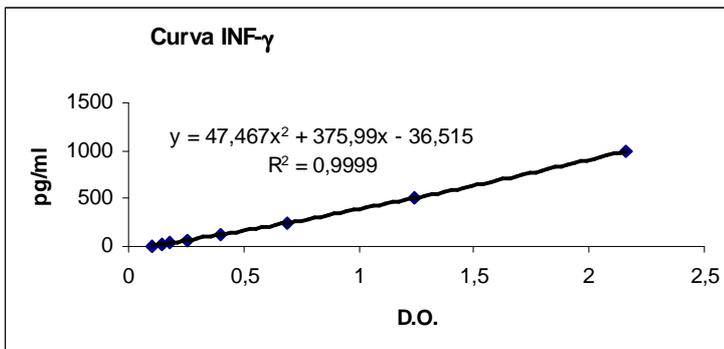
Partidor	Uso	Posición (Nucleótidos)	Secuencias	Ref.
F844 (+)	RT	844-861	TGTCTAACTATTTGAACA	López <i>et al</i> , 1998
FV(-)	PCR	163-186	GTTATGACACTGGTATACCAACC	Peret <i>et al</i> , 2000
GAB(+)	PCR Y SECUENCIACIÓN	504-524	YCA YTTTGAAGTGTTC AACTT	Peret <i>et al</i> , 2000
F1AB(-)	PCR Y SECUENCIACIÓN	2-22	CAACTCCATTGTTATTTGCC	Peret <i>et al</i> , 1998

## ANEXO 5

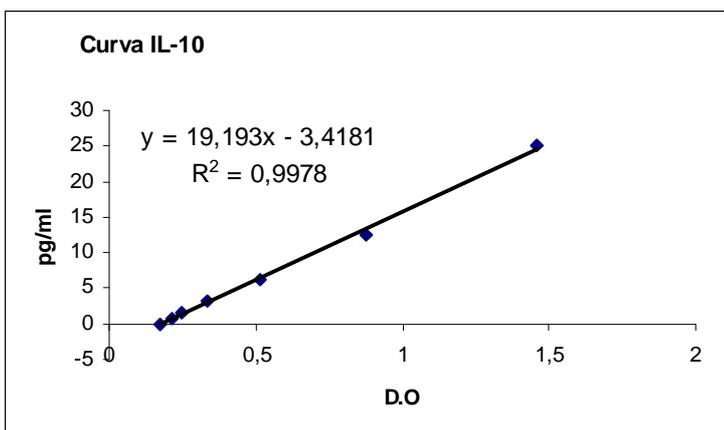
### Curvas de calibrado de ELISAs



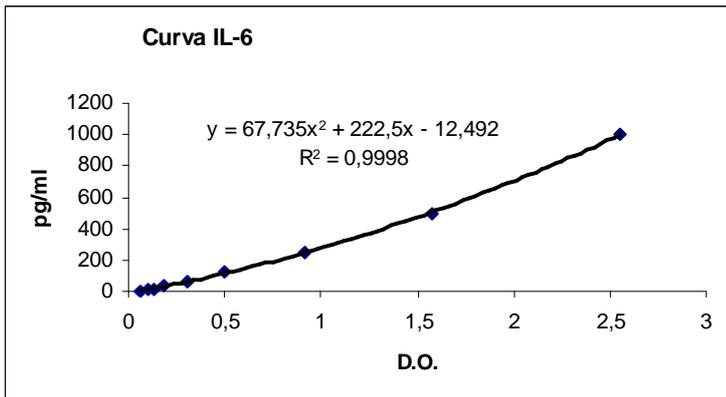
Curva de calibrado del ELISA para TNF- $\alpha$ .



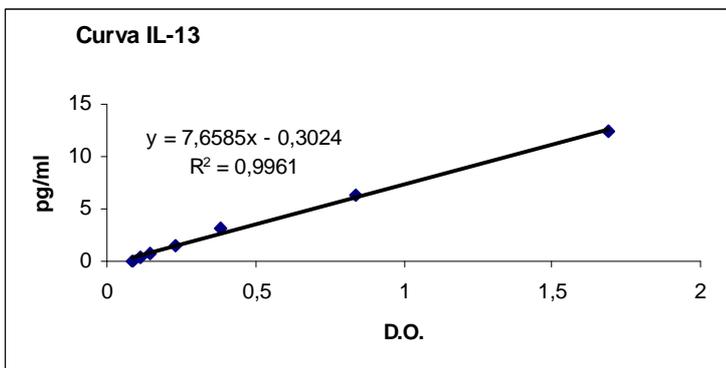
Curva Calibrado ELISA para INF- $\gamma$ .



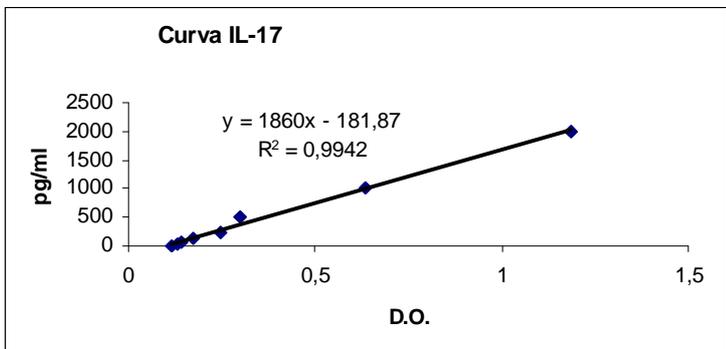
Curva de calibrado ELISA para IL-10.



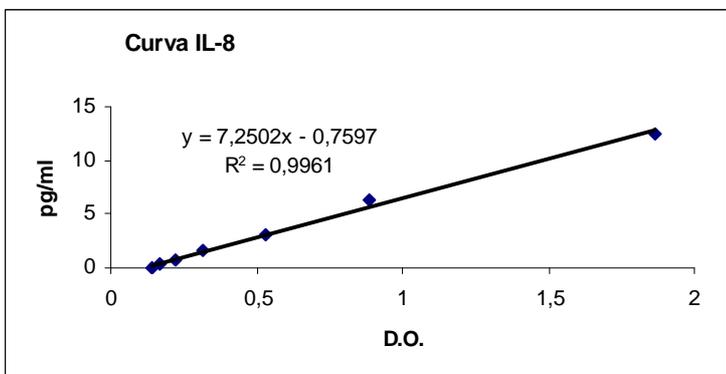
Curva de calibrado ELISA para IL-6.



Curva calibrado de ELISA para IL-13.



Curva calibrado de ELISA para IL-17.



Curva de calibrado de ELISA para IL-8.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**ALWAN, W.; RECORD, F.; OPENSHAW, P.** 1992. CD4+ T Cells clear virus but augment disease in mice infected with respiratory syncytial virus: comparison with the effects of CD8+ cells. *Clin. Exp. Immunol.* 88: 527-536.

**ARBIZA, J.; DELFRARO, A.; FRABASILE, S.** 2005. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001 – Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100(3): 221-230.

**ARNOLD, R.; HUMBERT, H.; WERCHAU, H.; GALLATI, H.; KONIG, W.** 1994. Interleukin-8, interleukin-6 and soluble tumor necrosis factor receptor release from a human pulmonary epithelial cell line (A549) exposed to respiratory syncytial virus. *Immunology.* 82: 126-133.

**ARNOLD, R.; KÖNIG, B.; GALATTI, H.; WERCHAU, H.; KÖNIG, W.** 1995. Cytokine (IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ ) and soluble TNF receptor-I release from human peripheral blood mononuclear cells after respiratory syncytial virus infection. *Immunology.* 85: 364-372.

**AVENDAÑO, L.** 1997. Resfrío común, influenza y otras infecciones respiratorias víricas. *Meneghello J. Pediatría.* 5º ed. B. Aires: Ed. Med. Panamericana. Pág. 1264-1268.

**AVENDAÑO, L.; PALOMINO, M.; LARRAÑAGA, C.** 2003. Surveillance for respiratory syncytial virus in infants hospitalized for acute lower respiratory infection in Chile (1989 to 2003). *J. Clin. Microbiol.* 41(10):4879- 4882.

**AZIZ, N.; NISHANIAN, P.; MITSUYASU, R.; DETELS, R.; FAHEY, J.** 1999. Variables that affect assays for plasma cytokines and soluble activation markers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6(1): 89-95.

**BIENVENU, B.; MARTIN, B.; AUFRAY, C.; CORDIER, C.; BÉCOURT, C.; LUCAS, B.** 2005. Peripheral CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J. Immunol.* 175: 246-253.

**BONT, L.; HEIJNEN, C.; KAVELAARS, A.; VAN AALDEREN, W.; BRUS, F.; DRAAISMA, J.; GEELEN, S.; VAN VUGHT, H.; KIMPEN, J.** 1999. Peripheral blood cytokine responses and disease severity in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Eur. Respir. J.* 14: 144-149.

**CANE, P.** 2001. Molecular epidemiology of syncytial virus. *Rev. Med. Virol.* 11:103-116.

**CARBALLAL G.** 1998. Familia Paramixoviridae. En: Carballal G. y Oubiña J.: *Virología Médica*. Buenos Aires, Argentina, Ed. El Ateneo, 3ª ed.: 181-211.

**CHANG, J.; BRACIALE, T.** 2002. Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8+T-cell effector activity and peripheral CD8+ T cell memory in the respiratory tract. *Nat. Med.* 8(1): 54-60.

**CHERRIE A.; ANDERSON K.; WERTZ W.; OPENSHAW P.** 1992. Human cytotoxic T cells stimulated by antigen on dendritic cells recognize the N, SH, F, M, 22K and 1b proteins of respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 66:2102-2110.

**COLLINS P.; MCINTOSH K.; CHANOCK R.** 1996. Respiratory syncytial virus. En: *Fields Virology of Fields BN, Knipe D., Howley P. et al. Ed. Lippincott-Raveb Publishers, Philadelphia, EE.UU.* 3ª ed.: 1313-1345.

**CONCOM-GÓNGORA, P.; MUT-MARTÍN, M.; GRACÍA-MISS, M.** 2004. Los receptores de la inmunidad innata. *Rev. Biomed.* 15: 113-122.

**CONNORS, M.; KULKARNI, A.; FIRESTONE, C.; HOLMES, K.; MORSE, H.; SOTNIKOV, A.; MURPHY, B.** 1992. 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.* 66: 7444-7451.

**CONNON, M.; OPENSHAW, P.; ASKONAS, B.** 1988. Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *J. Exp. Med.* 168:1163-1168.

**COPENHAVER, C.; GERN, J.; LI, ZHANHAI.; SHULT, P.; ROSENTHAL, L.; MIKUS, L.; KIRK, C.; ROBERG, K.; ANDERSON, E.; TISLER, C.; DASILVA, D.; HIEMKE, H.; GENTILE, K.; GANGNON, R.; LEMANSKE, R.** 2004. Citokine response patterns, exposure to viruses, and respiratory infections in the first year of life. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170: 175-180.

**CORRIGAN, C.; HACZKU, A.; GEMOU-ENGESAETH, V.; DOI, S.; KIKUCHI, Y.; TAKATSU, K.; DURAM, S.; KAY, A.** 1993. CD4 T-lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of interleukin-5. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147(3): 540-547.

**DARVILLE T. AND YAMAUCHI T.** 1998. Respiratory syncytial virus. *Ped. In Rev.* 19, 2:55-61.

**DEVINCENZO, J.** 2004. Natural infection of infants with respiratory syncytial virus subgroups A and B: A study of frequency, disease severity , and viral load. *Pediatric Research.* 56(6):914-917.

**EMEL, H.; ZAFER, G.; MUZAFFER, M.; IRFAN, U.; ARZU, Y.** 2001. Inhaled fluticasone propionate downregulates peripheral blood T lymphocyte activation and naturel killer cells in asthma. *Turkish Resp. J.* 2(1): 8-12.

**FALSEY A. AND WALSH E.** 2000. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin. Microbiol. Rev.* 13(3): 371-384.

**FERNÁNDEZ, J. A.; TAPIA, L.; PALOMINOS, M.; LARRAÑAGA, C.; PEÑA, M.; JARAMILLO, H.** 2005. Plasma interferon-gamma, interleukin-10 and soluble markers of immune activation in infants with primary adenovirus and respiratory syncytial virus infection. *Eur. Cytokine. Netw.* 16(1): 35-40.

**FERREIRA, A; AFANI, A; LANZA, P; AGUILLÓN, J; SEPÚLVEDA, C.** 2005. *Inmunología Básica y Clínica.* Ed. Mediterráneo, Santiago-Buenos Aires. Pág. 3-220.

**GALIANO M.; PALOMO C.; VIDELA C.; RABIZA J.; MELERO J.; CARBALLAL G.** 2005. Genetic and antigenetic variability of human respiratory syncytial virus (groups A and B) isolated, over seven consecutive seasons in Argentina (1995-2001). *J. Clin. Microbiol.* 43(5): 2266-2273.

**GRAAFF, P.; JONG, E.; VAN CAPEL, T.; VAN DIJK, M.; ROHOLL, P.; BOES, J.; LUYTJES, W.; KIMPEN, J.; VAN BLEEK, G.** 2005. Respiratory syncytial virus infection of monocyte-derived dendritic cells decrease their capacity to activate CD4 T cells. *J. Immunol.* 175: 5904-5911.

**GRAHAM, B.; BUNTON, L.; WRIGHT, P.; KARZON, D.** 1991. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenger with respiratory syncytial virus in mice. *J. Clin. Invest.* 88: 1026-1033.

**GRUNIG, G.; WARNOCK, M.; WAKIL, E.; VENKAYYA, R.; BROMBACHER, F.; RENNICK, D.; SHEPPARD, D.; MOHRS, M.; DONALDSON, D.; LOCKSLEY, R.; CORRY, D.** 1998. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science.* 282: 2261-2263.

**HACKING, D.; KNIGHT, J.; ROCKETT, K.; BROWN, H.; FRAMPTON, J.; KWIATKOWSKI, D.; HULL, J.; UDALOVA, I.,** 2004. Increased in vivo transcription of an IL-8 haplotype associate with respiratory syncytial virus disease susceptibility. *Genes immun* 5:274-282.

**HALL CB.** 1997. Respiratory syncytial virus. En: Feigin R., Cherry J.: *Textbook of pediatric infectious diseases.* Philadelphia, WB Saunders Company, 19, 5<sup>a</sup> ed.:2084-2111.

**HALL CB.; WALSH E.; SCHNABEL K.; LONG C.E.; McCONNOCHIE K.M.; HILDRETH S.W.; ANDERSON L.** 1990. 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.* 162: 1283-1290.

**HARRISON, M.; BONVILLE, C.; ROSENBERG, H.; DOMACHOWSKIE, J.** 1999. Respiratory syncytial virus-induced chemokine expression in the lower airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 1918-1924.

**HOEBEE, B.; BONT, L.; RIETVELD, E.; VAN OOSTEN, M.; HODEMAEKERS, H.; NAGELKERKE, N.; NEIJENS, H.; KIMPEN, J.; KIMMAN, T.** 2004. Influence of promoter variants of interleukin-10, interleukin-9, and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  genes on respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J. Infect. Dis.* 189: 249-247.

**HORNSLETH A.; KLUG B.; NIR M.; JOHANSEN J.; HANSEN K.; CHRISTENSEN L.; LARSEN L.** 1998. Severity of respiratory syncytial virus disease related to type and genotype of virus and cytokine values in nasopharyngeal secretions. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17(12): 1114-1121.

**JOHNSON P.; SPROGGS M.; OLMSTED R.; COLLINS P.** 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:5625-5629.

**JOHNSON, T.; PARKER, R.; JOHNSON, J.; GRAHAM, B.** 2003. IL-13 is sufficient for respiratory syncytial virus G glycoprotein-induced eosinophilia after respiratory syncytial virus challenge. *J. Immunol.* 170: 2037-2045.

**KAWASAKI, Y.; HOSOYA, M.; KATAYOSE, M.; SUZUKI, H.** 2002. Correlation between serum interleukin 6 and C-reactive protein concentrations in patients with adenoviral respiratory infection. *Pediatric. Infect. Dis.* 21:370-374.

**KIKLY, K.; LIU, L.; NA, S.; SEDGWICK, J.** 2006. The IL-23/Th<sub>17</sub> axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 670-675.

**KIM, M.; GASPAL, F.; WIGGETT, H.; McCONNELL, F.; GULBRANSON-JUDGE, A.; RAYCUNDALIA, C.; WALKER, L.; GOODALL, M.; LANE, P.** 2003. CD4<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> accessory cells costimulate primed CD4 T cells through OX40 and CD30 at sites where T cells collaborate with B cells. *Immunity*. 2003;18:643–654.

**KRISTJANSSON, S.; BJARNARSON, S.; WENNERGREN, G.; PALSDOTTIR, A.; ARNADOTTIR, T.; HARALDSSON, A.; JONSDOTTIR, I.** 2005. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses during the first 3 months of life promote a local TH2-like response. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 116(4): 805-811.

**KRISHNAN, S.; CRAVEN, M.; WELLIVER.; AHMAD, N.; HALONEN, M.** 2003. Differences in participation of innate and adaptative immunity to respiratory Syncicial Virus in adults and neonates. *J. Infect. Dis.* 188:433-439.

**KUS, J.; TSE, K.; VEDAL, S.; CHAN-YEUNG, M.** 1985. Lymphocyte sub-populations in patients with allergic and non-allergic asthma. *Clin. Allergy.* 15: 523-529.

**LANE, P.; GASPAL, F.; KIM, M.** 2005. Two sides of a cellular coin: CD4<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> cells regulate memory responses and lymph-node organization. *Nat. Rev. Immunol.* 5(8): 655-660.

**LEGG, J.; HUSSAIN, I.; WARNER, J.; JOHNSTON, S.; WARNER, J.** 2003. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168(5): 633-639.

**LI, L.; XIA, Y.; NGUYEN, A; LAY, Y; FENG, L.; MOSMANN, T.; LO, D.** 1999. Effects of Th2 cytokine on chemokine expression in the luna: IL-13 potently induces eotaxin expresión by airway epithelial cells. *J. Immunol.* 162: 2477-2487.

**LOPEZ, J.; BUSTOS, R.; ORVELLI, C.; BERRIOS, M.; ARBIZA, J.; GARCÍA-BARRENO, B.; MELERO, J.** 1998. Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J. Virol.* 72(8):6922-6928.

**LÓPEZ, M.** 1999. CD94 [en línea] [http://mpr.nci.nih.gov/prow/guide/1682300452\\_g.htm](http://mpr.nci.nih.gov/prow/guide/1682300452_g.htm) [consulta 15-08-2007].

**LÓPEZ, M.; PEÑA, J.** 2006. Activación células NK [en línea] <http://www.inmunologiaonline.com/inmunologia/tema12/etexto12.htm#top> [consulta 20-07-2006].

**LUCHSINGER, V.** 2005. Caracterización molecular del virus respiratorio sincicial y de la respuesta immune humoral en los lactantes con infección de distinta gravedad clínica. Tesis Doctor en ciencias Biomédicas. Santiago, Chile. U. de Chile, Facultad de Medicina. 183 p.

**MALDONADO, A.; TORRES, C.; TARANILLA, A.; ZAMORA, A.; WITOWSKI, E.** 2001. Modificaciones Inmunológicas por virus respiratorio sincicial (VRS) en niños alérgicos. Arch. Alergia Inmunol. Clin. 32(3): 84-92.

**MASTRONARDE, J; HE, B.; MONICK, M.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; HUNNINGHAKE, G.** 1996. Induction on interleukin(IL)-8 gene expression by respiratory syncytial virus involves activation of nuclear factor(NF)-kappa B and NF-IL-6. J. Infect. Dis. 174: 262-267.

**MATSUDA, K.; TSUTSUMI, H.; OKAMOTO, Y.; CHIBA, C.** 1995. Development of interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor alpha activity in nasopharyngeal secretions of infants and children during infection with respiratory syncytial virus. Clin. Diagn. Lab. Inmuno. 2(3): 322-324.

**MEJÍAS, A.; CHÁVEZ, S.; RAMILO, O.** 2005. Respiratory syncytial virus pneumonia: mechanisms of inflammation and prolonged airway hyperresponsiveness. Curr. Opin. Infect. Dis. 18:199-204.

**MOORE, K.; de WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.; O´GARRA, A.** 2001. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. Annu. Rev. Immunol. 19: 683-765.

**MUKAIDA, N.** 2003. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. [Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.](#) 284(4):L566-577.

**OPENSHAW, P.** 2002. Potential therapeutic implications of new insights into respiratory syncytial virus disease. *Respir. Res.* 3(1):S15-S20.

**OPENSHAW, P.; TREGONING, J.** 2005. Immune response and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clin. Micro. Rev.* 18(3):541-555.

**PALOMINOS, M.; AVENDAÑO, L.** 2003. Infecciones respiratorias por VRS y adenovirus en Chile: que hemos aprendido en 14 años de vigilancia epidemiológica. *Rev. Pediatría.* 46:38-47.

**PALOMINOS, M.; LARENAS, J.; MORAGA, G.; AVENDAÑO, L.** 2004. Severidad clínica de la infección respiratoria aguda baja primaria por virus respiratorio sincicial grupos A y B. *Rev. Chil. Pediatr.* 75(1): 18-24.

**PARROTT, R.; KIM, H.; ARROBIO, J.; HODES, D.; MURPHY, B.; BRANDT, C.; CAMARGO, E.; CHANOCK, R.** 1973. 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.* 98: 289-300.

**PERET, T.; HALL, C.; HAMMOND, G.; PIEDRA, P.; STORCH, G.; SULLENDER, W.; TSOU, C.; ANDERSON, L.** 2000. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J. Infect. Dis.* 181: 1891-1896.

**PERET, T.; HALL, C.; SCHNABEL, K.; GOLUB, J.; ANDERSON, L.** 1998. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strain of human respiratory syncytial virus in a community. *J. Gen. Virol.* 79: 2221-2229.

**PINTO, R.; ARRENDONDO, S.; BONO, M.; GAGGERO, A.; DÍAZ, P.** 2006. T helper1/T helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection is associated with increased endogenous plasma cortisol. *Pediatrics.* 117: 878-886.

**POULTER, L.; NORRIS, A.; POWER, C.; CONDEZ, A.; SCHMEKEL, B.; BURKER, C.** 1992. T- cell dominated inflammatory reactions in the bronchi of asthmatics are not reflected in matched bronchoalveolar lavage specimens. *Eur. Respir. J.* 5: 182-189.

**PUCCIARELLI, M.** 2005. Citometría de flujo [en línea] <http://www.monografias.com/trabajos16/citometria-flujo/citometria-flujo.shtml> [Consulta 15-10-2006].

**RÄMET M.; HAATAJA R.; MARTTILA R.; FLOROS J.; HALLMAN M.** 2000. Association between the surfactant protein A (SP-A) gene locus and respiratory-distress síndrome in the finnish population. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 1569-1579.

**ROMÁN, M.; CALHOUN, W.; AVENDAÑO, L.; ESCOBAR, A.; DÍAZ, P.** 1997. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th2 like response. *Am. J. Resp. Crit. Care. Med.* 156(1):190-195.

**RUTIGLIANO, J.; GRAHAM, B.** 2004. Prolonged production of TNF- $\alpha$  exacerbates illness during respiratory syncytial virus infection. *J. Immunol.* 173: 3408-3417.

**SANCHEZ-GUERRERO, I.; HERRERO, N.; VERGARA, R.; CAMPOS, M.; GARCÍA, A.; ÁLVAREZ, M.** 1998. Diferente expresión de CD45RA y CD45RO por linfocitos T CD4+ en asma intrínseca y extrínseca. *Rev. Esp. Alergol. Inmunol. Clin.* 13(3): 160-166.

**SATO M.; SAITO R.; SAKAI T.; SANO Y.; NISHIKAWA M.; SASAKI A.; SHOBUGAWA Y.; GEJYO F.; SUZUKI H.** 2005. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *J. Clin. Microbiol.* 43(1): 36-40.

**SCHAUER, U.; JUNG, T.; HEYMANNS, J.; RIEGER, C.** 1991. Imbalance of CD4+CD45R+ and CD4+CD29+ T helper cell subsets in patients with atopic diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 83:25-29.

**SHEVACH, E.** 2000. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 18:423–449.

**SIMOES, E.** 1999. Respiratory syncytial virus infection. *Lancet.* 354: 847-852.

**SULLENDER, W.** 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenetic diversity. *Clin. Micro. Rev.* 13(1): 1-15.

**TRENTO, A.; GALIANO, M.; VIDELA, C.; CARBALLAL, G.; GARCÍA-BARRENO, B.; MELERO, J.; PALOMO, C.** 2003. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J. Gen. Virol.* 84: 3115-3120.

**TRIPP, R.; MOORE, D.; JONES L.; SULLENDER, W.; WINTER, J.; ANDERSON, L.** 1999. Respiratory syncytial Virus G and/or SH protein alters Th1 cytoquines, natural killer cells, and neutrophils respondig to pulmonary infection in BALB/c mice. *J. Virol.* 73:7099-7107.

**VENTER M.; MADHI S.; TIEMESSEN C.; SCHOUB B.** 2001. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa : identification of new subgroup A and B genotypes. *J. Gen. Virol.* 82: 2117-2124.

**WALKER; C.; VIRCHOW, J.; BRUIJNZEEL, P.; BLASER, K.** 1991. T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma. *J. Inmunol.* 146: 1829-1835.

**WALSH E.; McCONNCHIE K.; LONG C.; HALL CB.** 1997. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *J. Infect. Dis.* 175:814-820.

**WEAVER, C.; HARRINGTON, L.; MANGAN, P.; GAVRIELI, M.; MURPHY, K.** 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 24:677-688.

**WELLIVER, T.; GAROFALO, R.; HOSAKOTE, Y.; HINTZ, K.; AVENDANO, L.; SÁNCHEZ, K.; VELOZO, L.; JAFRI, H.; CÁVEZ-BUENO, S.; OGRA, P.; MCKINNEY, L.; REED, J.; WELLIVER, R.** 2007. Severe human lower respiratory tract illness caused by Respiratory Syncytial Virus and Influenza Virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses. *J. Infect. Dis.* 195: 1126-1136.

**WILLS-KARP, M.; LUYIMBAZI, J.; XU, X.; SCHOFIELD, T.; NEBEN, T.; KARP, C.; DONALDSON, D.** 1998. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science.* 282: 2258-2261.

**ZHENG, H.; STORCH, G.; ZANG, C.; PERET, T.; PARK, C.; ANDERSON, L.** 1999. Genetic variability in envelope-associated protein genes of closely related group A strain of respiratory syncytial virus. *Research* 59: 89-99.

