

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 468**

51 Int. Cl.:
C07K 14/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02710551 .9**
- 96 Fecha de presentación: **18.01.2002**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1351981**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.10.2003**

54 Título: **Un virus que provoca enfermedad de las vías respiratorias en mamíferos susceptibles**

30 Prioridad:

19.01.2001 EP 01200213
18.10.2001 EP 01203985

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

21.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

21.12.2012

73 Titular/es:

VIRONOVATIVE B.V. (100.0%)
BURGEMEESTER OUDLAAN 50
3062 PA ROTTERDAM, NL

72 Inventor/es:

DE JONG, JAN, CORNELIUS;
FOUCHIER, RONALDUS, ADRIANUS, MARIA;
VAN DEN HOOGEN, BERNADETTA, GERARDA;
OSTERHAUS, ALBERTUS, D. M. E. y
GROEN, JAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 393 468 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un virus que provoca enfermedad de las vías respiratorias en mamíferos susceptibles

La invención se refiere al campo de la virología.

Las pasadas décadas se han identificado⁷ varios agentes etiológicos de enfermedad de mamífero, en particular de enfermedades de las vías respiratorias (RTI), en particular de seres humanos. Los agentes etiológicos clásicos de RTI con mamíferos son los virus sincitiales respiratorios que pertenecen al género *Pneumovirus* encontrados con seres humanos (hRSV) y rumiantes tales como ganado vacuno u ovejas (bRSV y/u oRSV). En RSV humano se usan diferencias en ensayos de neutralización cruzada recíproca, la reactividad de las proteínas G en ensayos inmunológicos y las secuencias nucleotídicas del gen G para definir 2 subgrupos antigénicos de hRSV. Dentro de los subgrupos, las secuencias de aa muestran una identidad de 94% (subgrupo A) o de 98% (subgrupo B), mientras que sólo se encuentra entre los subgrupos un 53% de identidad de secuencias de aa. Se observa variabilidad adicional en los subgrupos basándose en anticuerpos monoclonales, ensayos de RT-PCR y ensayos de protección de ARNasa. Los virus de ambos subgrupos tienen una distribución mundial, y pueden aparecer durante una única estación. La infección se puede producir en presencia de inmunidad preexistente, y la variación antigénica no es requerida estrictamente para permitir la reinfección. Véanse, por ejemplo, Sullender, W.M., Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000. 13(1): p. 1-15; Collins, P.L., McIntosh, K. y Chanock, R.M., Respiratory syncytial virus. *Fields virology*, ed. B.N. Knipe, Howley, P.M. 1996, Philadelphia: lippencott-raven. 1313-1351; Johnson, P.R., et al., The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(16): p. 5625-9; Collins, P.L., The molecular Biology of Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) of the Genus *Pneumovirus*, in *The Paramyxoviruses*, D.W. Kingsbury, Editor. 1991, Plenum Press: Nueva York. p. 103-153.

Otro *Pneumovirus* clásico es el virus de la neumonía de ratones (PVM), en general sólo encontrado con ratones de laboratorio. Sin embargo, una proporción de las enfermedades observadas en mamíferos todavía no se puede atribuir a patógenos conocidos.

La invención proporciona un virus de ARN monocatenario de sentido negativo esencialmente de mamífero aislado (MPV) que pertenece a la subfamilia *Pneumovirinae* de la familia *Paramyxoviridae* e identificable como correspondiente filogenéticamente al género *Metapneumovirus*. Dicho virus es identificable como correspondiente filogenéticamente al género *Metapneumovirus* determinando una secuencia de ácido nucleico de dicho virus y ensayándola en análisis filogenéticos, por ejemplo en los que árboles de verosimilitud máxima se generan usando 100 *bootstraps* y 3 salteados, y encontrando que corresponde filogenéticamente de forma más próxima a un aislado de virus depositado como I-2614 con CNCM, París, que es correspondiente a un aislado de virus esencialmente aviar de pneumovirus aviar (APV) también conocido como virus de rinotraqueítis del pavo (TRTV), el agente etiológico de rinotraqueítis aviar. Para dichos análisis filogenéticos, es muy útil obtener la secuencia de ácido nucleico de un no MPV como grupo externo con el cual hacer comparaciones, y se puede obtener un aislado de grupo externo muy útil a partir del serotipo C del pneumovirus aviar (APV-C), como se demuestra por ejemplo en la figura 5 aquí.

Aunque los análisis filogenéticos proporcionan un método conveniente para identificar un virus como un MPV, también se proporcionan aquí varios otros métodos posiblemente más directos aunque en cierto modo de más recorrido para identificar dichos virus o proteínas víricas o ácidos nucleicos procedentes de dichos virus. Como regla de oro, un MPV se puede identificar mediante los porcentajes de una homología del virus, proteínas o ácidos nucleicos a identificar en comparación con aislados, proteínas víricas, o ácidos nucleicos identificados aquí mediante secuencia o depósito. Generalmente se sabe que las especies víricas, especialmente las especies de virus de ARN, constituyen a menudo una cuasi especie en la que un racimo de dichos virus presenta heterogeneidad entre sus miembros. De este modo, se espera que cada aislado pueda tener una relación en porcentaje en cierto modo diferente con uno de los diversos aislados como se proporciona aquí.

Cuando se desea comparar con el virus depositado I-2614, la invención proporciona un virus de ARN monocatenario de sentido negativo esencialmente de mamífero aislado (MPV) que pertenece a la subfamilia *Pneumovirinae* de la familia *Paramyxoviridae* e identificable como correspondiente filogenéticamente al género *Metapneumovirus* determinando una secuencia de aminoácidos de dicho virus y determinando que dicha secuencia de aminoácidos tiene un porcentaje de homología de aminoácidos con un aislado vírico depositado como I-2614 con CNCM, París, que es esencialmente mayor que los porcentajes proporcionados aquí para la proteína L, la proteína M, la proteína N, la proteína P, o la proteína F, en comparación con APV-C, o, igualmente, se proporciona un virus de ARN monocatenario de sentido negativo esencialmente de mamífero aislado (MPV) que pertenece a la subfamilia *Pneumovirinae* de la familia *Paramyxoviridae* como identificable como correspondiente filogenéticamente al género *Metapneumovirus* determinando una secuencia de ácido nucleico de dicho virus y determinando que dicha secuencia de ácido nucleico tiene un porcentaje de identidad de ácidos nucleicos con un aislado vírico depositado como I-2614 con CNCM, París, que es esencialmente mayor que los porcentajes identificados aquí para los ácidos nucleicos que codifican la proteína L, la proteína M, la proteína N, la proteína P, o la proteína F, como se identifica aquí más abajo en comparación con APV-C.

Nuevamente como regla de oro, se puede considerar un MPV como perteneciente a uno de los dos grupos serológicos de MPV como se identifica aquí cuando los aislados o las proteínas víricas o ácidos nucleicos de los aislados que necesitan ser identificados tienen porcentajes de homología que caen dentro de los límites y cumplen los porcentajes de homología identificados aquí para ambos grupos separados, tomando los aislados 00-1 ó 99-1 como los aislados de comparación respectivos. Sin embargo, cuando los porcentajes de homología son más pequeños o existe una mayor necesidad de distinguir los aislados víricos de por ejemplo APV-C, es mejor recurrir a los análisis filogenéticos como se identifican aquí.

Nuevamente se debería tener en cuenta que dichos porcentajes pueden variar en cierto modo cuando se seleccionan otros aislados en la determinación del porcentaje de homología.

Con la provisión de este MPV, la invención proporciona medios y métodos de diagnóstico y medios y métodos terapéuticos para ser empleados en el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedad, en particular de enfermedad respiratoria, en particular de mamíferos, más en particular en seres humanos. Sin embargo, debido a la relación genética, aunque distante, del MPV esencialmente de mamífero con el APV esencialmente aviar, en particular APV-C, la invención también proporciona medios y métodos para ser empleados en el diagnóstico y tratamiento de enfermedad aviar. En virología, es muy aconsejable que el diagnóstico y/o tratamiento de una infección vírica específica se lleve a cabo con reactivos que son muy específicos para dicho virus específico que provoca dicha infección. En este caso, esto significa que se prefiere que dicho diagnóstico y/o tratamiento de una infección por MPV se lleve a cabo con reactivos que son muy específicos para MPV. Sin embargo, esto no excluye de ningún modo la posibilidad de que en su lugar se usen reactivos menos específicos pero suficientemente de reacción cruzada, por ejemplo debido a que están más fácilmente disponibles y resuelven suficientemente la tarea a mano. Por ejemplo, se proporciona aquí la realización de diagnósticos virológicos y/o serológicos de infecciones por MPV en mamíferos con reactivos derivados de APV, en particular con reactivos derivados de APV-C, y en la descripción detallada aquí se muestra, por ejemplo, que se puede lograr un diagnóstico serológico suficientemente fiable de las infecciones por MPV en mamíferos usando un ELISA diseñado específicamente para detectar anticuerpos anti-APV en pájaros. Un ensayo útil particular para este fin es un ensayo de ELISA diseñado para la detección de anticuerpos anti-APV (por ejemplo en suero o en yema de huevo), cuya versión comercialmente disponible es conocida como APV-Ab SVANOVIR® que se fabrica por SVANOVA Biotech AB, Uppsal Science Park Glunten SE-751 83 Uppsala Suecia. También se da el caso de la situación contraria, y aquí se proporciona por ejemplo la realización de diagnóstico virológico y/o serológico de infecciones por APV en mamíferos con reactivos derivados de MPV; en la descripción detallada aquí se muestra, por ejemplo, que se pueden lograr diagnósticos serológicos suficientemente fiables de infecciones por APV en pájaros usando un ELISA diseñado para detectar anticuerpos anti-MPV. Considerando que estos antígenos y anticuerpos tienen una relación de cerradura y llave, la detección de los diversos antígenos se puede lograr seleccionando el anticuerpo apropiado que tiene suficiente reactividad cruzada. Por supuesto, para confiar en tal reactividad cruzada, es mejor seleccionar los reactivos (tales como antígenos o anticuerpos) bajo la guía de las homologías de aminoácidos que existen entre las diversas (gluco)proteínas de los diversos virus, con lo que los reactivos relacionados con las proteínas más homólogas serán los más útiles para ser usados en ensayos que se basan en dicha reactividad cruzada.

Para la detección de ácidos nucleicos, es incluso más directo, en lugar de diseñar cebadores o sondas basados en secuencias de ácidos nucleicos heterólogas de diversos virus, y de este modo que detectan diferencias entre los *Metapneumoviruses*, esencialmente de mamíferos o aviares, es suficiente diseñar o seleccionar cebadores o sondas basados en aquellos tramos de secuencias de ácidos nucleicos específicas de virus que muestran una homología elevada. En general, para las secuencias de ácidos nucleicos, los porcentajes de homología de 90% o superiores garantizan una reactividad cruzada suficiente para que se confíe en ensayos de diagnóstico que utilizan condiciones de hibridación restrictivas.

Por ejemplo, la invención proporciona un método para diagnosticar de forma virológica una infección por MPV de un animal, en particular de un mamífero, más en particular de un ser humano, que comprende determinar en una muestra de dicho animal la presencia de un aislado vírico o componente del mismo haciendo reaccionar dicha muestra con un ácido nucleico específico de MPV o un anticuerpo según la invención, y un método para diagnosticar de forma serológica una infección por MPV de un mamífero que comprende determinar en una muestra de dicho mamífero la presencia de un anticuerpo específicamente dirigido contra un MPV o componente del mismo haciendo reaccionar dicha muestra con una molécula proteínica o fragmento de la misma específico de MPV, o un antígeno según la invención. La invención también proporciona un kit de diagnóstico para diagnosticar una infección por MPV, que comprende un MPV, un ácido nucleico, molécula proteínica o fragmento de los mismos específico de MPV, antígeno y/o un anticuerpo según la invención, y preferiblemente un medio para detectar dicho MPV, ácido nucleico, molécula proteínica o fragmento de los mismos específico de MPV, antígeno y/o un anticuerpo, comprendiendo dicho medio por ejemplo un grupo excitante tal como un fluoróforo o sistema de detección enzimático usado en la técnica (los ejemplos de un formato de kit de diagnóstico adecuado comprende IF, ELISA, ensayo de neutralización, ensayo de RT-PCR). Para determinar si un componente vírico todavía no identificado o análogo sintético del mismo tal como un ácido nucleico, molécula proteínica o fragmento del mismo se puede identificar como específico de MPV, es suficiente analizar la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de dicho componente, por ejemplo para un tramo de dicho ácido nucleico o aminoácido, preferiblemente de al menos 10, más preferiblemente al menos 25, más preferiblemente al menos 40 nucleótidos o aminoácidos (respectivamente), mediante comparación de homología de secuencias con secuencias conocidas de MPV y con secuencias conocidas no de MPV

(preferiblemente se usa APV-C) usando, por ejemplo, los análisis filogenéticos como se proporcionan aquí. Dependiendo del grado de relación con dichas secuencias de MPV o de no MPV, se puede identificar el componente o análogo sintético.

5 La invención también proporciona un método para diagnosticar virológicamente una infección por MPV de un mamífero, que comprende determinar en una muestra de dicho mamífero la presencia de un aislado vírico o componente del mismo haciendo reaccionar dicha muestra con un ácido nucleico reactivo de forma cruzada derivado de APV (preferiblemente serotipo C) o un anticuerpo reactivo de forma cruzada que reacciona con dicho APV, y un método para diagnosticar de forma serológica una infección por MPV de un mamífero que comprende
10 determinar en una muestra de dicho mamífero la presencia de un anticuerpo reactivo de forma cruzada que también se dirige contra un APV o componente del mismo haciendo reaccionar dicha muestra con una molécula proteínica o fragmento de la misma o un antígeno derivado de APV. Además, la invención proporciona el uso de un kit de diagnóstico diseñado inicialmente para la detección de AVP o de un anticuerpo anti-AVP para diagnosticar una infección por MPV, en particular para detectar dicha infección por MPV en seres humanos.

15 La invención también proporciona un método para diagnosticar de forma virológica una infección por APV en un pájaro, que comprende determinar en una muestra de dicho pájaro la presencia de un aislado vírico o componente del mismo haciendo reaccionar dicha muestra con un ácido nucleico reactivo de forma cruzada derivado de MPV, o un anticuerpo reactivo de forma cruzada que reacciona con dicho MPV, y un método para diagnosticar de forma serológica una infección por APV de un pájaro, que comprende determinar en una muestra de dicho pájaro la presencia de un anticuerpo reactivo en forma cruzada que también se dirige contra un MPV o componente del
20 mismo, haciendo reaccionar dicha muestra con una molécula proteínica o fragmento de la misma o un antígeno derivado de MPV. Además, la invención proporciona el uso de un kit de diagnóstico diseñado inicialmente para la detección de MPV o de un anticuerpo anti-MPV para diagnosticar una infección por APV, en particular para detectar dicha infección por APV en aves de corral tales como pollo, pato o pavo.

25 Como se afirmó, con tratamiento, se puede hacer uso similar de la reactividad cruzada encontrada, en particular cuando las circunstancias inmediatas hacen menos directo el uso del enfoque más homólogo. Las vacunaciones que no pueden esperar, tales como las vacunaciones de emergencia contra infecciones por MPV, se pueden llevar a cabo, por ejemplo, con preparaciones de vacuna derivadas de aislados de APV (preferiblemente tipo C) cuando no hay una vacuna de MPV más homóloga, y, viceversa, se pueden contemplar vacunaciones contra infecciones por APV con preparaciones de vacuna derivadas de MPV. También, las técnicas genéticas inversas hacen posible
30 generar constructos víricos quiméricos de APV-MPV que son útiles como una vacuna, siendo suficientemente distintos para presentar aislados de cada una de las cepas respectivas para atenuarlas hasta un nivel deseable. Técnicas genéticas inversas similares harán posible también generar constructos quiméricos de paramixovirus-metapneumovirus, tales como constructos de RSV-MPV o PI3-MPV, en una preparación de vacuna. Tales constructos son particularmente útiles como una vacuna de combinación para combatir enfermedades de las vías respiratorias.

35 De este modo, la invención proporciona un nuevo agente etiológico, un virus de ARN monocatenario de sentido negativo esencialmente de mamífero aislado (también denominado aquí MPV) que pertenece a la subfamilia *Pneumovirinae* de la familia *Paramyxoviridae* pero no identificable como un pneumovirus clásico, y que pertenece al género *Metapneumovirus*, y componentes o análogos sintéticos de los mismos específicos de MPV. Los virus de mamíferos que se asemejan a metapneumovirus, es decir metapneumovirus aislables de mamíferos que funcionan esencialmente como hospedante natural para dicho virus o provocan enfermedad en dichos mamíferos, no se han encontrado hasta ahora. Los metapneumovirus, que se pensaba en general que estaban esencialmente restringidos a aves de corral como hospedante natural o agente etiológico de la enfermedad, también son conocidos como pneumovirus aviares. Recientemente, se describió un aislado de APV de pato (documento (FR 2801607), que demuestra además que las infecciones por APV están esencialmente restringidas a pájaros como hospedantes naturales.

40 La invención proporciona un pneumovirus de mamífero aislado (también denominado aquí MPV), que comprende un orden génico y secuencia de aminoácidos distintos de los del género *Pneumovirus* y que está relacionado estrechamente y, considerando su relación filogenética, pertenece probablemente al género *Metapneumovirus* en la subfamilia *Pneumovirinae* de la familia *Paramyxoviridae*. Aunque hasta ahora sólo se han aislado metapneumovirus de pájaros, ahora se muestra que se pueden identificar virus relacionados, aunque materialmente distintos, en otras especies de animales tales como mamíferos. Se muestra aquí el aislamiento repetido de MPV de seres humanos, mientras que no existen tales informes para APV. Además, a diferencia de APV, MPV no se replica esencialmente o sólo se replica poco en pollos y pavos, mientras que lo hace fácilmente en macacos cinomolgos. No se han
55 encontrado informes sobre la replicación de APV en mamíferos. Además, mientras que los antisueros específicos provocados contra MPV neutralizan MPV, los antisueros provocados contra APV A, B o C no neutralizan MPV en el mismo grado, y esta falta de reactividad cruzada completa proporciona otra prueba de que MPV es un metapneumovirus diferente. Además, aunque APV y MPV comparten un orden génico similar, las proteínas G y SH de MPV son muy diferentes de las conocidas de APV, por cuanto que no muestran homologías de secuencias significativas tanto a nivel de ácidos nucleicos como a nivel de aminoácidos. Se pueden desarrollar ventajosamente ensayos de diagnóstico para discriminar entre aislados de APV y de MPV o anticuerpos dirigidos contra estos virus diferentes, basándose en una o ambas de estas proteínas (los ejemplos son IF, ELISA, ensayo de neutralización,
60

ensayo de RT-PCR). Sin embargo, también se puede usar la información de secuencia y/o antigénica obtenida de las proteínas N, P, M, F y L más relacionadas de MPV y los análisis de homologías de secuencia con las proteínas respectivas de APV, para discriminar entre APV y MPV. Por ejemplo, los análisis filogenéticos de la información de secuencia obtenida a partir de MPV reveló que MPV y APV son dos virus diferentes. En particular, los árboles filogenéticos muestran que APV y MPV son dos estirpes diferentes de virus. También se muestra que MPV circula en la población humana durante al menos 50 años, y probablemente ha tenido lugar la transmisión entre especies hace al menos 50 años y no es un suceso de cada día. Puesto que MPV CPE fue virtualmente indistinguible del provocado por hRSV o hPIV-1 en tMK u otros cultivos celulares, el MPV puede haber pasado bastante inadvertido hasta ahora. Preferiblemente se usan tMK (células de riñón de mono terciarias, es decir, células MK en una tercera pasada en el cultivo celular) debido a sus menores costes en comparación con cultivos primarios o secundarios. El CPE se caracteriza, así como con algunos de los *Paramyxoviridae* clásicos, por la formación de sincitio, después de lo cual las células mostraron una interrupción interna rápida, seguido de la falta de adhesión de las células de la monocapa. Las células presentaron habitualmente (pero no siempre) CPE después de tres pasadas de virus a partir de material original, en el día 10 a 14 después de la inoculación, en cierto grado más tarde que el CPE provocado por otros virus, tales como hRSV o hPIV-1.

Clásicamente, como agentes de enfermedad devastadores, los paramixovirus dan cuenta de muchas muertes de animales y seres humanos a nivel mundial cada año. Los *Paramyxoviridae* forman una familia dentro del orden de *Mononegavirales* (virus de ARN monocatenarios de sentido negativo), que consisten en las subfamilias *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*. Esta última subfamilia está dividida taxonómicamente en el presente en los géneros *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*¹. El virus sincitial respiratorio humano (hRSV), la especie tipo del género *Pneumovirus*, es la única causa más importante de infecciones del aparato respiratorio inferior durante la infancia y la niñez a nivel mundial². Otros miembros del género *Pneumovirus* incluyen los virus sincitiales respiratorios bovino y ovino, y el virus de la neumonía de ratones (PVM).

El pneumovirus aviar (APV) también conocido como virus de rinotraqueítis del pavo (TRTV), el agente etiológico de la rinotraqueítis aviar, una infección del aparato respiratorio superior de los pavos³, es el único miembro del género *Metapneumovirus* recientemente asignado, que, como se afirmó, hasta ahora no estaba asociado con infecciones, o lo que es más, con enfermedad de mamíferos. Los subgrupos serológicos de APV se pueden diferenciar basándose en las secuencias nucleotídicas o de aminoácidos de la glucoproteína G y ensayos de neutralización que usan anticuerpos monoclonales que también reconocen la glucoproteína G. Dentro de los subgrupos A, B y D, la proteína G muestra una identidad de secuencia de aminoácidos del 98,5 a 99,7% dentro de subgrupos, mientras que entre los subgrupos, sólo se observa una identidad de aminoácidos de 31,2-38%. Véanse, por ejemplo, Collins, M.S., Gough, R.E. y Alexander, D.J., Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 1993. 22: p. 469-479.; Cook, J.K.A., Jones, B.V., Ellis, M.M., Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 1993. 22: p. 257-273; Bayon-Auboyer, M.H., et al., Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J Gen Virol*, 2000. 81(Pt 11): p. 2723-33; Seal, B.S., Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. *Virus Res*, 1998. 58(1-2): p. 45-52; Bayon-Auboyer, M.H., et al., Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Arch Virol*, 1999. 144(6): p. 1091-109; Juhasz, K. y A.J. Easton, Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J Gen Virol*, 1994. 75(Pt 11): p. 2873-80.

Un serotipo adicional de APV se proporciona en el documento WO 00/20600, que describe el aislado de Colorado de APV, y lo compara con cepas conocidas de APV o TRT con ensayos de neutralización de suero in vitro. En primer lugar, el aislado de Colorado se ensayó frente a antisueros policlonales mono-específicos contra aislados de TRT reconocidos. El aislado de Colorado no se neutralizó por antisueros mono-específicos contra ninguna de las cepas de TRT. Sin embargo, se neutralizó mediante un antisuero hiperinmune producido contra la cepa del subgrupo A. Este antisuero neutralizó el virus homólogo hasta un título de 1:400, y el aislado de Colorado hasta un título de 1:80. Usando el método anterior, el aislado de Colorado se ensayó entonces frente a anticuerpos monoclonales anti-TRT. En cada caso, el título de neutralización recíproca fue < 10. El antisuero mono-específico provocado contra el aislado de Colorado se ensayó también contra cepas de TRT de ambos subgrupos. Ninguna de las cepas de TRT ensayadas fue neutralizada por el antisuero contra el aislado de Colorado.

La cepa de colorado de APV no protege a los pollitos SPF frente a la exposición con una cepa del subgrupo A o una cepa del subgrupo B del virus de TRT. Estos resultados sugieren que el aislado de Colorado puede ser el primer ejemplo de un serotipo adicional de pneumovirus aviar, como también lo sugieren Bayon-Auboyer et al (*J. Gen. Vir.* 81:2723-2733 (2000)).

En una realización preferida, la invención proporciona un MPV aislado que corresponde taxonómicamente a un metapneumovirus (mamífero desconocido a tal efecto) que comprende un orden génico distinto del de los pneumovirus en la subfamilia *Pneumovirinae* de la familia *Paramyxoviridae*. La clasificación de los dos géneros se basa principalmente en su constelación génica; los metapneumovirus carecen generalmente de proteínas no estructurales tales como NS1 o NS2 (véase también Randhawa et al., *J. Vir.* 71:9849-9854 (1997), y el orden génico es diferente del de los pneumovirus (RSV: '3-NS1-NS2-N-PM-SH-G-F-M2-L-5', APV: '3-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5')^{4,5,6}.

El MPV como se proporciona mediante la invención, o un aislado vírico que corresponde taxonómicamente con él, es revelado, con el análisis de EM, mediante partículas similares a paramixovirus. Consistente con la clasificación, el MPV o los aislados víricos que corresponden filogenéticamente o que corresponden taxonómicamente con él son sensibles al tratamiento con cloroformo; se cultivan óptimamente sobre células tMK o células funcionalmente equivalentes a ellas, y dependen esencialmente de tripsina en la mayoría de los cultivos celulares. Además, el CPE típico y la falta de actividad hemoaglutinante con las células de glóbulos rojos muy usadas clásicamente sugieren que un virus como se proporciona aquí está relacionado, aunque sólo de forma distante, con pneumovirus clásicos tales como RSV. Aunque la mayoría de los paramixovirus tienen actividad hemoaglutinante, la mayoría de los pneumovirus no la tienen¹³. Un MPV según la invención también contiene un segundo ORF solapante (M2-2) en el fragmento de ácido nucleico que codifica la proteína M2, como en general la mayoría de los otros pneumovirus, tal como, por ejemplo, también se demuestra en Ahmadian et al., J. Gen. Vir. 80:2011-2016 (1999).

Para encontrar otros aislados víricos como se proporcionan mediante la invención, es suficiente ensayar una muestra, obtenida opcionalmente a partir de un animal o ser humano enfermo, en busca de la presencia de un virus de la subfamilia *Pneumovirinae*, y ensayar un virus así obtenido en busca de la presencia de genes que codifican NS1 o NS2 (funcionales) o demuestran esencialmente un orden génico que es diferente del de los pneumovirus, tales como RSV, como ya se expuso anteriormente. Además, un aislado vírico que corresponde filogenéticamente y que corresponde de este modo taxonómicamente a MPV se puede encontrar mediante experimentos de hibridación cruzada usando ácido nucleico a partir de un aislado de MPV proporcionado aquí, o en experimentos clásicos de serología cruzada usando anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra y/o antígenos y/o inmunógenos derivados específicamente de un aislado de MPV.

Los virus recientemente aislados corresponden filogenéticamente a, y corresponden de este modo taxonómicamente a, MPV cuando comprenden un orden génico y/o una secuencia de aminoácidos suficientemente similar a nuestro aislado o aislados de MPV prototípicos, o corresponden estructuralmente con aquellos, y muestran una relación estrecha con el género *Metapneumovirus* dentro de la subfamilia *Pneumovirinae*. La mayor homología de secuencias de aminoácidos, y que define la correspondencia estructural a nivel de las proteínas individuales, entre MPV y cualquiera de los otros virus conocidos de la misma familia hasta la fecha (APV subtipo C) es para la matriz 87%, para nucleoproteína 88%, para fosfoproteína 68%, para proteína de fusión 81%, y para partes de la proteína de polimerasa 56-64%, como se puede deducir cuando se comparan las secuencias dadas en la figura 6 con las secuencias de otros virus, en particular de APV-C. Las proteínas individuales o los aislados víricos completos con, respectivamente, mayor homología con estos valores máximos mencionados son considerados filogenéticamente correspondientes y de este modo taxonómicamente correspondientes a MPV, y comprenden una secuencia de ácido nucleico que corresponde estructuralmente a una secuencia como se muestra en la figura 6. Aquí, la invención proporciona un virus filogenéticamente que corresponde al virus depositado.

Se debería observar que, al igual que otros virus, se encuentra cierto grado de variación entre diferentes aislados de virus de ARN monocatenario de sentido negativo esencialmente de mamífero aislado, como se proporciona aquí. En árboles filogenéticos, se han identificado al menos 2 grupos genéticos de aislados víricos basándose en análisis de secuencia comparativos de partes de los genes L, M, N y F. Basándose en diferencias nucleotídicas y de aminoácidos en las secuencias víricas de aminoácidos o de ácidos nucleicos (las secuencias víricas), y en analogía con otros pneumovirus tales como RSV, estos genotipos de MPV representan subtipos de MPV. Dentro de cada uno de los agrupamientos genéticos de aislados de MPV, se encontró que el porcentaje de identidad a nivel nucleotídico es 94-100 para L, 91-100 para M, 90-100 para N y 93-100 para F y, a nivel de aminoácidos, se encontró que el porcentaje de identidad es 91-100 para L, 98-100 para M, 96-100 para N y 98-100 para F. En las figuras 18 a 28 se puede encontrar una comparación adicional. El porcentaje de identidad mínimo a nivel nucleotídico para todo el grupo de virus de ARN monocatenario de sentido negativo esencialmente de mamífero aislado como se proporciona aquí (aislados de MPV) identificado hasta ahora fue 81 para L y M, 83 para N y 82 para F. A nivel de aminoácidos, este porcentaje fue 91 para L y N, 94 para M, y 95 para F. La secuencia vírica de un aislado de MPV o un gen F de MPV aislado, como se proporciona aquí, muestra por ejemplo menos de 81% de identidad de secuencia nucleotídica, o menos de 82% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia nucleotídica o de aminoácidos respectiva de un gen de fusión de APV-C (F) como se proporciona, por ejemplo, por Seal et al., Vir. Res. 66:139147 (2000).

También, la secuencia vírica de un aislado de MPV o un gen L de MPV aislado como se proporciona aquí, por ejemplo, muestra menos de 61% de identidad de secuencia nucleotídica, o menos de 63% de identidad de secuencia de aminoácidos, con la secuencia nucleotídica o de aminoácidos respectiva de un gen de APV-A polimerasa como se proporciona, por ejemplo, por Randhawa et al., J. Gen. Vir. 77:3047-3051 (1996).

La divergencia de secuencias de las cepas de MPV alrededor del mundo puede ser en cierto modo mayor, en analogía con otros virus. En consecuencia, se identifican dos agrupamientos genéticos potenciales mediante análisis de las secuencias nucleotídicas parciales en los ORFs de N, M, F y L de 9 aislados víricos. Se observó un 90-100% de identidad nucleotídica dentro de un agrupamiento, y se observó una identidad de 81-88% entre los agrupamientos. La información de secuencia obtenida en más aislados víricos confirmó la existencia de dos genotipos. El aislado vírico ned/00/01 como prototipo del agrupamiento A, y el aislado vírico ned/99/01 como prototipo del agrupamiento B, se han usado en ensayo de neutralización cruzada para ensayar si los genotipos están relacionados con diferentes serotipos o subgrupos. A partir de estos datos, se concluye que los aislados

víricos esencialmente de mamífero que presentan un porcentaje de homología de aminoácidos mayor que 64 para L, 87 para M, 88 para N, 68 para P, 81 para F, 84 para M2-1 ó 58 para M2-2 para el aislado I-2614 se pueden clasificar como un virus de ARN monocatenario de sentido negativo esencialmente de mamífero aislado como se proporciona aquí. En particular, aquellos aislados víricos que tienen en general un porcentaje de identidad mínimo a nivel de la secuencia nucleotídica con un aislado de MPV prototipo como se proporciona aquí de 81 para L y M, 83 para N y/o 82 para F son miembros del grupo de aislados de MPV como se proporciona aquí. A nivel de aminoácidos, este porcentaje es 91 para L y N, 94 para M, y/o 95 para F. Cuando el porcentaje de homología de secuencia de aminoácidos para un aislado vírico dado es mayor que 90 para L y N, 93 para M, o 94 para F, el aislado vírico es similar al grupo de aislados de MPV presentados en la figura 5. Cuando el porcentaje de homología de secuencia de aminoácidos para un aislado vírico dado es mayor que 94 para L, 95 para N o 97 para M y F, el aislado vírico puede identificarse como perteneciente a uno de los agrupamientos genotípicos representados en la figura 5. Se debería señalar que estos porcentajes de homología, mediante los cuales se definen los agrupamientos genéticos, son similares al grado de homología encontrado entre agrupamientos genéticos en los genes correspondientes de RSV.

De forma breve, la invención proporciona un virus de ARN monocatenario de sentido negativo esencialmente de mamífero aislado (MPV) que pertenece a la subfamilia *Pneumovirinae* de la familia *Paramyxoviridae* e identificable como correspondiente filogenéticamente al género *Metapneumovirus* determinando una secuencia de ácido nucleico de un fragmento adecuado del genoma de dicho virus y ensayándolo en análisis de árboles filogenéticos en los que se generan árboles de verosimilitud máxima usando 100 *bootstraps* y 3 salteados, y encontrando que corresponde filogenéticamente de forma más próxima a un aislado vírico depositado como I-2614 con CNCM, París, que el que corresponde a un aislado vírico de pneumovirus aviar (APV) también conocido como virus de rinotraqueítis del pavo (TRTV), el agente etiológico de la rinotraqueítis aviar.

Los fragmentos genómicos de ácido nucleico adecuados, útiles cada uno para tales análisis de árboles filogenéticos, son, por ejemplo, cualquiera de los fragmentos de RAP-PCR 1 a 10 como se describen aquí en la descripción detallada, que conducen a los diversos análisis de árboles filogenéticos como se describen aquí en las figuras 4 ó 5. Los análisis de árboles filogenéticos de los genes de nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M) y proteína de fusión (F) de MPV revelaron el grado más elevado de homología de secuencia con APV serotipo C, el pneumovirus aviar encontrado principalmente en los pájaros en los Estados Unidos de América.

En una realización preferida, la invención proporciona un virus de ARN monocatenario de sentido negativo esencialmente de mamífero aislado (MPV) que pertenece a la subfamilia *Pneumovirinae* de la familia *Paramyxoviridae* e identificable como correspondiente filogenéticamente al género *Metapneumovirus* determinando una secuencia de ácido nucleico de un fragmento adecuado del genoma de dicho virus y ensayándola en análisis de árboles filogenéticos en los que se generan árboles de verosimilitud máxima usando 100 *bootstraps* y 3 salteados, y encontrando que corresponde filogenéticamente de forma más próxima a un aislado vírico depositado como I-2614 con CNCM, París, que el que corresponde a un aislado vírico de pneumovirus aviar (APV), también conocido como virus de rinotraqueítis del pavo (TRTV), el agente etiológico de la rinotraqueítis aviar, en el que dicho fragmento comprende un marco de lectura abierto que codifica una proteína vírica de dicho virus.

Un marco de lectura abierto (ORF) adecuado comprende el ORF que codifica la proteína N. Cuando se encuentra una identidad de aminoácidos global de al menos 91%, preferiblemente de al menos 95% de la proteína N analizada con la proteína N del aislado I-2614, el aislado vírico analizado comprende un aislado de MPV preferido según la invención. Como se muestra, el primer gen en el mapa genómico de MPV codifica una proteína de 394 aminoácidos (aa), y muestra una amplia homología con la proteína N de otros pneumovirus. La longitud del ORF de N es idéntica a la longitud del ORF de N de APV-C (Tabla 5), y es más pequeña que aquella de otros paramixovirus (Barr et al., 1991). El análisis de la secuencia de aminoácidos reveló la homología más elevada con APV-C (88%), y sólo 7-11% con otros paramixovirus (Tabla 6).

Barr et al (1991) identificaron 3 regiones de similitud entre virus que pertenecen al orden *Mononegavirales*: A, B y C (Figura 8). Aunque las similitudes son las más elevadas dentro de la familia vírica, estas regiones están muy conservadas entre familias víricas. En las tres regiones, MPV reveló una identidad de secuencia de aa de 97% con APV-C, 89% con APV-B, 92 con APV-A, y 66-73% con RSV y PVM. La región entre los restos de aa 160 y 340 parece que está muy conservada entre los metapneumovirus y en cierto modo en menor grado los *Pneumovirinae* (Miyahara et al., 1992; Li et al., 1996; Barr et al., 1991). Esto está de acuerdo con que MPV sea un metapneumovirus, mostrando esta región particular una similitud de 99% con APV C.

Otro marco de lectura abierto (ORF) adecuado, útil en análisis filogenéticos, comprende el ORF que codifica la proteína P. Cuando se encuentra una identidad de aminoácidos global de al menos 70%, preferiblemente de al menos 85% de la proteína P analizada con la proteína P del aislado I-2614, el aislado vírico analizado comprende un aislado de MPV preferido según la invención. El segundo ORF en el mapa genómico codifica una proteína de 294 aa, que comparte una homología de secuencia de aa de 68% con la proteína P de APV-C, y sólo 22-26% con la proteína P de RSV (Tabla 6). El gen P de MPV contiene un ORF sustancial, y a este respecto es similar a P procedente de muchos otros paramixovirus (revisado en Lamb y Kolakofsky, 1996; Sedlmeier et al., 1998). En contraste con APV A y B y PVM, y similar a RSV y APV-C, el ORF de P de MPV carece de restos de cisteína. Ling (1995) sugirió que una región de elevada similitud entre todos los pneumovirus (aa 185-241) desempeña un papel en el proceso de síntesis del ARN o en el mantenimiento de la integridad estructural del complejo de la

nucleocápside. Esta región de similitud elevada también se encuentra en MPV (Figura 9) específicamente cuando se tienen en cuenta las sustituciones conservativas, mostrando una similitud de 100% con APV-C, 93% con APV-A y B, y aproximadamente 81% con RSV. El término C de la proteína P de MPV es rico en restos de glutamato, como se ha descrito para los APVs (Ling et al., 1995).

5 Otro marco de lectura abierto (ORF) adecuado, útil en análisis filogenéticos, comprende el ORF que codifica la proteína M. Cuando se encuentra una identidad de aminoácidos global de al menos 94%, preferiblemente de al menos 97% de la proteína M analizada con la proteína M del aislado I-2614, el aislado vírico analizado comprende un aislado de MPV preferido según la invención. El tercer ORF del genoma de MPV codifica una proteína de 254 aa, que se asemeja a los ORFs de M de otros pneumovirus. El ORF de M de MPV tiene exactamente el mismo tamaño que los ORFs de M de otros metapneumovirus (Tabla 5), y muestra una elevada homología de secuencia de aa con las proteínas de la matriz de APV (76-87%), menor homología con las de RSV y PVM (37-38%) y 10% o menos de homología con las de otros paramixovirus (Tabla 6). Easton (1997) comparó las secuencias de la matriz de todos los pneumovirus y encontró un hexapéptido conservado en el resto 14 a 19 que también está conservado en MPV (Figura 10). Para RSV, PVM y APV, se han identificado ORFs secundarios pequeños dentro o que solapan con el ORF principal de M (52 aa y 51 aa en bRSV, 75 aa en RSV, 46 aa en PVM y 51 aa en APV) (Yu et al., 1992; Easton et al., 1997; Samal et al., 1991; Satake et al., 1984). Se observaron dos ORFs pequeños en el ORF de M de MPV. Se encontró un ORF pequeño de 54 restos de aa dentro del ORF de M principal, comenzando en el nucleótido 2281, y se encontró un ORF pequeño de 33 restos de aa que solapa con el ORF principal de M, comenzando en el nucleótido 2893 (datos no mostrados). Similar a los ORFs secundarios de RSV y APV, no hay homología significativa entre estos ORFs secundarios y los ORFs secundarios de los otros pneumovirus, y faltan las señales de comienzo y de parada aparentes. Además, no se han dado a conocer pruebas de la síntesis de proteínas correspondiente a estos ORFs secundarios de APV y RSV.

Otro marco de lectura abierto (ORF) adecuado, útil en análisis filogenéticos, comprende el ORF que codifica la proteína F. Cuando se encuentra una identidad de aminoácidos global de al menos 95%, preferiblemente de al menos 97% de la proteína F analizada con la proteína F del aislado I-2614, el aislado vírico analizado comprende un aislado de MPV preferido según la invención. El ORF de F de MPV está situado adyacente al ORF de M, que es característico para los miembros del género *Metapneumovirus*. El gen F de MPV codifica una proteína de 539 aa, que es dos restos de aa más larga que F de APV-C (Tabla 5). El análisis de la secuencia de aa reveló una homología de 81% con APV-C, 67% con APV-A y B, 33-39% con las proteínas F de pneumovirus, y sólo 10-18% con otros paramixovirus (Tabla 6). Uno de los rasgos conservados entre proteínas F de paramixovirus, y también observado en MPV, es la distribución de los restos de cisteína en F1 (7 están conservados entre todos los paramixovirus), y dos en F2 (1 está conservado entre todos los paramixovirus). De los 3 sitios de glucosilación enlazados mediante N potenciales presentes en el ORF de F de MPV, ninguno está compartido con RSV, y dos (posición 66 y 389) están compartidos con APV. El tercer sitio de glucosilación enlazado mediante N potencial, único, para MPV está situado en la posición 206 (Figura 11). A pesar de la baja homología de secuencia con otros paramixovirus, la proteína F de MPV reveló características de proteína de fusión típicas consistentes con las descritas para las proteínas F y otros miembros de la familia *Paramyxoviridae* (Morrison, 1988). Las proteínas F de los miembros de *Paramyxoviridae* se sintetizan como precursores inactivos (F0) que se escinden mediante proteasas de células hospedantes que generan subunidades F2 aminotermiales y grandes subunidades F1 carboxiterniales. El sitio de escisión propuesto (Collins et al., 1996) está conservado entre todos los miembros de la familia *Paramyxoviridae*. El sitio de escisión de MPV contiene los restos RQSR. Ambos restos de arginina (R) están compartidos con APV y RSV, pero los restos de glutamina (Q) y serina (S) están compartidos con otros paramixovirus tales como el virus de la parainfluenza humana tipo 1, el virus de Sendai y los morbilivirus (datos no mostrados). Se piensa que la región hidrófoba en el término amino de F1 funciona como el dominio de fusión de membrana, y muestra una elevada similitud de secuencia entre paramixovirus y morbilivirus, y en menor grado los pneumovirus (Morrison, 1988). Estos 26 restos (posición 137-163, Figura 11) están conservados entre MPV y APV-C, lo que está de acuerdo con que esta región esté muy conservada entre los metapneumovirus (Naylor et al., 1998; Seal et al., 2000).

Como se observa para las subunidades F2 de APV y otros paramixovirus, MPV reveló una supresión de 22 restos de aa en comparación con RSV (posición 107-128, Figura 11). Además, para RSV y APV, se encontró que el péptido señal y el dominio de anclaje están conservados dentro de los subtipos y presentaron una elevada variabilidad entre los subtipos (Plows et al., 1995; Naylor et al., 1998). El péptido señal de MPV (aa 10-35, Figura 11) en el término amino de F2 presenta cierta similitud de secuencia con APV-C (18 de 26 restos de aa son similares) y menor conservación con otros APVs o RSV. Se observa mucha más variabilidad en el dominio de anclaje de la membrana en el término carboxi de F1, aunque todavía se observa cierta homología con APV-C.

Otro marco de lectura abierto (ORF) adecuado, útil en análisis filogenéticos, comprende el ORF que codifica la proteína M2. Cuando se encuentra una identidad de aminoácidos global de al menos 85%, preferiblemente de al menos 90% de la proteína M2 analizada con la proteína M2 del aislado I-2614, el aislado vírico analizado comprende un aislado de MPV preferido según la invención. El gen M2 es único para los *Pneumovirinae*, y se han observado dos ORFs solapantes en todos los pneumovirus. El primer ORF principal representa la proteína M2-1, que potencia la procesabilidad de la polimerasa vírica (Collins et al., 1995; Collins, 1996) y su lectura de las regiones intergénicas (Hardy et al., 1998; Fearns et al., 1999). El gen M2-1 para MPV, situado adyacente al gen F, codifica una proteína de 187 aa (Tabla 5), y revela la homología más elevada (84%) con M2-1 de APV-C (Tabla 6). La comparación de todas

las proteínas M2-1 pneumovíricas reveló la mayor conservación en la mitad aminoterminal de la proteína (Collins et al., 1990; Zamora et al., 1992; Ahmadian et al., 1999), lo que está de acuerdo con la observación de que MPV presenta una similitud de 100% con APV-C en los primeros 80 restos de aa de la proteína (Figura 12A). La proteína M2-1 de MPV contiene 3 restos de cisteína situados en los primeros 30 restos de aa que están conservados entre todos los pneumovirus. Tal concentración de cisteínas se encuentra frecuentemente en proteínas de unión a cinc (Ahmadian et al., 1991; Cuesta et al., 2000).

Los ORFs secundarios (M2-2) que solapan con los ORFs de M2-1 de los pneumovirus están conservados en localización pero no en secuencia, y se piensa que están implicados en el control del intercambio entre la replicación y la transcripción del ARN vírico (Collins et al., 1985; Elango et al., 1985; Baybutt et al., 1987; Collins et al., 1990; Ling et al., 1992; Zamora et al., 1992; Alansari et al., 1994; Ahmadian et al., 1999; Bermingham et al., 1999). Para MPV, el ORF de M2-2 comienza en el nucleótido 512 en el ORF de M2-1 (Figura 7), que es exactamente la misma posición de partida que para APV-C. La longitud de los ORFs de M2-2 es la misma para APV-C y MPV. 71 restos de aa (Tabla 5). La comparación de secuencias del ORF de M2-2 (Figura 12B) reveló una homología de secuencia de aa de 56% entre MPV y APV-C, y sólo una homología de secuencia de aa de 26-27% entre MPV y APV-A y B (Tabla 6).

Otro marco de lectura abierto (ORF) adecuado, útil en análisis filogenéticos, comprende el ORF que codifica la proteína L. Cuando se encuentra una identidad de aminoácidos global de al menos 91%, preferiblemente de al menos 95% de la proteína L analizada con la proteína L del aislado I-2614, el aislado vírico analizado comprende un aislado de MPV preferido según la invención. En analogía con otros virus de hebra negativa, el último ORF del genoma de MPV es un componente de ARN polimerasa dependiente de ARN de los complejos de replicación y transcripción. El gen L de MPV codifica una proteína de 2005 aa, que es 1 resto más larga que la proteína de APV-A (Tabla 5). La proteína L de MPV comparte una homología de 64% con APV-A, 42-44% con RSV, y aproximadamente 13% con otros paramixovirus (Tabla 6). Poch et al. (1989; 1990) identificaron seis dominios conservados dentro de las proteínas L de virus de ARN de hebra negativa no segmentados, a partir de los cuales el dominio III contenía los cuatro motivos de polimerasa nuclear que se piensa que son esenciales para la función de la polimerasa. Estos motivos (A, B, C y D) están bien conservados en la proteína L de MPV: en los motivos A, B y C: MPV comparte una similitud de 100% con todos los pneumovirus, y en el motivo D: MPV comparte una similitud de 100% con APV y 92% con los RSVs. Para todo el dominio III (aa 625-847 en el ORF de L), MPV comparte una identidad de 83% con APV, 67-68% con RSV, y 26-30% con otros paramixovirus (Figura 15). Además de los motivos de polimerasa, las proteínas L de pneumovirus contienen una secuencia que se conforma a un motivo de unión de ATP de consenso K(X)₂₁GEGAGN(X)₂₀K (Stec, 1991). El ORF de L de MPV contiene un motivo similar como APV, en el que el espaciamiento de los restos intermedios está apagado por uno: K(X)₂₂GEGAGN(X)₁₉K.

Un marco de lectura abierto (ORF) adecuado muy preferido, útil en análisis filogenéticos, comprende el ORF que codifica la proteína SH. Cuando se encuentra una identidad de aminoácidos global de al menos 30%, preferiblemente de al menos 50%, más preferiblemente de al menos 75% de la proteína SH analizada con la proteína SH de aislado I-2614, el aislado vírico analizado comprende un aislado de MPV preferido según la invención. El gen situado adyacente a M2 de MPV codifica una proteína de 183 aa (Figura 7). El análisis de la secuencia nucleotídica y su secuencia de aminoácidos deducida no reveló homología deducible con otros genes o productos génicos de virus de ARN. El ORF de SH de MPV es el ORF de SH más largo conocido hasta la fecha (Tabla 5). La composición de los restos de aa del ORF de SH es relativamente similar a la de APV, RSV y PVM, con un porcentaje elevado de treonina y serina (22%, 18%, 19%, 20,0%, 21% y 28% de contenido de serina/treonina para MPV, APV, RSV A, RSV B, bRSV y PVM respectivamente). El ORF de SH de MPV contiene 10 restos de cisteína, mientras que SH de APV contiene 16 restos de cisteína. Todos los pneumovirus tienen números similares de sitios potenciales de N-glucosilación (MPV 2, APV 1, RSV 2, bRSV 3, PVM 4).

Los perfiles de hidrofobia de la proteína SH de MPV y SH de APV y RSV revelaron características estructurales similares (Figura 13B). Los ORFs de SH de APV y MPV tienen un término N hidrófilo (aa 1-30), un dominio hidrófobo central (aa 30-53) que puede servir como un dominio de expansión de membrana potencial, un segundo dominio hidrófobo alrededor del resto 160, y un término C hidrófilo. Por el contrario, SH de RSV parece que carece de la mitad C-terminal de los ORFs de APV y MPV. En todas las proteínas SH de los pneumovirus, el dominio hidrófobo está flanqueado por aminoácidos básicos, que también se encuentran en el ORF de SH para MPV (aa 29 y 54).

Otro marco de lectura abierto (ORF) adecuado muy preferido, útil en análisis filogenéticos, comprende el ORF que codifica la proteína G. Cuando se encuentra una identidad de aminoácidos global de al menos 30%, preferiblemente de al menos 50%, más preferiblemente de al menos 75% de la proteína G analizada con la proteína G del aislado I-2614, el aislado vírico analizado comprende un aislado de MPV preferido según la invención. El ORF de G de MPV está situado adyacente al gen SH, y codifica una proteína de 236 aminoácidos. Se encuentra un pequeño ORF secundario inmediatamente después de este ORF, que codifica potencialmente 68 restos de aa (pos. 6973-7179), pero que carece de un codón de partida. Un tercer ORF principal, en un marco de lectura diferente, de 194 restos de aa (fragmento 4, Figura 7) solapa con ambos de estos ORFs, pero también carece de un codón de partida (nucleótido 6416-7000). Este ORF principal es seguido de un cuarto ORF en el mismo marco de lectura (nt 7001-7198), que codifica posiblemente 65 restos de aa pero que nuevamente carece de un codón de partida. Finalmente, se encuentra un ORF potencial de 97 restos de aa (pero que carece de un codón de partida) en el tercer marco de lectura (nt 6444-6737, Figura 1). A diferencia del primer ORF, los otros ORFs no tienen secuencias aparentes de

comienzo génico o de terminación génica (véase más abajo). Aunque el ORF de G de 236 restos de aa representa probablemente al menos una parte de la proteína de unión de MPV, no se puede excluir que las secuencias codificantes adicionales se expresen como proteínas separadas o como parte de la proteína de unión a través de algún suceso de edición del ARN. Se debería observar que para APV y RSV, no se han identificado ORFs secundarios después del ORF de G primario, sino que tanto APV como RSV tienen ORFs secundarios dentro del ORF principal de G. Sin embargo, faltan pruebas para la expresión de estos ORFs, y no hay homología entre las secuencias de aa predichas para diferentes virus (Ling et al., 1992). Los ORFs secundarios en G de MPV no revelan características de otras proteínas G, y el hecho de que se expresen los ORFs adicionales necesita una investigación adicional. Los análisis de BLAST con los cuatro ORFs no reveló homología discernible a nivel de la secuencia nucleotídica o de aa con otros genes o productos génicos víricos conocidos. Esto está de acuerdo con las bajas homologías de secuencia encontradas para otras proteínas G tales como hRSV A y B (53%) (Johnson et al., 1987) y APV A y B (38%) (Juhász et al., 1994). Mientras que la mayoría de los ORFs de MPV se asemejan a los de APV tanto en longitud como en secuencia, el ORF de G de MPV es considerablemente más pequeño que el ORF de G de APV (Tabla 5). La secuencia de aa reveló un contenido de serina y treonina de 34%, que es incluso mayor que el 32% para RSV y 24% para APV. El ORF de G también contiene 8,5% de restos de prolina, que es mayor que el 8% para RSV y 7% para APV. La abundancia inusual de restos de prolina en las proteínas G de APV, RSV y MPV también se ha observado en glucoproteínas de origen mucinoso, en las que es un determinante principal de la estructura tridimensional de las proteínas (Collins et al., 1983; Wertz et al., 1985; Jentoft, 1990).

El número de sitios potenciales de glucosilación enlazados mediante *N* en G de MPV es similar a otros pneumovirus: MPV tiene 5, mientras que hRSV tiene 7, bRSV tiene 5, y APV tiene 3 a 5.

El perfil de hidrofobia predicho de G de MPV reveló características similares a los otros pneumovirus. El término amino contiene una región hidrófila seguida de un área hidrófoba corta (aa 33-53) y un término carboxi principalmente hidrófilo (Figura 14B). Esta organización global es consistente con la de una proteína transmembránica tipo II anclada, y corresponde bien con estas regiones en la proteína G de APV y RSV. El ORF de G de MPV contiene sólo 1 resto de cisteína, en contraste con RSV y APV (5 y 20, respectivamente).

Según los análisis serológicos clásicos como por ejemplo conocidos de Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., y Brown, F., *Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol*, 1991. Suplemento 2: p. 140-144, un aislado de MPV es también identificable como perteneciente a un serotipo como se proporciona aquí, definiéndose en base a su peculiaridad inmunológica, según se determina mediante neutralización cuantitativa con antisueros de animal (obtenidos, por ejemplo, de hurones o cobayas como se proporciona en la descripción detallada). Tal serotipo no tiene reacción cruzada con otros, o muestra una relación de título homólogo a heterólogo >16 en ambas direcciones. Si la neutralización muestra un cierto grado de reacción cruzada entre dos virus en una de las dos direcciones o en ambas direcciones (relación de título homólogo a heterólogo de ocho o 16), se supone una cualidad distintiva del serotipo si existen diferencias biofísicas/bioquímicas de los ADN. Si la neutralización muestra un grado distinto de reacción cruzada entre dos virus en una o ambas direcciones (relación de título homólogo a heterólogo menor que ocho), se supone identidad de serotipo de los aislados bajo estudio. Como se afirma, se proporcionan aquí aislados prototípicos útiles, tales como el aislado I-2614, también conocido aquí como aislado 00-1 de MPV.

Una clasificación adicional de un virus como un virus de ARN monocatenario de sentido negativo esencialmente de mamífero aislado como se proporciona aquí se puede hacer en base a la homología de las proteínas G y/o SH. Cuando en general la identidad de secuencia de aminoácidos global entre los ORFs de N, P, M, F, M2 y L de APV (aislado de pájaros) y de MPV (aislado de seres humanos) fue 64 a 88%, y también se encontró homología de secuencia nucleotídica entre las regiones no codificantes de los genomas de APV y MPV, no se encontró esencialmente ninguna homología de secuencia de aminoácidos discernible entre dos de los ORFs del aislado humano (MPV) y cualquiera de los ORFs de otros paramixovirus. El contenido de aminoácidos, los perfiles de hidrofobia y la localización de estos ORFs en el genoma vírico muestran que representan análogos de proteínas G y SH. La homología de secuencia entre APV y MPV, su organización genómica similar (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L,5'), así como los análisis filogenéticos, proporcionan pruebas adicionales para la clasificación propuesta de MPV como el primer metapneumovirus de mamífero. De este modo, por ejemplo, se identifican nuevos aislados de MPV como tales mediante aislamiento y caracterización vírica en células tMK u otras células, mediante RT-PCR y/o análisis de secuencia seguido de análisis de árboles filogenéticos, y mediante técnicas serológicas tales como ensayos de neutralización de virus, ensayos de inmunofluorescencia indirecta, ensayos de inmunofluorescencia directa, análisis de FACs u otras técnicas inmunológicas. Preferiblemente, estas técnicas están dirigidas a los análogos de las proteínas SH y/o G.

Por ejemplo, la invención proporciona aquí un método para identificar aislados adicionales de MPV como se proporcionan aquí, comprendiendo el método inocular un cobaya o hurón esencialmente no infectado con MPV o libre de patógenos específicos (en la descripción detallada, también es posible que el animal se inocule intranasalmente mediante otras vías de inoculación tales como la inoculación intramuscular o intradérmica, y usando algún otro animal experimental) con el aislado prototípico I-2614 o aislados relacionados. Los sueros se recogen del animal en el día cero, dos semanas y tres semanas después de la inoculación. El animal específicamente seroconvertido se mide en el ensayo de neutralización vírica (VN) e IFA indirecto contra el aislado respectivo I-2614,

y los sueros procedentes del animal seroconvertido se usan en la detección inmunológica de dichos aislados adicionales.

Como ejemplo, la invención proporciona la caracterización de un nuevo miembro en la familia de *Paramyxoviridae*, un metapneumovirus humano o virus semejante a metapneumovirus (puesto que su taxonomía final espera
5 discusión mediante un comité de taxonomía vírica, el MPV se describe aquí por ejemplo como correspondiente taxonómicamente a APV) (MPV) que puede provocar RTI grave en seres humanos. Los signos clínicos de la enfermedad provocada por MPV son esencialmente similares a los provocados por hRSV, tal como tos, mialgia, vómitos, fiebre, bronquiolitis o neumonía, posible conjuntivitis, o combinaciones de los mismos. Como se observa con niños infectados por hRSV, específicamente los niños muy jóvenes pueden requerir hospitalización. Como
10 ejemplo, se proporciona aquí un MPV que se depositó el 19 de enero de 2001 como I-2614 con CNCM, Institute Pasteur, París, o un aislado vírico que corresponde filogenéticamente con él. De este modo, la invención proporciona un virus que comprende un ácido nucleico o fragmento funcional filogenéticamente correspondiente a una secuencia de ácido nucleico mostrada en las figuras 6a, 6b, 6c, o estructuralmente correspondiente con él. En particular, la invención proporciona un virus caracterizado porque, después de ensayarlo en análisis de árboles filogenéticos en los que se generan árboles de verosimilitud máxima usando 100 *bootstraps* y 3 salteados, se encuentra que es filogenéticamente correspondiente de forma más próxima a un aislado vírico depositado como I-
15 **2614** con CNCM, París, que su relación con un aislado vírico de pneumovirus aviar (APV) también conocido como virus de rinotraqueítis del pavo (TRTV), el agente etiológico de la rinotraqueítis aviar. Es particularmente útil usar un aislado vírico de AVP-C como grupo externo en dichos análisis de árboles filogenéticos, siendo el virus relacionado más próximo, aunque es un virus esencialmente no de mamífero.

Se propone que el nuevo virus humano se denomine metapneumovirus humano o virus semejante a metapneumovirus (MPV) basado en varias observaciones. El análisis de EM reveló partículas semejantes a paramixovirus. Consistente con la clasificación, MPV pareció ser sensible al tratamiento con cloroformo. MPV se
25 cultiva óptimamente en células tMK, y depende de tripsina. Los síntomas clínicos causados por MPV, así como el CPE típico y la falta de actividad hemoaglutinante, sugieren que este virus está estrechamente relacionado con hRSV. Aunque la mayoría de los paramixovirus tienen actividad hemoaglutinante, la mayoría de los pneumovirus no la tienen¹³.

Como ejemplo, la invención proporciona un paramixovirus previamente no identificado procedente de muestras de aspirado nasofaríngeo tomadas de 28 niños que sufren RTI grave. Los síntomas clínicos de estos niños fueron muy
30 similares a los provocados por hRSV. Veintisiete de los pacientes fueron niños por debajo de la edad de cinco años, y la mitad de estos tuvieron entre 1 y 12 meses de edad. El otro paciente tuvo 18 años de edad. Todos los individuos sufrieron RTI superior, con los síntomas oscilando desde tos, mialgia, vómito y fiebre hasta bronquiolitis y neumonía grave. La mayoría de estos pacientes fueron hospitalizados durante una a dos semanas.

Los aislados víricos de estos pacientes tuvieron la morfología paramixovírica en microscopía electrónica de contraste negativo, pero no reaccionaron con antisueros específicos contra paramixovirus humanos y animales conocidos. Todos estuvieron estrechamente relacionados entre sí, según se determina mediante ensayos de
35 inmunofluorescencia indirecta (IFA) con sueros provocados contra dos de los aislados. Los análisis de secuencia de nuevo de estos aislados revelaron que el virus está relacionado en cierto modo con APV. Basándose en los datos virológicos, la homología de secuencia así como la organización genómica propuesta es que el virus es un miembro del género *Metapneumovirus*. Los estudios serológicos mostraron que este virus es un patógeno relativamente común, puesto que la seroprevalencia en los Países Bajos se aproxima al 100% de seres humanos hacia la edad de cinco años. Además, se encontró que la seroprevalencia fue igualmente elevada en sueros recogidos de seres humanos en 1958, indicando que este virus ha estado circulando en la población humana durante más de 40 años. La identificación de este nuevo miembro propuesto del género *Metapneumovirus* también proporciona ahora el
40 desarrollo de medios y métodos para ensayos de diagnóstico o kits de ensayo y vacunas o composiciones séricas o de anticuerpos para infecciones víricas del aparato respiratorio, y para métodos para ensayar o cribar agentes antivíricos útiles en el tratamiento de infecciones por MPV.

Hasta aquí, la invención proporciona, entre otros, un ácido nucleico aislado o recombinante, o fragmento funcional específico de virus del mismo, obtenible de un virus según la invención. En particular, la invención proporciona
50 cebadores y/o sondas adecuados para identificar un ácido nucleico de MPV.

Además, la invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico según la invención. Para empezar, se proporcionan vectores tales como vectores plasmídicos que contienen (partes de) el genoma de MPV, vectores víricos que contienen (partes de) el genoma de MPV (por ejemplo, pero sin limitarse a otros paramixovirus, virus de la vacuna, retrovirus, baculovirus), o MPV que contiene (partes de) el genoma de otros virus u otros patógenos.
55 Además, se ha descrito un número de técnicas genéticas inversas para la generación de virus de hebra negativa recombinantes, basándose en dos parámetros críticos. En primer lugar, la producción de tal virus se basa en la replicación de una copia parcial o de longitud completa del genoma de ARN vírico (vRNA) de sentido negativo o una copia complementaria del mismo (cRNA). Este vRNA o cRNA se puede aislar de virus infeccioso, producido con la transcripción *in vitro*, o producido en células con la transfección de ácidos nucleicos. En segundo lugar, la producción de virus de hebra negativa recombinante se basa en un complejo de polimerasa funcional. Típicamente, el complejo de polimerasa de los pneumovirus consiste en las proteínas N, P, L y posiblemente M2, pero no está
60

necesariamente limitado a ello. Los complejos de polimerasa o sus componentes se pueden aislar de partículas víricas, se pueden aislar de células que expresan uno o más de los componentes, o se pueden producir con la transfección de vectores de expresión específicos.

5 Se pueden obtener copias infecciosas de MPV cuando el vRNA, cRNA, o los vectores que expresan estos RNAs mencionados anteriormente se replican mediante el complejo de polimerasa mencionado anteriormente^{16,17,18,19,20,21,22}. Para la generación de minireplicones o un sistema genético inverso para generar una copia de longitud completa que comprende la mayoría o todo el genoma de MPV, es suficiente usar secuencias de ácido nucleico de extremo 3' y/o extremo 5' obtenibles, por ejemplo, de APV (Randhawa et al., 1997) o del propio MPV.

10 También, la invención proporciona una célula hospedante que comprende un ácido nucleico o un vector según la invención. Los vectores plasmídicos o víricos que contienen los componentes de polimerasa de MPV (presumiblemente N, P, L y M2, pero no necesariamente limitado a ellos) se generan en células procariotas para la expresión de los componentes en tipos celulares relevantes (bacterias, células de insectos, células eucariotas). Los vectores plasmídicos o víricos que contienen copias de longitud completa o parciales del genoma de MPV se
15 generarán en células procariotas para la expresión in vitro o in vivo de ácidos nucleicos víricos. Estos últimos vectores pueden contener otras secuencias víricas para la generación de virus quiméricos o proteínas víricas quiméricas, pueden carecer de partes del genoma vírico para la generación de virus defectuosos para la replicación, y pueden contener mutaciones, supresiones o inserciones para la generación de virus atenuados.

20 Las copias infecciosas de MPV (sean de tipo salvaje, atenuada, defectuosa para la replicación o quimérica) se pueden producir con la coexpresión de los componentes de polimerasa según tecnologías del estado de la técnica descritas anteriormente.

25 Además, se pueden usar células eucariotas, que expresan transitoria o establemente una o más proteínas de MPV parciales o de longitud completa. Tales células se pueden obtener mediante transfección (proteínas o vectores de ácido nucleico), infección (vectores víricos) o transducción (vectores víricos), y pueden ser útiles para la complementación de virus mencionados de tipo salvaje, atenuados, defectuosos para la replicación, o quiméricos.

30 Un virus quimérico puede ser de uso particular para la generación de vacunas recombinantes que protegen frente a dos o más virus^{23,24,26}. Por ejemplo, se puede prever que un vector vírico de MPV que expresa una o más proteínas de RSV, o un vector de RSV que expresa una o más proteínas de MPV, protegerá a individuos vacunados con tal vector frente a ambas infecciones víricas. Un enfoque similar se puede prever para PI3 u otros paramixovirus. Los virus atenuados y defectuosos para la replicación pueden ser de uso para fines de vacunación con vacunas vivas, como se ha sugerido para otros virus^{25,26}.

35 En una realización preferida, la invención proporciona una molécula proteínica o proteína vírica específica de metapneumovirus o fragmento funcional de la misma codificada por un ácido nucleico según la invención. Las moléculas proteínicas útiles derivan, por ejemplo, de cualquiera de los genes o fragmentos genómicos derivables de un virus según la invención. Tales moléculas, o fragmentos antigénicos de ellas, como se proporcionan aquí, son útiles por ejemplo en métodos o kits de diagnóstico y en composiciones farmacéuticas tales como vacunas subunitarias. Son particularmente útiles la proteína F, SH y/o G, o sus fragmentos antigénicos, para la inclusión como antígeno o inmunógeno subunitario, pero también se pueden usar virus completos inactivados. También son particularmente útiles aquellas sustancias proteínicas que están codificadas por fragmentos de ácido nucleico
40 recombinante que se identifican para análisis filogenéticos, y por supuesto son preferidos aquellos que están dentro de los límites preferidos o metas de ORFs útiles en análisis filogenéticos, en particular para provocar anticuerpos específicos de MPV, ya sea in vivo (por ejemplo con fines protectores o para proporcionar anticuerpos de diagnóstico) o in vitro (por ejemplo mediante tecnología de presentación de fagos u otra técnica útil para generar anticuerpos sintéticos).

45 También se proporcionan aquí anticuerpos, ya sea naturales policlonales o monoclonales, o anticuerpos sintéticos (por ejemplo moléculas de unión derivadas de librerías (fágicas)) que reaccionan específicamente con un antígeno que comprende una molécula proteínica o fragmento funcional específico de MPV de la misma según la invención. Tales anticuerpos son útiles en un método para identificar un aislado vírico como un MPV, que comprende hacer reaccionar dicho aislado vírico o un componente del mismo con un anticuerpo como se proporciona aquí. Esto se
50 puede lograr, por ejemplo, usando MPV purificado o no purificado, o partes del mismo (proteínas, péptidos), usando ELISA, RIA, FACS o formatos similares de ensayos de detección de antígenos (Current Protocols in Immunology). Como alternativa, se pueden usar células infectadas o cultivos celulares para identificar antígenos víricos usando técnicas clásicas de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica.

55 Otros métodos para identificar un aislado vírico tal como MPV comprende hacer reaccionar dicho aislado vírico o un componente del mismo con un ácido nucleico específico de virus según la invención, en particular cuando dicho virus de mamífero comprenden un virus humano.

De esta manera, la invención proporciona un aislado vírico identificable con un método según la invención como un virus de mamífero que corresponde taxonómicamente a un virus de ARN monocatenario de sentido negativo

identificable como perteneciente probablemente al género *Metapneumovirus* en la subfamilia *Pneumovirinae* de la familia *Paramyxoviridae*.

El método es útil en un método para diagnosticar virológicamente una infección por MPV de un mamífero, comprendiendo dicho método determinar por ejemplo en una muestra de dicho mamífero la presencia de un aislado vírico o componente del mismo haciendo reaccionar dicha muestra con un ácido nucleico o un anticuerpo según la invención. Adicionalmente se dan ejemplos en la descripción detallada, tal como el uso de PCR (u otras técnicas de amplificación o hibridación bien conocidas en la técnica), o el uso de detección mediante inmunofluorescencia (u otras técnicas inmunológicas conocidas en la técnica).

La invención también proporciona un método para diagnosticar serológicamente una infección por MPV de un mamífero, que comprende determinar en una muestra de dicho mamífero la presencia de un anticuerpo dirigido específicamente contra un MPV o componente del mismo, haciendo reaccionar dicha muestra con una molécula proteínica o fragmento de la misma o un antígeno según la invención.

Los métodos y medios proporcionados aquí son particularmente útiles en un kit de diagnóstico para diagnosticar una infección por MPV, ya sea mediante diagnóstico virológico o serológico. Tales kits o ensayos pueden comprender por ejemplo un virus, un ácido nucleico, una molécula proteínica o fragmento de la misma, un antígeno y/o un anticuerpo según la invención. También se proporciona el uso de un virus, un ácido nucleico, una molécula proteínica o fragmento de la misma, un antígeno y/o un anticuerpo según la invención, para la producción de una composición farmacéutica, por ejemplo para el tratamiento o prevención de infecciones por MPV y/o para el tratamiento o prevención de enfermedades del aparato respiratorio, en particular en seres humanos. La atenuación del virus se puede lograr mediante métodos consolidados desarrollados para este fin, incluyendo, pero sin limitarse a, el uso de virus relacionados de otras especies, pasadas en serie a través de animales de laboratorio o/y cultivos tisulares/celulares, mutagénesis dirigida al sitio de clones moleculares, e intercambio de genes o fragmentos génicos entre virus relacionados.

Una composición farmacéutica que comprende un virus, un ácido nucleico, una molécula proteínica o fragmento de la misma, un antígeno y/o un anticuerpo según la invención se puede usar por ejemplo en un método para el tratamiento o prevención de una infección por MPV y/o una enfermedad respiratoria, que comprende proporcionar a un individuo con una composición farmacéutica según la invención. Esto es lo más útil cuando dicho individuo comprende un ser humano, específicamente cuando dicho ser humano está por debajo de los 5 años de edad, puesto que los infantes y los niños serán infectados muy probablemente por un MPV humano como se proporciona aquí. Generalmente, en la fase aguda, los pacientes sufrirán síntomas respiratorios superiores que predisponen a otras enfermedades respiratorias y a otras enfermedades. También se puede producir una enfermedad respiratoria inferior, predisponiendo a más condiciones u otras condiciones más serias.

La invención también proporciona un método para obtener un agente antivírico útil en el tratamiento de enfermedad del aparato respiratorio, que comprende establecer un cultivo celular o animal experimental que comprende un virus según la invención, tratar dicho cultivo o animal con un agente antivírico candidato, y determinar el efecto de dicho agente sobre dicho virus o su infección de dicho cultivo o animal. Un ejemplo de tal agente antivírico comprende un anticuerpo neutralizante de MPV, o componente funcional del mismo, como se proporciona aquí, pero igualmente se obtienen agentes antivíricos de otra naturaleza. La invención también proporciona el uso de un agente antivírico según la invención para la preparación de una composición farmacéutica, en particular para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedad del aparato respiratorio, específicamente cuando está provocada por infección por MPV, y proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente antivírico según la invención, útil en un método para el tratamiento o prevención de una infección por MPV o enfermedad respiratoria, comprendiendo dicho método proporcionar a un individuo con tal composición farmacéutica.

La invención se explica adicionalmente en la descripción detallada sin limitarse a ella.

Leyendas de las figuras

La figura 1A comprende la tabla 1: Porcentaje de homología encontrado entre la secuencia de aminoácidos del aislado 00-1 y otros miembros de los Pneumovirinae. Los porcentajes (x100) se dan para las secuencias de aminoácidos de N, P, M, F y los fragmentos de RAP-PCR en L (8 y 9/10). Los números de acceso usados para los análisis se describen en la sección de materiales y métodos.

La figura 1B comprende la tabla 2: Seroprevalencia de MPV en seres humanos categorizados mediante grupo de edad usando ensayos de inmunofluorescencia y de neutralización vírica.

Fig. 2: Representación esquemática del genoma de APV con la localización y sitio de los fragmentos obtenidos con RAP-PCR y RT-PCR en el aislado vírico 00-1. Los fragmentos 1 a 10 se obtuvieron usando RAP-PCR. El fragmento A se obtuvo con un cebador en el fragmento 1 y 2 de RAP-PCR, y un cebador diseñado basándose en el alineamiento de las secuencias líder y rastreadora de APV y RSV⁶. El fragmento B se obtuvo usando cebadores diseñados en el fragmento 1 y 2 de RAP-PCR y el fragmento 3 de RAP-PCR. El fragmento C se obtuvo con los cebadores diseñados en el fragmento 3 de RAP-PCR y el fragmento 4, 5, 6 y 7 de RAP-PCR.

Para todos los árboles filogenéticos, (figuras 3-5) las secuencias de ADN se alinearon usando el paquete de software ClustalW y se generaron los árboles de verosimilitud máxima usando el paquete de software DNA-ML del programa Phylip 3.5 usando 100 *bootstraps* y 3 salteados¹⁵. Las secuencias previamente publicadas que se usaron para la generación de árboles filogenéticos estuvieron disponibles de Genbank con los números de acceso: para todos los ORFs: hRSV: NC001781; bRSV: NC001989; para el ORF de F: PVM, D11128; APV-A, D00850; APV-B, Y14292; APV-C, AF187152; para el ORF de N: PVM, D10331; APV-A, U39295; APV-B, U39296; APV-C, AF176590; para el ORF de M: PMV, U66893; APV-A, X58639; APV-B, U37586; APV-C, AF262571; para el ORF de P: PVM, 09649; APV-A, U22110, APV-C, AF176591. Los análisis filogenéticos para los nueve aislados víricos diferentes de MPV se llevaron a cabo con la cepa C de APV como grupo externo.

Abreviaturas usadas en las figuras: hRSV: RSV humano; bRSV: RSV bovino; PVM: virus de la neumonía de ratones; APV-A, B, y C: pneumovirus aviar tipo A, B y C.

Fig. 3: Comparación de los ORFs de N, P, M y F de miembros de la subfamilia *Pneumovirinae* y aislado vírico 00-1. El alineamiento muestra la secuencia de aminoácidos de las proteínas completas N, P, M y F, y las proteínas L parciales del aislado vírico 00-1. Se muestran los aminoácidos que difieren entre el aislado 00-1 y los otros virus, los aminoácidos idénticos se representan mediante puntos, los saltos se representan mediante líneas discontinuas. Los números corresponden a las posiciones de aminoácidos en las proteínas. Los números de acceso usados para los análisis se describen en la sección de materiales y métodos. APV-A, B o C: pneumovirus aviar tipo A, B o C, b- o h-RSV: virus sincitial respiratorio bovino o humano, PVM: virus de la neumonía de ratones. L8: fragmento 8 obtenido con RAP-PCR localizado en L, L9/10: consenso de fragmento 9 y 10 obtenido con RAP-PCR, situado en L. Para el alineamiento de P, no hubo secuencia de APV-B disponible del Genebank, para el alineamiento de L, sólo estuvieron disponibles las secuencias de bRSV, hRSV y APV-A.

Fig. 4: Análisis filogenéticos de los ORFs de N, P, M y F de miembros del género *Pneumovirinae* y aislado vírico 00-1. El análisis filogenético se llevó a cabo sobre secuencias víricas a partir de los siguientes genes: F (panel A), N (panel B), M (panel C), y P (panel D). Los árboles filogenéticos se basan en análisis de verosimilitud máxima usando 100 *bootstraps* y 3 salteados. La escala que representa el número de cambios nucleotídicos se muestra para cada árbol.

Fig. 5: Relación filogenética para partes de los ORFs de F (panel A), N (panel B), M (panel C) y L (panel D) de nueve de los aislados de MPV primarios con APV-C, su pariente genéticamente más próximo. Los árboles filogenéticos se basan en análisis de verosimilitud máxima. La escala que representa el número de cambios nucleotídicos se muestra para cada árbol. Números de acceso para APV-C: panel A: D00850; panel B: U39295; panel C: X58639; y panel D: U65312.

Fig. 6A: Información de secuencia nucleotídica y de aminoácidos a partir del extremo 3' del genoma de aislado 00-1 de MPV. Se dan los ORFs. N: ORF para nucleoproteína; P: ORF para fosfoproteína; M: ORF para proteína de la matriz; F: ORF para proteína de fusión; GE: extremo del gen; GS: comienzo del gen.

Fig. 6B y C: Información de secuencia nucleotídica y de aminoácidos a partir de fragmentos obtenidos en el gen de polimerasa (L) de aislados 00-1 de MPV. La colocación de los fragmentos en L se basa en homologías de proteína con APV-C (número de acceso U65312). El fragmento 8 traducido (Fig. 6B) está situado en el número de aminoácidos 8 a 243, y el consenso de los fragmentos 9 y 10 (Fig. 6C) está situado en el número de aminoácidos 1358 a 1464 del ORF de L de APV-C.

Figura 7:

Mapa genómico del aislado 00-1 de MPV. Las posiciones nucleotídicas de los codones de partida y de parada se indican bajo cada ORF. Las líneas dobles que cruzan el ORF de L indican la representación acortada del gen L. Los tres marcos de lectura debajo del mapa indican el ORF de G primario (nt 6262-6972) y los ORFs secundarios potenciales solapantes.

Figura 8:

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos predicha de la nucleoproteína de MPV con aquellos de otros pneumovirus. Las regiones conservadas identificadas por Barr (1991) se representan mediante cajas y A, B y C marcados. La región conservada entre pneumovirus (Li, 1996) se muestra en sombra gris. Los saltos se representan mediante líneas discontinuas, los puntos indican las posiciones de restos de aminoácidos idénticos en comparación con MPV.

Figura 9:

Comparación de la secuencia de aminoácidos de la fosfoproteína de MPV con aquellas de otros pneumovirus. La región de similitud elevada (Ling, 1995) está metida en cajas, y la región rica en glutamato

está sombreada en gris. Los saltos se representan mediante líneas discontinuas, y los puntos indican la posición de los restos de aminoácidos idénticos en comparación con MPV.

Figura 10:

5 Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína de la matriz de MPV con aquellas de otros pneumovirus. La secuencia hexapeptídica conservada (Easton, 1997) está sombreada en gris. Los saltos se representan mediante líneas discontinuas, y los puntos indican la posición de los restos de aminoácidos con respecto a MPV.

Figura 11:

10 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos predicha de la proteína de fusión de MPV con aquellas de otros pneumovirus. Los restos de cisteína conservados están encerrados en cajas, los sitios de glucosilación enlazados mediante N están subrayados, el sitio de escisión de F0 está doblemente subrayado, el péptido de fusión, el péptido señal y el dominio de anclaje de la membrana se muestran sombreados en gris. Los saltos se representan mediante líneas discontinuas, y los puntos indican la posición de los aminoácidos idénticos con respecto a MPV.

15 Figura 12

20 Comparación de la secuencia de aminoácidos de los ORFs de M2 de MPV con las de otros pneumovirus. El alineamiento de los ORFs de M2-1 se muestra en el panel A, con el término amino conservado (Collins, 1990; Zamora, 1999) mostrado de forma sombreada en gris. Los tres restos de cisteína conservados están impresos en negrita e indicados mediante #. El alineamiento de los ORFs de M2-2 se muestra en el panel B. Los saltos se representan mediante líneas discontinuas, y los puntos indican la posición de aminoácidos idénticos con respecto a MPV.

Figura 13

25 Análisis de las secuencias de aminoácidos del ORF de SH de MPV. (A) Secuencia de aminoácidos del ORF de SH de MPV, estando los restos de serina y trionina sombreados en gris, los restos de cisteína en negrita, y la región hidrófoba doblemente subrayada. Los sitios de glucosilación enlazados mediante N potenciales están subrayados una sola vez. Los números indican las posiciones de los aminoácidos básicos que flanquean el dominio hidrófobo. (B) Alineamiento de las gráficas de hidrofobia de las proteínas SH de MPV, APV-A y hRSV-B. Se usó el procedimiento de Kyte y Doolittle (1982) con una ventana de 17 aminoácidos. Las flechas indican un fuerte dominio hidrófobo. Las posiciones en el ORF se dan en el eje X.

30 Figura 14

35 Análisis de las secuencias de aminoácidos del ORF de G de MPV. (A) Secuencia de aminoácidos del ORF de G de MPV, estando los restos de serina, trionina y prolina sombreados en gris, el resto de cisteína está en negrita, y la región hidrófoba está doblemente subrayada. Los sitios de glucosilación enlazados mediante N potenciales están subrayados una sola vez. (B) Alineamiento de las gráficas de hidrofobia de las proteínas G de MPV, APV-A y hRSV-B. Se usó el procedimiento de Kyte y Doolittle (1982) con una ventana de 17 aminoácidos. Las flechas indican la región hidrófoba, y las posiciones en el ORF se dan en el eje X.

Figura 15

40 Comparación de las secuencias de aminoácidos de un dominio conservado del gen de polimerasa de MPV y otros para mixovirus. El dominio III se muestra con los cuatro motivos de polimerasa conservados (A, B, C, D) en el dominio III (Poch 1998, 1999) metido en caja.

Los saltos se representan mediante líneas discontinuas, y los puntos indican la posición de los restos de aminoácidos idénticos con respecto a MPV. hPIV3: virus de parainfluenza humana tipo 3; SV: virus sendai; hPIV-2: virus de parainfluenza humana tipo 2; NDV: virus de enfermedad de new castle; MV: virus del sarampión; nipah: virus nipah.

45 Figura 16:

50 Análisis filogenéticos de los ORFs de M2-1 y L de MPV y paramixovirus seleccionados. El ORF de M2-1 se alineó con los ORFs de M2-1 de otros miembros del género Pneumovirinae (A), y el ORF de L se alineó con los ORFs de L de los miembros del género pneumovirinae y otros paramixovirus seleccionados como se describe en las leyendas de la figura 15 (B). Los árboles filogenéticos se generaron mediante análisis de verosimilitud máxima usando 100 bootstraps y 3 salteados. La escala que representa el número de cambios nucleotídicos se muestra para cada árbol. Los números en los árboles representan los valores de bootstrap basándose en los árboles de consenso.

Figura 17:

5 Secuencias no codificantes del aislado 00-1 de hMPV. (A) Las secuencias no codificantes entre los ORFs y en los términos genómicos se muestran en el sentido positivo. De izquierda a derecha, se muestran los codones de parada de los ORFs indicados, seguido de las secuencias no codificantes las señales de partida del gen y codones de parada de los ORFs subsiguientes indicados. Los números indican la primera posición de los codones de partida y de parada en el mapa de hMPV. Las secuencias que presentan similitud con las señales de terminación del gen publicadas están subrayadas, y las secuencias que presentan similitud con UAAAAAU/A/C se representan con una línea encima de la secuencia. (B) Secuencias nucleotídicas de los términos genómicos de hMPV. Los términos genómicos de hMPV están alineados entre sí y con aquellos de APV. Las regiones subrayadas representan las secuencias de cebadores usadas en ensayos de RT-PCR que se basan en las secuencias de los extremos 3' y 5' de APV y RSV (Randhawa et al., 1997; Mink et al., 1991). Los nucleótidos en cursiva y en negrita son parte de la señal de partida del gen del gen N. Le: líder, Tr: rastreador.

Figura 18:

15 Comparación de dos aislados de hMPV prototípicos con APV-A y APV-C; matrices de similitud de ADN para ácidos nucleicos que codifican las diversas proteínas víricas.

Figura 19:

Comparación dos aislados de hMPV prototípicos con APV-A y APV-C; matrices de similitud de proteínas para las diversas proteínas víricas.

Figura 20:

20 Alineamiento de aminoácidos de la nucleoproteína de dos aislados de hMPV prototípicos

Figura 21:

Alineamiento de aminoácidos de la fosfoproteína de dos aislados de hMPV prototípicos

Figura 22:

Alineamiento de aminoácidos de la proteína de la matriz de dos aislados de hMPV prototípicos

25 Figura 23:

Alineamiento de aminoácidos de la proteína de fusión de dos aislados de hMPV prototípicos

Figura 24:

Alineamiento de aminoácidos de la proteína M2-1 de dos aislados de hMPV prototípicos

Figura 25:

30 Alineamiento de aminoácidos de la proteína M2-2 de dos aislados de hMPV prototípicos

Figura 26:

Alineamiento de aminoácidos de la proteína hidrófoba corta de dos aislados de hMPV prototípicos

Figura 27:

Alineamiento de aminoácidos de la glucoproteína de unión de dos aislados de hMPV prototípicos

35 Figura 28:

Alineamiento de aminoácidos del término N de la proteína de polimerasa de dos aislados de hMPV prototípicos

Figura 29: Resultados de los ensayos RT-PCR sobre torundas de garganta y nariz de 12 cobayas inoculados con ned/00/01 y/o ned/99/01.

40 Figura 30A: Respuesta de IgG frente a ned/00/01 y ned/99/01 para cobayas infectados con ned/00/01 y re infectados con ned/00/01 (GP 4, 5 y 6) o ned/99/01 (GP 1 y 3).

Figura 30B: Respuesta de IgG frente a ned/00/01 y ned/99/01 para cobayas infectados con ned/99/01 y re infectados con ned/00/01 (GP 8 y 9) o con ned/99/01 (GP 10, 11, 12).

45 Figura 31: Especificidad del ELISA de ned/00/01 y ned/99/01 ELISA sobre sueros tomados de cobayas infectados con ned/00/01 o ned/99/01.

Figura 32: Respuesta de IgG media frente a ELISA de ned/00/01 y ned/99/01 de 3 cobayas infectados homólogos (00-1/00-1), 2 cobayas infectados homólogos (99-1/99-1), 2 cobayas infectados heterólogos (99-1/00-1) y 2 cobayas infectados heterólogos (00-1/99-1).

Figura 33: Porcentaje medio de inhibición de APV de cobayas infectados con hMPV.

5 Figura 34: Títulos de neutralización vírica de cobayas infectados con ned/00/01 y ned/99/01 frente a ned/00/01, ned/99/01 y APV-C.

Figura 35: Resultados de ensayos de RT-PCR sobre tarugos de garganta de macacos cinomolgos inoculados (dos veces) con ned/00/01.

Figura 36A (los dos paneles superiores):

10 Respuesta IgA, IgM e IgG frente a ned/00/01 de 2 macacos cinomolgos (re)infectados con ned/00/01.

Figura 36B (paneles inferiores).

Respuesta de IgG frente a APV de 2 macacos cinomolgos infectados con ned/00/01.

Figura 37: Comparación del uso de ELISA de hMPV y el ELISA de la inhibición de APV para la detección de anticuerpos IgG en sueros humanos.

15 Descripción detallada

Aislamiento y caracterización del virus

Desde 1980 hasta 2000 se encontraron 28 aislados víricos sin identificar procedentes de pacientes con enfermedad respiratoria grave. Estos 28 aislados víricos sin identificar crecieron lentamente en células tMK, pobremente en células VERO y células A549, y no se pudieron propagar, o se propagaron muy poco, en células de fibroblastos embrionarios de pollo o MDCK. La mayoría de estos aislados víricos indujo CPE después de tres pasadas sobre células tMK, entre el décimo día y el décimo cuarto. El CPE fue virtualmente indistinguible del provocado por hRSV o hPIV en cultivos de células tMK u otras células, caracterizado por formación de sincitio, después de lo cual las células mostraron una interrupción interna rápida, seguido de la separación de las células de la monocapa. Las células presentaron habitualmente (algunas veces más tarde) CPE después de tres pasadas de virus de material original, en el día 10 a 14 después de la inoculación, en cierto modo más tarde que el CPE provocado por otros virus tales como hRSV o hPIV.

Se usaron los sobrenadantes de células tMK infectadas para el análisis de EM, que reveló la presencia de partículas víricas semejantes a paramixovirus que oscilan desde 150 a 600 nanómetros, con proyecciones de cubierta cortas que oscilan de 13 a 17 nanómetros. Consistente con las propiedades bioquímicas de los virus con cubierta, tales como los *Paramyxoviridae*, el tratamiento⁸ con cloroformo o éter estándar dio como resultado una reducción de TCID₅₀ >10⁴ de la infectividad para células tMK. Los sobrenadantes de cultivos de células tMK infectados con virus no presentaron actividad hemoaglutinante con eritrocitos de pavo, pollo y cobaya. Durante el cultivo, la replicación del virus pareció depender de tripsina en las células ensayadas. Estos datos virológicos combinados permitieron que el nuevo virus identificado se clasificase taxonómicamente como un miembro de la familia *Paramyxoviridae*.

35 Se aisló ARN de células tMK infectadas con 15 de los aislados víricos sin identificar para los análisis de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) usando conjuntos de cebadores específicos para *Paramyxovirinae*⁹, hPIV 1-4, virus sedai, virus de simio tipo 5, virus de la enfermedad de New-Castle, hRSV, morbilivirus, paperas, virus de Nipah, Hendra, Tupaia y Mapuera. Los ensayos de RT-PCR se llevaron a cabo a baja restricción, a fin de detectar virus potencialmente relacionados, y se usaron como controles ARN aislado de lotes víricos homólogos. Mientras que los controles disponibles reaccionaron positivamente con los cebadores específicos de virus respectivos, los aislados víricos recientemente identificados no reaccionaron con ningún conjunto de cebadores, indicando que el virus no estaba estrechamente relacionado con los virus ensayados.

45 Se usaron dos de los sobrenadantes de cultivos de células tMK infectadas con virus para inocular cobayas y hurones intranasalmente. Los sueros se recogieron de estos animales en el día cero, dos semanas y tres semanas después de la inoculación. Los animales no presentaron síntomas clínicos, pero todos se seroconvirtieron según se midió en ensayos de neutralización vírica (VN) e IFA indirecto contra los virus homólogos. Los sueros no reaccionaron en IFA indirecto con ninguno de los paramixovirus conocidos descritos anteriormente ni con PVM. A continuación, se cribaron los aislados víricos sin identificar hasta ahora usando los sueros pre- y post infección de cobayas y hurones, de los cuales 28 fueron claramente positivos mediante IFA indirecto con los sueros post infección, sugiriendo que estaban serológicamente relacionados de forma estrecha, o eran idénticos.

RAP PCR

Para obtener la información de secuencias en los aislados víricos desconocidos, se usó una estrategia de amplificación mediante PCR al azar conocida como RAP-PCR¹⁰. Para este fin, las células tMK se infectaron con uno

de los aislados víricos (aislado 00-1) así como hPIV-1, que sirvió como control. Después de que ambos cultivos presentaron niveles similares de CPE, el virus en los sobrenadantes de cultivo se purificaron en gradientes continuos de sacarosa de 20-60%. Las fracciones de los gradientes se inspeccionaron en busca de partículas de tipo vírico mediante EM, y se aisló ARN de la fracción que contiene aproximadamente 50% de sacarosa, en la que se observaron nucleocápsides. Se usaron cantidades equivalentes de ARN aislado de ambas fracciones víricas para la RAP-PCR, después de lo cual las muestras se hicieron pasar lado a lado en un gel de agarosa NuSieve al 3%. Subsiguientemente se purificaron del gel veinte bandas presentadas diferencialmente, específicas para el virus sin identificar, se cloraron en el plásmido pCR2.1 (Invitrogen) y se secuenciaron con cebadores específicos de vectores. Cuando se usaron estas secuencias para buscar homologías frente a secuencias en la base de datos Genbank usando el software BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), 10 de 20 fragmentos presentaron semejanza con las secuencias de APV/TRTV.

Estos 10 fragmentos se localizaron en los genes que codifican la nucleoproteína (N; fragmento 1 y 2), la proteína de la matriz (M; fragmento 3), la proteína de fusión (F; fragmento 4, 5, 6, 7) y la proteína de la polimerasa (L; fragmento 8, 9, 10) (Fig.2). A continuación se diseñaron cebadores de PCR para completar la información de secuencia para el extremo 3' del genoma vírico basado en nuestros fragmentos de RAP PCR así como las secuencias líder y trazadoras publicadas para los *Pneumovirinae*⁶. Se amplificaron tres fragmentos, de los cuales el fragmento A abarcó el extremo 3' del marco de lectura abierto (ORF) de N, el fragmento B abarcó el ORF de la fosfoproteína (P), y el fragmento C cerró el salto entre los ORFs de M y F (Fig. 2). Los análisis de secuencias de estos tres fragmentos reveló la ausencia de ORFs de NS1 y NS2 en el extremo 3' del genoma vírico y la colocación del ORF de F inmediatamente adyacente al ORF de M. Esta organización genómica se asemeja a la del metapneumovirus APV, que es también consistente con la homología de secuencia. En conjunto, las secuencias traducidas para los ORFs de N, P, M y F mostraron una media de 30-33% de homología con los miembros del género *Pneumovirus*, y 66-68% con los miembros del género *Metapneumovirus*. Para los ORFs de SH y G no se encontró homología discernible con los miembros de ninguno de los géneros. Las homologías de aminoácidos encontradas para N mostró alrededor de 40% de homología con hRSV y 88% con APV-C, su pariente genéticamente más próximo, como se puede deducir por ejemplo comparando la secuencia de aminoácidos de la figura 3 con la secuencia de aminoácidos de las proteínas N respectivas de otros virus. La secuencia de aminoácidos para P mostró una homología de alrededor de 25% con hRSV y alrededor de 66-68% con APV-C, M mostró alrededor de 36-39% con hRSV y alrededor de 87-89% con APV-C, F mostró alrededor de 40% de homología con hRSV y alrededor de 81% con APV-C, M2-1 mostró alrededor de 34-36% de homología con pneumovirus y 84-86 % con APV-C, M2-2 mostró 15-17% de homología con pneumovirus y 56% con APV-C, y los fragmentos obtenidos en L mostraron una media de 44% con pneumovirus y 64% con APV-C.

Filogenia

Aunque las búsquedas de BLAST usando secuencias nucleotídicas obtenidas del aislado vírico sin identificar revelaron homologías principalmente con miembros de *Pneumovirinae*, las homologías basadas en secuencias proteicas revelaron cierta semejanza con otros paramixovirus igualmente (datos no mostrados). Como indicación para la relación entre el aislado vírico recientemente identificado y los miembros de la *Pneumovirinae*, se construyeron árboles filogenéticos basándose en los ORFs de N, P, M y F de estos virus. En los cuatro árboles filogenéticos, el aislado vírico recientemente identificado estaba muy estrechamente relacionado con APV (Fig. 4). De los cuatro serotipos de APV que se han descrito¹¹, APV serotipo C, el metapneumovirus encontrado principalmente en pájaros en los Estados Unidos de América, mostró la semejanza más estrecha con el virus recientemente identificado. Sin embargo, se debería señalar que sólo está disponible la información de secuencia parcial para el serotipo D de APV.

Para determinar la relación de nuestros diversos aislados víricos recientemente identificados, se construyeron árboles filogenéticos basándose en la información de secuencia obtenida a partir de ocho a nueve aislados (8 para F, 9 para N, M y L). Para este fin, se usó RT-PCR con cebadores diseñados para amplificar fragmentos cortos en los ORFs de N, M, F y L, que subsiguientemente se secuenciaron directamente. Los nueve aislados víricos que se encontraron previamente que estaban relacionados en términos serológicos (véase anteriormente) también se encontraron genéticamente relacionados de forma muy estrecha. De hecho, los nueve aislados estaban más estrechamente relacionados entre sí que con APV. Aunque la información de secuencia usada para estos árboles filogenéticos fue limitada, parece que los nueve aislados se pueden dividir en dos grupos, agrupándose el aislado 94-1, 99-1 y 99-2 en un grupo y los otros seis aislados (94-2; 93-1; 93-2; 93-3; 93-4; 00-1) en el otro (Fig.5).

Seroprevalencia

Para estudiar la seroprevalencia de este virus en la población humana, se ensayaron sueros de seres humanos en diferentes categorías de edad mediante IFA indirecto usando células tMK infectadas con uno de los aislados víricos sin identificar. Este análisis reveló que el 25% de los niños entre seis y doce meses tuvieron anticuerpos frente al virus, y hacia la edad de cinco, casi el 100% de los niños fueron seropositivos. En total, 56 muestras de suero ensayadas mediante IFA indirecto se ensayaron mediante ensayo de VN. Para 51 (91%) de las muestras, los resultados del ensayo de VN (título >8) coincidieron con los resultados obtenidos con IFA indirecto (título >32). Cuatro muestras que se encontraron positivas en IFA fueron negativas mediante el ensayo de VN (título <8), mientras que un suero reaccionó negativamente en IFA (título <32) y positivo en el ensayo de VN (título 16) (tabla 2).

IFA conducido con 72 sueros tomados de seres humanos en 1958 (oscilando las edades de 8-99 años)^{12,27} reveló una prevalencia de 100%, indicando que el virus ha estado circulando en la población humana durante más de 40 años. Además, se usó un número de estos sueros en los ensayos de VN para confirmar los datos de IFA (tabla 2).

5 Los análisis genéticos de los genes N, M, P y F revelaron que MPV tiene una mayor homología de secuencia con el género recientemente propuesto *Metapneumovirinae* (media de 63 %) en comparación con el género *Pneumovirinae* (media de 30 %), y de este modo demuestran una organización genómica similar a y que se asemeja a la de APV/TRTV. En contraste con la organización genómica de los RSVs (3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'), los metapneumovirus carecen de los genes NS1 y NS2, y tienen una colocación diferente de los genes entre M y L (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'). La falta de los ORFs entre los genes M y F en nuestros aislados víricos, y la falta de NS1 y NS2 adyacentes a N, y la elevada homología de las secuencias de aminoácidos encontrada con APV son las razones para proponer la clasificación de MPV aislado de seres humanos como un primer miembro del género *Metapneumovirus* de mamífero, en particular de origen humano.

15 Los análisis filogenéticos revelaron que los nueve aislados de MPV a partir de los cuales se obtuvo la información de secuencia estaban estrechamente relacionados. Aunque la información de secuencia estaba limitado, estaban de hecho más estrechamente relacionados entre sí que con cualquiera de los metapneumovirus aviares. De los cuatro serotipos de APV que se han descrito, el serotipo C fue el más estrechamente relacionado con MPV basado en los genes N, P, M y F. Sin embargo, se debería observar que, para el serotipo D, sólo estuvieron disponibles las secuencias parciales para el gen F a partir de Genbank, y para el serotipo B solo estuvieron disponibles las secuencias de M, N, y F. Nuestros aislados de MPV formaron dos agrupamientos en los árboles filogenéticos. Tanto para hRSV como para APV se han descrito diferentes subtipos genéticos y serológicos. Actualmente sigue siendo desconocido si los dos grupos genéticos de aislados de MPV representan subgrupos serológicos que también son funcionalmente diferentes. Nuestros estudios serológicos mostraron que MPV es un patógeno humano habitual. El aislamiento repetido de este virus a partir de muestras clínicas de niños con RTI grave indica que el impacto clínico y económico de MPV puede ser elevado. Nuevos ensayos de diagnóstico basados en la detección vírica y en la serología permitirán un análisis más detallado de la incidencia e impacto clínico y económico de este patógeno vírico.

20 Las ligeras diferencias entre los resultados de IFA y de VN (5 muestras) pueden ser debidas al hecho de que, en el IFA, sólo se detectaron anticuerpos séricos IgG, mientras que el ensayo de VN detecta tanto las clases como subclases de anticuerpos, o las diferencias pueden ser debidas a las diferencias en la sensibilidad entre ambos ensayos. Para IFA, se usa un valor de corte de 16, mientras que para VN se usa un valor de corte de 8.

25 Por otro lado, las diferencias entre el ensayo de IFA frente al de VN también pueden indicar posibles diferencias entre serotipos diferentes de este virus recientemente identificado. Puesto que MPV parece relacionado muy estrechamente con APV, se teoriza de que el virus humano se puede haber originado a partir de pájaros. El análisis de muestras de suero tomadas de seres humanos en 1958 reveló que MPV ha estado extendido ampliamente en la población humana durante más de 40 años, indicando que ha debido de producirse un suceso de zoonosis tentativo antes de 1958.

Materiales y métodos

Recogida de muestras

40 Durante las últimas décadas, nuestro laboratorio ha recogido aspirados nasofaríngeos de niños que sufren RTI, que se ensayan de manera habitual para determinar la presencia de virus. Todos los aspirados nasofaríngeos se ensayaron mediante ensayos de inmunofluorescencia directa (DIF) usando anticuerpos marcados con fluorescencia frente a los tipos A y B del virus de la gripe, hRSV, y los tipos 1 a 3 del virus de parainfluenza humano (hPIV). Los aspirados nasofaríngeos también se procesaron para el aislamiento de virus usando técnicas¹⁴ de viales de corteza rápidas sobre diversas extirpes, incluyendo células VERO, células de riñón de mono cinomolgo terciarias (tMK), células de pulmón endotelial humano (HEL) y células de riñón de marbin dock (MDCK). Las muestras que muestran efectos citopáticos (CPE) después de dos a tres pasadas, que fueron negativas en DIF, se ensayaron mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFA) usando anticuerpos específicos de virus frente a los tipos A, B y C del virus de la gripe, a los tipos A y B de hRSV, al virus del sarampión, al virus de las paperas, a los tipos 1 y 4 del virus de parainfluenza humano (hPIV), al virus sendai, al virus de simio tipo 5, y al virus de la enfermedad de New-Castle. Aunque para muchos casos se pudo identificar el agente etiológico, algunas muestras fueron negativas para todos estos virus ensayados.

Ensayo de inmunofluorescencia directa (DIF)

55 Se usaron muestras de aspirados nasofaríngeos procedentes de pacientes que sufren RTI para el DIF y el aislamiento vírico como se describe^{14,15}. Las muestras se almacenaron a -70°C. De forma breve, los aspirados nasofaríngeos se diluyeron con 5 ml de MEM de Dulbecco (BioWhittaker, Walkersville, MD) y se mezclaron a conciencia en una mezcladora de remolino durante un minuto. La suspensión se centrifugó de este modo durante diez minutos a 840 x g. El sedimento se extendió sobre un portaobjetos de múltiples puntos (Nutacon, Leimuiden, Países Bajos), y el sobrenadante se usó para el aislamiento vírico. Después de secar, las células se fijaron en

acetona durante 1 minuto a temperatura ambiente. Después de lavar, los portaobjetos se lavaron durante 15 minutos a 37°C con antisueros específicos de virus marcados con FITC comercialmente disponible, tales como gripe A y B, hRSV y hPIV 1 a 3 (Dako, Glostrup, Dinamarca). Después de tres lavados en PBS y un lavado en agua del grifo, los portaobjetos se incluyeron en una disolución de glicerol/PBS (Citifluor, UKC, Canterbury, UK), y se cubrieron. Los portaobjetos se analizaron usando un microscopio de fluorescencia Axioscop (Carl Zeiss B.V, Weesp, Países Bajos).

Aislamiento vírico

Para el aislamiento vírico, se cultivaron células tMK (RIVM, Bilthoven, Países Bajos) en placas de 24 pocillos que contienen portaobjetos de vidrio (Costar, Cambridge, UK), con el medio descrito más abajo suplementado con 10% de suero fetal bovino (BioWhittaker, Vervier, Bélgica). Antes de la inoculación, las placas se lavaron con PBS y se suministraron con MEM de Eagle con sal de Hank (ICN, Costa mesa, CA), cuya mitad de litro se suplementó con 0,26 gramos de NaHCO₃, 0,025 M de HEPES (Biowhittaker), 2 mM de L-glutamina (Biowhittaker), 100 unidades de penicilina, 100 µg de estreptomina (Biowhittaker), 0,5 gramos de lactalbúmina (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos), 1,0 gramos de D-glucosa (Merck, Amsterdam, Países Bajos), 5,0 gramos de peptona (Oxoid, Haarlem, Países Bajos) y 0,02% de tripsina (Life Technologies, Bethesda, MD). Las placas se inocularon con sobrenadante de las muestras de aspirado nasofaríngeo, 0,2 ml por pocillo por triplicado, seguido de la centrifugación a 840 x g durante una hora. Tras la inoculación, las placas se incubaron a 37°C durante un máximo de 14 días, cambiando el medio una vez a la semana, y los cultivos se comprobaron diariamente en busca de CPE. Después 14 días, las células se rasparon de la segunda pasada y se incubaron 14 días. Esta etapa se repitió para la tercera pasada. Los portaobjetos de vidrio se usaron para demostrar la presencia del virus mediante IFA indirecta como se describe más abajo.

Inmunización animal

Se generaron antisueros específicos de hurones y de cobayas para el virus recientemente descubierto mediante infección intranasal experimental de dos hurones libres de patógenos específicos y dos cobayas, enjaulados en cajas de guantes a presión separadas. Dos a tres semanas más tarde, los animales se sangraron mediante punción cardíaca, y sus sueros se usaron como sueros de referencia. Los sueros se ensayaron para todos los virus descritos previamente con IFA indirecta como se describe más abajo.

Detección de antígeno mediante IFA indirecta

Se llevó a cabo IFA indirecta sobre portaobjetos que contienen células tMK infectadas. Después de lavar con PBS, los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos a 37°C con antisueros específicos de virus. Se usaron anticuerpos monoclonales en DIF frente a gripe A, B y C, hPIV tipo 1 a 3 y hRSV como se describe anteriormente. Para hPIV tipo 4, se usaron anticuerpos policlonales contra el virus de las paperas, virus del sarampión, virus de sendai, virus de simio tipo 5, virus de la enfermedad de New-Castle (RIVM) y sueros de referencia de cobayas y de hurones. Después de tres lavados con PBS y un lavado con agua corriente, los portaobjetos se tiñeron con anticuerpos secundarios dirigidos contra los sueros usados en la primera incubación. Los anticuerpos secundarios para los antisueros policlonales fueron antihurón de cabra (KPL, Guilford, UK, diluido 40 veces), anticonejo de ratón (Dako, Glostrup, Denmark, diluido 20 veces), antipollo de conejo KPL, dilución de 20 veces) y anticobaya de ratón (Dako, diluido 20 veces). Los portaobjetos se procesaron como se describe para DIF.

Detección de anticuerpos en seres humanos mediante IFA indirecta

Para la detección de anticuerpos específicos de virus, se fijaron células tMK infectadas con acetona fría sobre cubreobjetos, se lavaron con PBS y se tiñeron con muestras de suero a una dilución 1 a 16. Subsiguientemente, las muestras se tiñeron con anticuerpos anti-humano de conejo marcados con FITC, diluidos 80 veces en PBS (Dako). Los portaobjetos se procesaron como se describe anteriormente.

Cultivo vírico de MPV

Monocapas subconfluentes de células tMK en medios como se describe anteriormente se inocularon con sobrenadantes de muestras que presentaron CPE después de dos o tres pasadas en las placas de 24 pocillos. Los cultivos se comprobaron diariamente en busca de CPE, y el medio se cambió una vez a la semana. Puesto que CPE difirió para cada aislado, todos los cultivos se ensayaron en el día 12 a 14 con IFA indirecta usando anticuerpos de hurón frente al nuevo aislado vírico. Los cultivos positivos se congelaron y descongelaron tres veces, después de lo cual los sobrenadantes se aclararon mediante centrifugación a baja velocidad, se distribuyeron en alícuotas y se almacenaron congelados a -70°C. Las dosis infecciosas de cultivo tisular del 50% (TCID₅₀) de virus en los sobrenadantes de cultivo se determinaron como se describe¹⁶.

Ensayo de neutralización vírica.

Los ensayos de VN se llevaron a cabo con diluciones de dos veces en serie de sueros humanos y animales partiendo a una dilución de ocho veces. Los sueros diluidos se incubaron durante una hora con 100 TCID₅₀ de virus antes de la inoculación de las células tMK que se hicieron crecer en placas de 96 pocillos, después de lo cual las placas se centrifugaron a 840 x g. El medio se cambió después de tres y seis días, y el IFA se llevó a cabo con

anticuerpos de hurón contra MPV 8 días después de la inoculación. El título de VN se definió como la dilución más baja de la muestra de suero que da como resultado IFA negativo y una inhibición de CPE en cultivos celulares.

Caracterización vírica

5 Se llevaron a cabo ensayos de hemoaglutinación y ensayos de sensibilidad al cloroformo como se describe^{8,14}. Para los análisis de EM, el virus se concentró a partir de sobrenadantes de cultivo celular infectados en una microcentrifuga a 4°C a 17000 x g, después de lo cual el pelete se resuspendió en PBS y se inspección mediante EM de contraste negativo. Para RAP-PCR, el virus se concentró a partir de sobrenadantes de células tMK infectados mediante ultracentrifugación en 60% de disolución de sacarosa (2 horas a 150000 x g, 4°C). La interfase de sacarosa del 60% se diluyó subsiguientemente con PBS y se estratificó sobre la parte superior de un gradiente de sacarosa continuo de 20-60%, que se centrifugó durante 16 horas a 275000 x g a 4°C. Las fracciones de los gradientes de sacarosa se inspeccionaron en busca de la presencia de partículas similares a virus mediante EM y electroforesis en gel de poliacrilamida seguido de tinción con plata. Las fracciones de sacarosa de aproximadamente 10 50% que parecieron contener nucleocápsides se usaron para el aislamiento de ARN y para RAP-PCR.

Aislamiento de ARN

15 Se aisló ARN a partir del sobrenadante de cultivos de células infectadas o fracciones de gradientes de sacarosa usando un kit de aislamiento de ARN muy puro según las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos).

RT-PCR

20 Las secuencias oligonucleotídicas específicas de virus para ensayos de RT-PCR sobre paramixovirus conocidos se describen en la adenda 1. Se llevó a cabo una RT-PCR de una etapa en reacciones de 50 µl que contienen 50 mM de Tris.HCl pH 8,5, 50 mM de NaCl, 4 mM de MgCl₂, 2 mM ditiotretitol, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de ARNsin recombinante (Promega, Leiden, Países Bajos), 10 unidades de AMV RT (Promega, Leiden, Países Bajos), 5 unidades de Amplitaq Gold DNA polymerase (PE Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, Países Bajos) y 5 µl de ARN. Las condiciones de ciclación 45 min. a 42°C y 7 min. a 95°C una vez, 1 min. a 95°C, 2 min. a 42°C y 3 min. a 25 72°C repetido 40 veces, y 10 min. a 72°C una vez.

RAP-PCR

Se llevó a cabo RAP-PCR esencialmente como se describe¹⁰. Las secuencias oligonucleotídicas se describen en la adenda 2. Para la reacción de RT, se usaron 2 µl de ARN en una reacción de 10 µl que contiene 10 ng/µl de oligonucleótido, 10 mM de ditiotretitol, 500 µM de cada dNTP, 25 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl y 3 mM MgCl₂. La mezcla de reacción se incubó durante 5 min. a 70°C y 5 min. a 37°C, después de lo cual se añadieron 200 unidades de enzima Superscript RT (LifeTechnologies). La incubación a 37°C se continuó durante 55 min., y la reacción se terminó mediante una incubación durante 5 min. a 72°C. La mezcla de RT se diluyó para dar una reacción de PCR de 50 µl que contiene 8 ng/µl de oligonucleótido, 300 µM de cada dNTP, 15 mM de Tris-HCl pH 8,3, 65 mM de KCl, 3,0 mM de MgCl₂ y 5 unidades de Taq DNA polymerase (PE Biosystems). Las condiciones de ciclación fueron 5 min. a 94°C, 5 min. a 40°C y 1 min. a 72°C una vez, seguido de 1 min. a 94°C, 2 min. a 56°C y 1 min. a 72°C repetido 40 veces, y 5 min. a 72°C una vez. Después de RAP-PCR, se hicieron pasar lado a lado 15 µl de los productos de RT-PCR sobre un gel de agarosa NuSieve al 3% (FMC BioProducts, Heerhugowaard, Países Bajos). Los fragmentos presentados diferencialmente específicos para MPV se purificaron a partir del gel con Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen, Leusden, Países Bajos) y se clonaron en el vector pCR2.1 (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) según las instrucciones del fabricante.

Análisis de secuencia

Los productos de RAP-PCR clonados en el vector pCR2.1 (Invitrogen) se secuenciaron con oligonucleótidos específicos de M13. Los fragmentos de ADN obtenidos mediante RT-PCR se purificaron a partir de geles de agarosa usando Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen, Leusden, Países Bajos), y se secuenciaron directamente con los mismos oligonucleótidos usados para PCR. Los análisis de secuencia se llevaron a cabo usando un kit de secuenciación Dyanamic ET terminator sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, Países Bajos) y un secuenciador de ADN automático ABI 373 (PE Biosystem). Todas las técnicas se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante.

Generación de fragmentos genómicos de MPV mediante RT-PCR

50 Para generar fragmentos de PCR que abarcan los saltos A, B y C entre los fragmentos de RAP-PCR (Fig.2) se usaron los ensayos de RT-PCR como se describe anteriormente sobre ARN aislado de aislado vírico 00-1. Se usaron los siguientes cebadores:

Para el fragmento A: TR1 diseñado en el líder: (5'-AAAGAATTCACGAGAAAAAACGC-3') y N1 diseñado en el extremo 3' de los fragmentos RAP-PCR obtenidos en N (5'-CTGTGGTCTCTAGTCCCACTTC-3')

Para el fragmento B: N2 diseñado en el extremo 5' de los fragmentos de RAP-PCR obtenidos en N: (5'-CATGCAAGCTTATGGGGC-3') y M1 diseñado en el extremo 3' de los fragmentos de RAP-PCR obtenido en M: (5'-CAGAGTGGTTATTGTCCAGGGT-3').

5 Para el fragmento C: M2 diseñado en el extremo 5' del fragmento de RAP-PCR obtenido en M: (5'-GTAGAACTAGGAGCATATG-3') y F1 diseñado en el extremo 3' de los fragmentos de RAP-PCR obtenidos en F: (5'-TCCCAATGTAGATACTGCTTC-3').

Los fragmentos se purificaron a partir del gel, se clonaron y se secuenciaron como se describe anteriormente.

RT-PCR para diagnosticar MPV.

10 Para la amplificación y secuenciación de partes de los ORFs de N, M, F y L de nueve de los aislados de MPV, se usaron los cebadores N3 (5'-GCACTCAAGAGATACCCTAG -3') y N4 (5'-AGACTTTCTGCTTTGCTGCCTG-3'), amplificando un fragmento de 151 nucleótidos, M3 (5'-CCCTGACAATAACCACTCTG-3') y M4 (5'-GCCAACTGATTTGGCTGAGCTC-3') amplificando un fragmento de 252 nucleótidos, F7 (5'-TGCACTATCTCCTTTGGGGCTTTG-3') y F8 (5'-TCAAAGCTGCTTGACACTGGCC-3') amplificando un fragmento de 221 nucleótidos, y L6 (5'-CATGCCCACTATAAAAGGTCAG-3') y L7 (5'-CACCCCAGTCTTTCTTGGAAA-3')
15 amplificando un fragmento de 173 nucleótidos, respectivamente. La RT-PCR, la purificación en gel y la secuenciación directa se llevaron a cabo como se describe anteriormente. Además, las sondas usadas fueron:

Sonda usada en M: 5'-TGC TTG TAC TTC CCA AAG-3'

Sonda usada en N: 5'-TAT TTG AAC AAA AAG TGT-3'

Sonda usada en L: 5'-TGGTGTGGGATATTAACAG-3'

20 Análisis filogenéticos

Para todos los árboles filogenéticos, las secuencias de ADN se alinearon usando el paquete de software ClustalW y se generaron árboles de verosimilitud máxima usando el paquete de software DNA-ML del programa Phylip 3.5 usando 100 bootstraps y 3 salteados¹⁵. Las secuencias previamente publicadas que se usaron para la generación de árboles filogenéticos estuvieron disponibles de Genbank con los números de acceso: Para todos los ORFs: hRSV: NC001781; bRSV: NC001989; Para el ORF de F: PVM, D11128; APV-A, D00850; APV-B, Y14292; APV-C, AF187152; Para el ORF de N: PVM, D10331; APV-A, U39295; APV-B, U39296; APV-C, AF176590; Para el ORF de M: PMV, U66893; APV-A, X58639; APV-B, U37586; APV-C, AF262571; Para el ORF de P: PVM, 09649; APV-A, U22110, APV-C, AF176591. Los análisis filogenéticos para los nueve aislados víricos diferentes de MPV se llevaron a cabo con la cepa C de APV como grupo externo.

30 Abreviaturas usadas en las figuras: hRSV: RSV humano; bRSV: RSV bovino; PVM: virus de la neumonía de ratones; APV-A, B, y C: pneumovirus aviar tipo A, B y C.

Ejemplos de métodos para identificar MPV

Recogida de muestras

35 A fin de encontrar aislados víricos, se deberían examinar aspirados nasofaríngeos, por ondas de garganta y nasales, lavados broncoalveolares preferiblemente de mamíferos tales como humanos, carnívoros (perros, gatos, mustélidos, focas, etc.), caballos, rumiantes (ganado vacuno, ovejas, cabras, etc.), cerdos, conejos, pájaros (aves de corral, avestruces, etc.). De los pájaros se pueden examinar igualmente torundas de cloacas y goteos. Los sueros se deberían de recoger de ensayos inmunológicos, tales como ELISA y ensayos de neutralización vírica.

40 Las muestras víricas recogidas se diluyeron con 5 ml de medio MEM de Dulbecco (BioWhittaker, Walkersville, MD) y se mezclaron a conciencia en una mezcladora de remolino durante un minuto. La suspensión se centrifugó así durante diez minutos a 840 x g. El sedimento se extendió sobre un portaobjetos de múltiples puntos (Nutacon, Leimuiden, Países Bajos) para técnicas de inmunofluorescencia, y el sobrenadante se usó para el aislamiento vírico.

Aislamiento vírico

45 Para el aislamiento vírico, se cultivaron células tMK (RIVM, Bilthoven, Países Bajos) en placas de 24 pocillos que contienen portaobjetos de vidrio (Costar, Cambridge, UK), con el medio descrito más abajo suplementado con 10% de suero fetal bovino (BioWhittaker, Vervier, Bélgica). Antes de la inoculación, las placas se lavaron con PBS y se suministraron con MEM de Eagle con sal de Hank (ICN, Costa mesa, CA) suplementado con 0,52 gramos/litro de NaHCO₃, 0,025 M de Hepes (Biowhittaker), 2 mM de L-glutamina (Biowhittaker), 200 unidades/litro de penicilina, 200 µg/litro de estreptomina (Biowhittaker), 1 gramo/litro de lactalbúmina (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos), 2,0 gramos/litro de D-glucosa (Merck, Amsterdam, Países Bajos), 10 gramos/litro de peptona (Oxoid, Haarlem, Países Bajos) y 0,02% de tripsina (Life Technologies, Bethesda, MD). Las placas se inocularon con sobrenadante de las muestras de aspirados nasofaríngeos, 0,2 ml por pocillo por triplicado, seguido de la centrifugación a 840 x g durante una hora. Tras la inoculación, las placas se incubaron a 37°C durante un máximo de 14, cambiando el medio

una vez a la semana, y los cultivos se comprobaron diariamente en busca de CPE. Después de 14 días, las células se rasparon a partir de la segunda pasada y se incubaron durante otros 14 días. Esta etapa se repitió para la tercera pasada. Los portaobjetos de vidrio se usaron para demostrar la presencia del virus mediante IFA indirecta como se describe más abajo.

5 Se observó generalmente CPE después de la tercera pasada, en el día 8 a 14 dependiendo del aislado. El CPE fue virtualmente indistinguible del provocado por hRSV o hPIV en tMK u otros cultivos celulares. Sin embargo, hRSV induce CPE a partir de alrededor de día 4. El CPE se caracteriza por formación de sincitios, después de lo cual las células muestran una interrupción interna rápida, seguido de la desunión de las células de la monocapa. Para algunos aislados, el CPE fue difícil de observar, y se usó IFA para confirmar la presencia del virus en estos cultivos.

10 Cultivo vírico de MPV

Monocapas subconfluentes de células tMK en medios como se describe anteriormente se inocularon con sobrenadantes de muestras que presentaron CPE después de dos o tres pasadas en las placas de 24 pocillos. Los cultivos se comprobaron en busca de CPE diariamente, y el medio se cambió una vez a la semana. Puesto que CPE fue diferente para cada aislado, todos los cultivos se ensayaron en el día 12 a 14 con IFA indirecta usando anticuerpos de hurón frente al nuevo aislado vírico. Los cultivos positivos se congelaron y descongelaron tres veces, después de lo cual los sobrenadantes se aclararon mediante centrifugación de baja velocidad se distribuyeron en alícuotas y se almacenaron congelados a -70°C. Las dosis infecciones de cultivo tisular de 50% (TCID₅₀) de virus en los sobrenadantes de cultivo se determinaron siguiendo técnicas establecidas usadas en el campo¹⁶.

Caracterización vírica

20 Se llevaron a cabo ensayos de hemoaglutinación y ensayos de sensibilidad al cloroformo siguiendo técnicas bien establecidas y descritas usadas en el campo¹⁴. para los análisis de EM, el virus se concentró a partir de sobrenadantes de cultivos celulares infectados en una microcentrifuga a 4°C a 17000 x g, después de lo cual el pelete se resuspendió en PBS y se inspeccionó mediante EM de contraste negativo.

Detección de antígeno mediante IFA indirecta.

25 Las muestras recogidas se procesaron como se describe, y el sedimento de las muestras se extiende sobre un portaobjetos de múltiples puntos. Después de secar, las células se fijaron en acetona durante 1 minuto a temperatura ambiente.

30 Como alternativa, el virus se cultivó en células tMK en portaobjetos de 24 pocillos que contienen portaobjetos de vidrio. Estos portaobjetos de vidrio se lavaron con PBS y se fijaron en acetona durante 1 minuto a temperatura ambiente.

35 Tras lavar con PBS, los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos a 37°C con anticuerpos policlonales a una dilución de 1:50 a 1:100 en PBS, se usaron hurones y cobayas inmunizados para obtener anticuerpos policlonales, pero estos anticuerpos se pueden provocar en diversos animales, y la dilución de trabajo del anticuerpo policlonal puede variar para cada inmunización. Después de tres lavados con PBS y un lavado con agua del grifo, los portaobjetos se incubaron a 37°C durante 30 minutos con anticuerpos anti-hurón de cabra marcados con FITC (KPL, Guilford, UK, diluido 40 veces). Después de tres lavados en PBS y un lavado en agua corriente, los portaobjetos se incluyeron en una disolución de glicerol/PBS (Citifluor, UKC, Canterbury, UK) y se cubrieron. Los portaobjetos se analizaron usando un microscopio de fluorescencia Axioscop (Carl Zeiss B.V., Weesp, Países Bajos).

Detección de anticuerpos en seres humanos, mamíferos, rumiantes u otros animales mediante IFA indirecta

40 Para la detección de anticuerpos específicos de virus, células tMK infectadas con MPV se fijaron con acetona sobre cubreobjetos (como se describe anteriormente), se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 minutos a 37°C con muestras de suero a una dilución 1 a 16. Después de dos lavados con PBS y un lavado con agua del grifo, los portaobjetos se incubaron 30 minutos a 37°C con anticuerpos secundarios marcados con FITC para las especies usadas (Dako). Los portaobjetos se procesaron como se describe anteriormente.

45 Los anticuerpos se pueden marcar directamente con un colorante fluorescente, que dará como resultado un ensayo de fluorescencia inmune directa. El FITC se puede sustituir por cualquier colorante fluorescente.

Inmunización de animales

50 Se generaron antisueros específicos de hurones y de cobayas para el virus recientemente descubierto mediante infección intranasal experimental de dos hurones libres de patógenos específicos y dos cobayas, enjaulados en cajas de guantes a presión separadas. Dos a tres semanas más tarde, los animales se sangraron mediante punción cardíaca, y sus sueros se usaron como sueros de referencia. Los sueros se ensayaron para todos los virus descritos previos con IFA indirecta como se describe más abajo. También son posibles otras especies de animales para la generación de preparaciones de anticuerpos específicos, y se pueden usar otras preparaciones antigénicas.

Ensayo de neutralización vírica (ensayo VN)

5 Se llevaron a cabo ensayos de VN con diluciones de dos veces en serie de sueros humanos y animales partiendo de una dilución de ocho veces. Los sueros diluidos se incubaron durante una hora con 100 TCID₅₀ de virus antes de la inoculación de células tMK que se hicieron crecer en placas de 96 pocillos, después de lo cual las placas se centrifugaron a 840 x g. Se usó el mismo medio de cultivo como se describe anteriormente. El medio se cambió después de tres y seis días, y se llevó a cabo IFA después de 8 días (véase anteriormente). El título de VN se definió como la dilución más baja de la muestra sérica que da como resultado un IFA negativo y la inhibición de CPE en cultivos celulares.

Aislamiento de ARN

10 Se aisló ARN del sobrenadante de cultivos celulares infectados o fracciones de gradientes de sacarosa usando un kit High Pure RNA Isolation según las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos). El ARN también se puede aislar siguiendo otros procedimientos conocidos en el campo (Current Protocols in Molecular Biology).

RT-PCR

15 Se llevó a cabo una RT-PCR de una etapa en reacciones de 50 µl que contienen 50 mM de Tris.HCl pH 8,5, 50 mM NaCl, 4 mM de MgCl₂, 2 mM ditiotretitol, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de RNAsin recombinante (Promega, Leiden, Países Bajos), 10 unidades de AMV RT (Promega, Leiden, Países Bajos), 5 unidades de Amplitaq Gold DNA polymerase (PE Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, Países Bajos) y 5 µl de ARN. Las condiciones de ciclación fueron 45 min. a 42°C y 7 min. a 95°C una vez, 1 min a 95°C, 2 min. a 42°C y 3 min. a 72°C repetido 40 veces, y 10 min. a 72°C una vez.

20 Los cebadores usados para el PCR de diagnóstico:

En la nucleoproteína: N3 (5'-GCACTCAAGAGATACCCTAG -3') y N4 (5'-AGACTTTCTGCTTTGCTGCCTG-3'), que amplifica un fragmento de 151 nucleótidos.

En la matriz de la proteína: M3 (5'-CCCTGACAATAACCACTCTG-3') y M4 (5'-GCCAACTGATTTGGCTGAGCTC-3'), que amplifica un fragmento de 252 nucleótidos.

25 En la proteína de polimerasa: L6 (5'-CATGCCCACTATAAAAGGTCAG-3') y L7 (5'-CACCCCAGTCTTTCTTGAAA-3'), que amplifica un fragmento de 173 nucleótidos.

Se pueden diseñar otros cebadores basándose en las secuencias de MPV, y se pueden usar para fines específicos diferentes tampones y condiciones de ensayo.

Análisis de secuencia

30 Los análisis de secuencia se llevaron a cabo usando un kit de secuenciación terminador Dyenamic ET (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, Países Bajos) y un secuenciador de ADN automático ABI 373 (PE Biosystem). Todas las técnicas se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de PCR se secuenciaron directamente con los mismos oligonucleótidos usados para PCR, o los fragmentos se purificaron a partir del gel con Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen, Leusden, Países Bajos) y se clonaron en el vector pCR2.1 (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) según las instrucciones del fabricante, y se secuenciaron subsiguientemente con oligonucleótidos específicos de M13.

Oligonucleótidos usados para analizar el extremo 3' del genoma (ausencia de NS1 /NS2).

40 Se diseñó el cebador TR1 (5'-AAAGAATTCACGAGAAAAAACGC-3') basado en las secuencias publicadas del rastreador y líder para hRSV y APV, publicadas por Randhawa (1997), y se diseñó el cebador N1 (5'-CTGTGGTCTCTAGTCCCACTTC-3') basándose en las secuencias obtenidas en la proteína N. El ensayo de RT-PCR y la secuenciación se llevaron a cabo como se describió anteriormente.

La RT-PCR dio un producto de aproximadamente 500 pares de bases, que es demasiado pequeño para contener información para dos ORFS, y la traducción de estas secuencias no reveló un ORF.

Detección de anticuerpos en seres humanos, mamíferos, rumiantes u otros animales mediante ELISA

45 En *Paramyxoviridae*, la proteína N es la proteína más abundante, y la respuesta inmunitaria a esta proteína se produce tempranamente en la infección. Por estas razones, se usa preferiblemente una fuente recombinante de las proteínas N para desarrollar un ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos frente a MPV. Los antígenos adecuados para la detección de anticuerpos incluyen cualquier proteína de MPV que se combina con cualquier anticuerpo específico de MPV de un paciente expuesto a o infectado con el virus MPV. Los antígenos preferidos de la invención incluyen aquellos que engendran predominantemente la respuesta inmunitaria en pacientes expuestos a MPV, que por lo tanto son reconocidos típicamente de forma más fácil por los anticuerpos de un paciente. Los antígenos particularmente preferidos incluyen las proteínas N, F y G de MPV.

Los antígenos usados para técnicas inmunológicas pueden ser antígenos nativos, o pueden ser versiones modificadas de los mismos. Se pueden usar técnicas bien conocidas de biología molecular para alterar la secuencia de aminoácidos de un antígeno de MPV para producir versiones modificadas del antígeno que se pueden usar en técnicas inmunológicas.

5 Los métodos para la clonación de genes, para manipular los genes para y a partir de vectores de expresión, y para expresar la proteína codificada por el gen en un hospedante heterólogo son conocidos, y estas técnicas se pueden usar para proporcionar los vectores de expresión, células hospedantes, y para expresar los genes clonados que codifican antígenos en un hospedante para producir antígenos recombinantes para uso en ensayos de diagnóstico. Véase, por ejemplo: Molecular cloning, A laboratory manual y Current Protocols in Molecular Biology.

10 Se puede usar una variedad de sistemas de expresión para producir antígenos de MPV. Por ejemplo, se ha descrito una variedad de vectores de expresión adecuados para producir en *E. Coli*, *B. subtilis*, levadura, células de insectos y células de mamíferos, cualquiera de los cuales se puede usar para producir un antígeno de MPV adecuado para detectar anticuerpos anti-MPV en pacientes expuestos.

15 El sistema de expresión baculovírico tiene la ventaja de proporcionar el procesamiento necesario de las proteínas, y por lo tanto es preferido. El sistema utiliza el promotor de polihedrina para dirigir la expresión de antígenos de MPV (Matsuura et al. 1987, J.Gen.Virol. 68: 1233-1250).

20 Los antígenos producidos mediante baculovirus recombinantes se pueden usar en una variedad de ensayos inmunológicos para detectar anticuerpos anti-MPV en un paciente. Está bien establecido que los antígenos recombinantes se pueden usar en lugar de virus naturales en prácticamente cualquier ensayo inmunológico para la detección de anticuerpos específicos de virus.

25 Los ensayos incluyen ensayos directos e indirectos, ensayos de sándwich, ensayos en fase sólida tales como aquellos que usan placas o perlas entre otros, y ensayos en fase líquida. Los ensayos adecuados incluyen aquellos que usan anticuerpos primarios y secundarios, y aquellos que usan reactivos de unión a anticuerpos tales como la proteína A. Además, en la invención se puede usar una variedad de métodos de detección, incluyendo métodos colorimétricos, fluorescentes, fosforescentes, quimioluminiscentes, luminiscentes y radioactivos.

Ejemplo 1 de EIA IgG anti-MPV indirecto usando proteína N recombinante

30 Se puede llevar a cabo un EIA de IgG indirecto usando una proteína N recombinante (producida con baculovirus recombinante en células de insecto (Sf9)). Para la preparación antigénica, se infectan células Sf9 con el baculovirus recombinante y se cosechan 3-7 días después de la infección. La suspensión celular se lava dos veces en PBS, pH 7,2, se ajusta hasta una densidad celular de $5,0 \times 10^6$ células/ml, y se congela y descongela tres veces. El deshecho celular grande se peletiza mediante centrifugación a baja velocidad ($500 \times g$ durante 15 min.), y el sobrenadante se recoge y se almacena a -70°C hasta el uso. Las células no infectadas se procesan de forma similar para el antígeno de control negativo.

35 Se usan 100 μl de un lisado congelado-descongelado para revestir placas de microtitulación, a diluciones que oscilan de 1:50 a 1:1000. Se experimenta un lisado celular no infectado en pocillos duplicados y sirve como control negativo. Tras la incubación toda la noche, las placas se lavan dos veces con PBS/0,05% de Tween. Los sueros de ensayo se diluyen 1:50 a 1:200 en tampón de ELISA (PBS, suplementado hasta 2% con suero de cabra normal, y con 0,5% de seroalbúmina bovina y 0,1% de leche), seguido de la incubación de pocillos durante 1 hora a 37°C .

40 Las placas se lavan dos veces con PBS/0,05% de Tween. IgG anti-humano (o frente a otra especie) de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante, diluido 1:3000 a 1:5000 en tampón de ELISA, añadido a pocillos e incubado durante 1 hora a 37°C . Las placas se lavan entonces dos veces con PBS/0,05% de Tween y una vez con agua corriente, se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente con el sustrato enzimático TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, tal como el obtenido de Sigma, y la reacción se detiene con 100 μl de ácido fosfórico 2M. Las lecturas colorimétricas se miden a 450 nm usando un lector de placas de microtitulación automatizada.

45 Ejemplo 2: EIA de IgM anti-MPV de captura usando una nucleoproteína recombinante.

Un EIA de IgM de captura que usa la nucleoproteína recombinante o cualquier otra proteína recombinante como antígeno se puede llevar a cabo mediante modificación de ensayos como se describen previamente por Erdman et al (1990) J.Clin.Microb. 29: 1466-1471.

50 Se añade anticuerpo de captura IgM anti-humano purificado por afinidad (o frente a otra especie), tal como el obtenido de Dako, a pocillos de una placa de microtitulación en una concentración de 250 ng por pocillo en tampón de carbonato 0,1 M pH 9,6. Después de la incubación toda la noche a temperatura ambiente, las placas se lavan dos veces con PBS/0,05% de Tween. Se añaden 100 μl de suero de ensayo diluido 1:200 a 1:1000 en tampón de ELISA a pocillos triplicados, y se incuban durante 1 hora a 37°C . Las placas se lavan entonces dos veces en PBS/0,05% de Tween.

El lisado de células Sf21 congelado-descongelado (infectado con virus recombinante) se diluye 1:100 a 1:500 en tampón de ELISA y se añade a los pocillos y se incuba durante 2 horas a 37°C. El lisado celular no infectado sirve como control negativo y se usa en pocillos duplicados.

5 Las placas se lavan entonces tres veces en PBS/0,05% de Tween y se incuban durante 1 hora a 37°C con 100 µl de anticuerpo policlonal frente a MPV en una dilución óptima en tampón de ELISA. Después de 2 lavados con PBS/0,05% de Tween, las placas se incuban con anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante (tal como anti-hurón de conejo), y las placas se incuban 20 minutos a 37°C.

10 Las placas se lavan entonces cinco veces en PBS/0,05% de Tween, se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente con el sustrato enzimático TMB, 3,3',5,5' tetrametilbencidina, como se obtiene por ejemplo de "Sigma", y la reacción se detiene con 100 µl de ácido fosfórico 2M. Las lecturas colorimétricas se miden a 450 nm usando un lector de placas de microtitulación automatizado.

15 Las sensibilidades de los EIAs de IgM de captura que usan la nucleoproteína recombinante (u otra proteína recombinante) y el virus completo de MPV se comparan usando pares de suero de fase aguda y coalescente procedentes de personas con infección clínica con el virus de MPV. La especificidad del EIA de captura de la nucleoproteína recombinante se determina ensayando especímenes de suero de personas sanas y personas con otras infecciones con paramixovirus.

Potencial para EIAs para usar proteínas de fusión de MPV recombinantes y de glucoproteínas producidas por la expresión de baculovirus.

20 Las glucoproteínas G y F son las dos glucoproteínas de cubierta transmembranas del virión de MPV, y representan los antígenos de neutralización y protectores principales. La expresión de estas glucoproteínas en un sistema vírico de vector tal como un sistema de baculovirus proporciona una fuente de antígenos recombinantes para uso en ensayos para la detección de anticuerpos específicos de MPV. Además, su uso en combinación con la nucleoproteína, por ejemplo, potencia además la sensibilidad de los inmunoensayos enzimáticos en la detección de anticuerpos contra MPV.

25 Como métodos alternativos a los descritos aquí, se puede usar una variedad de otros ensayos inmunológicos (*Current Protocols in Immunology*).

30 A fin de encontrar aislados víricos, se pueden examinar aspirados nasofaríngeos, torundas de garganta y nasales, lavados broncoalveolares y torundas de garganta, preferiblemente, pero sin limitarse a, seres humanos, carnívoros (perros, gatos, focas, etc.), caballos, rumiantes (ganado vacuno, ovejas, cabras, etc.), cerdos, conejos, pájaros (aves de corral, avestruces, etc.). De los pájaros, igualmente se pueden examinar las torundas de cloacas e intestinales y las gotas. Para todas las muestras, se puede llevar a cabo para la detección del virus técnicas de serología (detección de anticuerpos y de antígenos, etc.), de aislamiento de virus y de detección de ácidos nucleicos.

35 Los anticuerpos monoclonales se pueden generar inmunizando ratones (y otros animales) con MPV purificado o partes del mismo (proteínas, péptidos), y usando subsiguientemente tecnología de hibridoma establecida (*Current protocols in Immunology*). Como alternativa, para este fin se puede usar tecnología de presentación de fagos (*Current protocols in Immunology*). De forma similar, se pueden obtener anticuerpos policlonales a partir de seres humanos o animales infectados, o a partir de seres humanos o animales inmunizados (*Current protocols in Immunology*).

40 La detección de la presencia o ausencia de las proteínas NS1 y NS2 se puede llevar a cabo usando transferencia western, IFA, técnicas de inmunoprecipitación usando una variedad de preparaciones de anticuerpos. La detección de la presencia o ausencia de genes NS1 y NS2 o sus homólogos en aislados víricos se puede llevar a cabo usando PCR con los conjuntos de cebadores diseñados en base a los genes conocidos NS1 y/o NS2, así como con una variedad de técnicas de hibridación de ácidos nucleicos.

45 Para determinar si los genes NS1 y NS2 están presentes en el extremo 3' del genoma vírico, se puede llevar a cabo una PCR con cebadores específicos para este extremo 3' del genoma. En nuestro caso, se usó un cebador específico para la región no traducida de 3' del genoma vírico, y un cebador en el ORF de N. Se pueden diseñar otros cebadores para el mismo fin. La ausencia de los genes NS1/NS2 se revela mediante la longitud y/o secuencia nucleotídica del producto de la PCR. Se pueden usar cebadores específicos para los genes NS1 y/o NS2 en combinación con cebadores específicos para las otras partes del extremo 3' del genoma vírico (tales como la región no traducida o ORFs de N, M o F) para permitir una identificación positiva de la presencia de genes NS1 o NS2. Además de la PCR, se pueden usar para el mismo fin una variedad de técnicas tales como clonación molecular, hibridación de ácido nucleico.

Ejemplo 3: Diferentes serotipos/subgrupos de MPV

55 Se identifican dos agrupamientos genéticos potenciales mediante análisis de las secuencias nucleotídicas parciales en los ORFs de N, M, F y L de 9 aislados víricos. Se observó una identidad nucleotídica de 90 - 100% en un agrupamiento, y se observó una identidad de 81-88% entre los agrupamientos. La información de secuencia

obtenida en más aislados víricos confirmó la existencia de dos genotipos. El aislado vírico ned/00/01 como prototipo del agrupamiento A, y el aislado vírico ned/99/01 como prototipo del agrupamiento B se han usado en ensayos de neutralización cruzada para ensayar si los genotipos están relacionados con diferentes serotipos o subgrupos.

Resultados

5 Usando ensayos de RT-PCR con cebadores situados en el gen de polimerasa, se identificaron 30 aislados víricos adicionales a partir de muestras de aspirados nasofaríngeos. La información de secuencia de partes de los genes de polimerasa y de la matriz de estos nuevos aislados, junto con aquella de los 9 aislados previos, se usó para construir árboles filogenéticos (Figura 16). Los análisis de estos árboles confirmó la presencia de dos agrupamientos genéticos, con el aislado vírico ned/00/00-1 como el virus prototípico en el grupo A, y el aislado vírico ned/99/01 como el virus prototipo en el grupo B. La identidad de secuencia nucleotídica dentro de un grupo fue más de 92%, mientras que entre los agrupamientos la identidad fue 81-85%.

Se han usado aislados víricos ned/00/01 y ned/99/01 para inocular hurones para provocar antisueros específicos de virus. Estos antisueros se usaron en ensayos de neutralización vírica con ambos virus.

Tabla 3:

15 Títulos de neutralización vírica

	Aislado 00-1	Aislado 99-1
Presuero hurón A (00-1)	□2	□2
Hurón A 22 dpi (00-1)	64	□2
Presuero hurón B (99-1)	□2	□2
Hurón B 22 dpi (99-1)	4	64

Para el aislado 00-1 el título difiere 32 (64/2) veces

Para el aislado 99-1 el título difiere 16 (64/4) veces

20 Además, se han inoculado 6 cobayas con uno de los virus (ned/00/01 y ned/99/01). Los ensayos de RT-PCR en muestras de aspirados nasofaríngeos mostraron replicación vírica desde el día 2 hasta el día 10 después de la infección. En el día 70 después de la infección, los cobayas se expusieron al virus homólogo o al virus heterólogo, y para los cuatro casos se observó replicación vírica.

Tabla 4

	Infección primaria	Replicación vírica	Infección secundaria	Replicación vírica
Cobaya 1-3	00-1	2 de 3	99-1	1 de 2
Cobaya 4-6	00-1	3 de 3	00-1	1 de 3
Cobaya 7-9	99-1	3 de 3	00-1	2 de 2
Cobaya 10-12	99-1	3 de 3	99-1	1 de 3
nota: para la infección secundaria, los cobayas 2 y 9 ya no estaban allí.				

25 Los ensayos de neutralización vírica con antisueros tras la primera exposición mostraron esencialmente los mismos resultados que en los ensayos de VN llevados a cabo con los hurones (diferencia de > 16 veces en el título de VN).

Los resultados presentados en este ejemplo confirman la existencia de dos genotipos, que corresponden a dos serotipos de MPV, y muestran la posibilidad de infección repetida con virus heterólogo y homólogo.

Ejemplo 4: Determinación de secuencia adicional.

30 Este ejemplo describe el análisis posterior de las secuencias de los marcos de lectura abiertos (ORFs) de MPV y las secuencias intergénicas, así como las secuencias parciales de los términos genómicos.

Los análisis de secuencia de los genes de MPV de la nucleoproteína (N), de la fosfoproteína (P), de la proteína de la matriz (M) y de la proteína de fusión (F) revelaron el grado más elevado de homología de secuencia con APV serotipo C, el pneumovirus aviar encontrado principalmente en pájaros en los Estados Unidos de América. Estos análisis también revelaron la ausencia de proteínas no estructurales NS1 y NS2 en el extremo 3' del genoma vírico y la colocación de la proteína de fusión inmediatamente adyacente a la proteína de la matriz. Aquí se presentan las secuencias de los genes de la proteína 22K (M2), la pequeña proteína hidrófoba (SH), la proteína de unión (G) y la proteína de la polimerasa (L), las regiones intergénicas y la secuencia rastreadora. En combinación con las secuencias descritas previamente, las secuencias presentadas aquí completan la secuencia genómica de MPV, con la excepción de los 12-15 nucleótidos extremos de los términos genómicos, y establecen la organización genómica de MPV. Las comparaciones lado a lado de las secuencias del genoma de MPV con las de APV subtipo A, B y C, RSV subtipo A y B, PVM y otros paramixovirus, proporciona unas potentes pruebas para la clasificación de MPV en el género *Metapneumovirus*.

Resultados

Estrategia de secuencias

Se propagó el aislado 00-1 de MPV (van den Hoogen et al., 2001) en células de riñón de mono terciarias (tMK) y el ARN aislado del sobrenadante 3 semanas después de la inoculación se usó como molde para los análisis de RT-PCR. Los cebadores se diseñaron en base a la información de secuencia parcial disponible para MPV 00-1 (van den Hoogen et al., 2001) así como las secuencias líder y rastreadora de APV y RSV (Randhawa et al., 1997; Mink et al., 1991). Inicialmente, los fragmentos entre los productos obtenidos previamente, que oscilan en tamaño desde 500 pb a 5 Kb en longitud, se generaron mediante amplificación por RT-PCR y se secuenciaron directamente. Esta secuencia genómica se confirmó subsiguientemente generando una serie de fragmentos de RT-PCR solapantes que oscilan en tamaño desde 500 hasta 800 pb que representan todo el genoma de MPV. Para todos los fragmentos de PCR, ambas hebras se secuenciaron directamente para minimizar los errores de amplificación y de secuenciación. Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos se usaron para buscar homología con secuencias en la base de datos de Genbank usando el software BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Los nombres de las proteínas se asignaron a marcos de lectura abiertos (ORFs) basándose en la homología con genes víricos conocidos así como su localización en el genoma. Basándose en esta información, se construyó un mapa genómico para MPV (Figura 7). El genoma de MPV tiene una longitud de 13378 nucleótidos, y su organización es similar a la organización genómica de APV. A continuación se presenta una comparación entre los ORFs y las secuencias no codificantes de MPV y aquellas de otros paramixovirus, y discuten las similitudes y diferencias importantes.

El gen de nucleoproteína (N)

Como se muestra, el primer gen en el mapa genómico de MPV codifica una proteína de 394 aminoácidos (aa) y muestra una amplia homología con la proteína N de otros pneumovirus. La longitud del ORF de N es idéntica a la longitud del ORF de N de APV-C (Tabla 5), y es más pequeña que la de otros paramixovirus (Barr et al., 1991). El análisis de la secuencia de aminoácidos reveló la homología más elevada con APV-C (88%), y sólo 7-11% con otros paramixovirus (Tabla 6).

Barr et al (1991) identificaron 3 regiones de similitud entre los virus que pertenecen al orden *Mononegavirales*: A, B y C (Figura 8). Aunque las similitudes son las más elevadas dentro de la familia vírica, estas regiones están muy conservadas entre las familias víricas. En las tres regiones, MPV reveló un 97% de identidad de secuencias de aa con APV-C, 89% con APV-B, 92% con APV-A, y 66-73% con RSV y PVM. La región entre los restos de aa 160 y 340 parece estar muy conservada entre metapneumovirus y en cierto modo en menor grado los Pneumovirinae (Miyahara et al., 1992; Li et al., 1996; Barr et al., 1991). Esto está de acuerdo con que MPV sea un metapneumovirus, mostrando una similitud del 100% con APV C.

El gen de fosfoproteína (P)

El segundo ORF en el mapa genómico codifica una proteína de 294 aa que comparte una homología de secuencia de aa de 68% con la proteína P de APV-C, y sólo 22-26% con la proteína P de RSV (Tabla 6). El gen P de MPV contiene un ORF sustancial, y a ese respecto es similar a P de muchos otros paramixovirus (Revisado en Lamb y Kolakofsky, 1996; Sedlmeier et al., 1998).

En contraste APV A y B y PVM y similar a RSV y APV-C, el ORF de MPV P carece de restos de cisteína. Ling (1995) sugirió que una región de elevada similitud entre todos los pneumovirus (aa 185-241) desempeña un papel en el proceso de síntesis del ARN o en el mantenimiento de la integridad estructural del complejo de nucleocápside. Esta región de similitud elevada también se encuentra en MPV (Figura 9) específicamente cuando se tienen en cuenta las sustituciones conservativas, mostrando una similitud de 100% con APV-C, 93% con APV-A y B, y aproximadamente 81% con RSV. El término C de la proteína P de MPV es rico en resto de glutamato, como se ha descrito para APVs (Ling et al., 1995).

El gen de la proteína de la matriz (M)

El tercer ORF del genoma de MPV codifica una proteína de 254 aa, que se asemeja a los ORFs de M de otros pneumovirus. El ORF de M de MPV tiene exactamente el mismo tamaño que los ORFs de M de otros metapneumovirus (Tabla 5), y muestra una elevada homología de secuencia de aa con las proteínas de la matriz de APV (78-87%), menor homología con las de RSV y PVM (37-38%), y 10% o menos de homología con las de otros paramixovirus (Tabla 6).

Easton (1997) comparó las secuencias de las proteínas de la matriz de todos los pneumovirus y encontró un heptadpéptido conservado en el resto 14 a 19 que también está conservado en MPV (Figura 10). Para RSV, PVM y APV, se han identificado pequeños ORFs secundarios dentro o que solapan con el ORF principal de M (52 aa y 51 aa en bRSV, 75 aa en RSV, 46 aa en PVM y 51 aa en APV) (Yu et al., 1992; Easton et al., 1997; Samal et al., 1991; Satake et al., 1984). Se observaron dos pequeños ORFs en el ORF de M de MPV. Se encontró un pequeño ORF de 54 restos de aa dentro del ORF de M principal (fragmento 1, Figura 7), comenzando en el nucleótido 2281, y un pequeño ORF de 33 restos de aa que se encontró solapando con el ORF de M comenzando en el nucleótido 2893 (fragmento 2, Figura 7). Similar a los ORFs secundarios de RSV y APV, no hay homología significativa entre estos ORFs secundarios y los ORFs secundarios de otros pneumovirus, las señales de comienzo o parada aparentes están ausentes. Además, no se ha dado a conocer pruebas para la síntesis de proteínas que corresponden a estos ORFs secundarios de APV y RSV.

El gen de la proteína de fusión (F)

El ORF de F de MPV está situado adyacente al ORF de M, que es característico para miembros del género *Metapneumovirus*. El gen F de MPV codifica una proteína de 539 aa, que es dos restos de aa más larga que F de APV-C (Tabla 5). El análisis de la secuencia de aa reveló una homología de 81% con APV-C, 67% con APV-A y B, 33-39% con las proteínas F de pneumovirus, y sólo 10-18% con otros paramixovirus (Tabla 6). Uno de los rasgos conservados entre proteínas F de paramixovirus, y también observado en MPV, es la distribución de restos de cisteína (Morrison, 1988; Yu et al., 1991). Los metapneumovirus comparten 12 restos de cisteína en F1 (7 están conservados entre todos los paramixovirus), y dos en F2 (1 está conservado entre todos los paramixovirus). De los 3 sitios de glucosilación enlazados mediante N potenciales presentes en el ORF de F de MPV, no se comparte ninguno con RSV, y se comparten dos (posición 74 y 389) con APV. El tercer y único sitio potencial de glucosilación enlazado mediante N para MPV está situado en la posición 206 (Figura 11).

A pesar de la baja homología de secuencia con otros paramixovirus, la proteína F de MPV reveló características de proteína de fusión típicas consistentes con las descritas para las proteínas F de otros miembros de la familia *Paramyxoviridae* (Morrison, 1988). Las proteínas F de los miembros de *Paramyxoviridae* se sintetizan como precursores inactivos (F0) que son escindidos por proteasas de células hospedantes que generan subunidades F2 aminoterminal y grandes subunidades F1 carboxi terminal. El sitio de escisión propuesto (Collins et al., 1996) está conservado entre todos los miembros de la familia de *Paramyxoviridae*. El sitio de escisión de MPV contiene los restos RQSR. Ambos restos de arginina (R) están compartidos con APV y RSV, pero los restos de glutamina (Q) y serina (S) están compartidos con otros paramixovirus tales como el virus de la parainfluenza humano tipo 1, el virus Sendai y morbilivirus (datos no mostrados).

Se piensa que la región hidrófoba en el término amino de F1 funciona como el dominio de fusión membránico, y muestra una elevada similitud de secuencia entre paramixovirus y morbilivirus y, en menor grado, los pneumovirus (Morrison, 1988). Estos 26 restos (posición 137-163, Figura 11) están conservados entre MPV y APV-C, lo que está de acuerdo con que esta región esté muy conservada entre los metapneumovirus (Naylor et al., 1998; Seal et al., 2000).

Como se puede observar para las subunidades F2 de APV y otros paramixovirus, MPV reveló una supresión de 22 restos de aa en comparación con RSV (posición 107-128, Figura 11). Además, para RSV y APV, se encontró que el péptido señal y el dominio de anclaje estaban conservados dentro de los subtipos y presentaron una elevada variabilidad entre los subtipos (Plows et al., 1995; Naylor et al., 1998). El péptido señal de MPV (aa 10-35, Figura 11) en el término amino de F2 muestra cierta similitud de secuencia con APV-C (18 de 26 restos de aa son similares) y una menor conservación con otros APVs o RSV. Se observa mucha mayor variabilidad en el dominio de anclaje de membrana en el término carboxi de F1, aunque todavía se observa cierta homología con APV-C.

La proteína 22K (M2)

El gen M2 es único para los *Pneumovirinae*, y se han conservado dos ORFs solapantes en todos los pneumovirus. El primer ORF principal representa la proteína M2-1, que potencia la procesabilidad de la polimerasa vírica (Collins et al., 1995; Collins, 1996) y su lectura de regiones intergénicas (Hardy et al., 1998; Fearn et al., 1999). El gen M2-1 para MPV, situado adyacente al gen F, codifica una proteína de 187 aa (Tabla 5), y revela la homología más elevada (84%) con M2-1 de APV-C (Tabla 6). La comparación de las proteínas M2-1 de todos los pneumovirus reveló la mayor conservación en la mitad aminoterminal de la proteína (Collins et al., 1990; Zamora et al., 1992; Ahmadian et al., 1999), lo que está de acuerdo con la observación de que MPV presenta 100% de similitud con APV-C en los primeros 80 restos de aa de la proteína (Figura 12A). La proteína M2-1 de MPV contiene 3 restos de cisteína situados en los primeros 30 restos de aa que están conservados entre todos los pneumovirus. Tal concentración de cisteínas se encuentra frecuentemente en proteínas de unión de zinc (Ahmadian et al., 1991; Cuesta et al., 2000).

Los ORFs secundarios (M2-2) que solapan con los ORFs de M2-1 de los pneumovirus están conservados en localización pero no en secuencia, y se piensa que están involucrados en el control del intercambio entre la replicación de ARN vírico y la transcripción (Collins et al., 1985; Elango et al., 1985; Baybutt et al., 1987; Collins et al., 1990; Ling et al., 1992; Zamora et al., 1992; Alansari et al., 1994; Ahmadian et al., 1999; Bermingham et al., 1999). Para MPV, el ORF de M2-2 comienza en el nucleótido 512 en el ORF de M2-1 (Figura 7), que es exactamente la misma posición de comienzo que para APV-C. La longitud de los ORFs de M2-2 es la misma para APV-C y MPV, 71 restos de aa (Tabla 5). La comparación de secuencias del ORF de M2-2 (Figura 12B) reveló un 64% de homología de secuencia de aa entre MPV y APV-C, y sólo 44-48% de homología de secuencia de aa entre MPV y APV-A y B (Tabla 6).

10 El ORF de la proteína hidrófoba pequeña (SH)

El gen situado adyacente a M2 de hMPV codifica probablemente una proteína SH de 183 aa (Fig. 1 y 7). No hay identidad de secuencia discernible entre este ORF y otros genes de virus de ARN o productos génicos. Esto no es sorprendente puesto que la similitud de secuencias entre proteínas SH de pneumovirus es generalmente baja. El ORF de SH putativo de hMPV es el ORF de SH más largo conocido hasta la fecha (Tabla 1). La composición de aa del ORF de SH es relativamente similar a la de APV, RSV y PVM, con un porcentaje elevado de restos de treonina y serina (22%, 18%, 19%, 20,0%, 21% y 28% para hMPV, APV, RSV A, RSV B, bRSV y PVM respectivamente). El ORF de SH de hMPV contiene 10 restos de cisteína, mientras que SH de APV contiene 16 restos de cisteína. El ORF de SH de hMPV contiene dos sitios potenciales de glucosilación enlazados mediante N (aa 76 y 121), mientras que APV tiene uno, RSV tiene dos o tres y PVM tiene cuatro.

20 Los perfiles de hidrofilia para la proteína SH de hMPV putativa y SH de APV y RSV revelaron características similares (Fig. 7B). Los ORFs de SH de APV y hMPV tienen un término N hidrófilo, un dominio hidrófobo central que puede servir como dominio de expansión de membrana potencial (aa 30-53 para hMPV), un segundo dominio hidrófobo (aa 155-170) y un término C hidrófilo. Por el contrario, SH de RSV parece crecer de la parte C-terminal de los ORFs de APV y hMPV. En todas las proteínas SH de los pneumovirus, el dominio hidrófobo está flanqueado por restos de aa básicos, que también se encuentra en el ORF de SH para hMPV (aa 29 y 54).

El ORF de la glucoproteína de unión (G)

El ORF de G putativo de hMPV está situado adyacente al gen SH putativo y codifica una proteína de 236 aa (nt 6262-6972, Fig. 1). Se encuentra un pequeño ORF secundario inmediatamente después de este ORF, que codifica potencialmente 68 restos de aa (nt 6973-7179) pero que carece de un codón de partida. Un tercer ORF potencial en el segundo marco de lectura de 194 restos de aa solapa con ambos de estos ORFs, pero también carece de un codón de partida (nt 6416-7000). Este ORF es seguido de un cuarto ORF potencial de 65 restos de aa en el mismo marco de lectura (nt 7001-7198), que carece nuevamente de un codón de partida. Finalmente, se encuentra un ORF potencial de 97 restos de aa (pero que carece de un codón de partida) en el tercer marco de lectura (nt 6444-6737, Fig. 1). A diferencia del primer ORF, los otros ORFs no tienen secuencias aparentes de comienzo génico o de terminación génica (véase más abajo). Aunque el ORF de G de 236 aa representa probablemente al menos una parte de la proteína de unión de hMPV, no se puede excluir que las secuencias codificantes adicionales se expresen como proteínas separadas o como parte de la proteína de unión a través de algún suceso de edición de ARN. Se debería observar que para APV y RSV, no se han identificado ORFs secundarios tras el ORF de G primario, pero que tanto APV como RSV tienen ORFs secundarios dentro del ORF principal de G. Sin embargo, no hay pruebas de la expresión de estos ORFs, y no hay identidad de secuencia entre las secuencias de aa predichas para diferentes virus (Ling et al., 1992). Los ORFs secundarios en G de hMPV no revelan características de otras proteínas G, y si se expresan ORFs adicionales se necesita una mayor investigación.

Los análisis de BLAST con todos los ORFs revelaron que no hay identidad de secuencia discernible a nivel de secuencia nucleotídica o de aa con otros genes víricos o productos génicos conocidos. Esto está de acuerdo con el bajo porcentaje de identidad de secuencia encontrado para otras proteínas G, tales como los de hRSV A y B (53%) (Johnson et al., 1987) y APV A y B (38%) (Juhász y Easton, 1994).

Mientras que la mayoría de los ORFs de hMPV se asemejan a los de APV tanto en longitud como en secuencia, el ORF de G putativo de 236 restos de aa de hMPV es considerablemente más pequeño que el ORF de G de APV (Tabla 1). La secuencia de aa reveló un contenido de serina y trionina de 34%, que es incluso mayor que el 32% para RSV y 24% para APV. El ORF de G putativo también contiene 8,5% de restos de prolina, que es mayor que el 8% para RSV y 7% para APV. La abundancia inusual de restos de prolina en las proteínas G de APV, RSV y hMPV también se ha observado en glucoproteínas de origen mucinoso, en las que es un determinante principal de la estructura tridimensional de las proteínas (Collins, y Wertz, 1983; Wertz et al., 1985; Jentoft, 1990). El ORF de G de hMPV contiene cinco sitios potenciales de glucosilación enlazados mediante N, mientras que hRSV tiene siete, bRSV tiene cinco y APV tiene tres a cinco.

El perfil de hidrofilia predicho de G de hMPV reveló características similares a los otros pneumovirus. El término N contiene una región hidrófila seguida de un área hidrófoba corta (aa 33-53 para hMPV) y un término C principalmente hidrófilo (Fig. 8B). Esta organización global es consistente con la de una proteína transmembránica tipo II anclada, y corresponde bien con estas regiones en la proteína G de APV y RSV. El ORF de G putativo de

hMPV contiene solamente 1 resto de cisteína, en contraste con RSV y APV (5 y 20 respectivamente). De señalar, sólo dos de los cuatro ORFs secundarios en el gen G contenían un resto de cisteína adicional, y estos cuatro ORFs potenciales revelaron 12-20% de restos de serina y trionina y 6-11% de restos de prolina.

El gen de polimerasa (L)

5 En analogía con otros virus de hebra negativa, el último ORF del genoma de MPV es un componente de ARN polimerasa dependiente de ARN de los complejos de replicación y transcripción. El gen L de MPV codifica una proteína de 2005 aa, que es 1 resto más larga que la proteína APV-A (Tabla 5). La proteína L de MPV comparte un 64% de homología con APV-A, 42-44% con RSV, y aproximadamente 13% con otros paramixovirus (Tabla 6). Poch et al. (1989; 1990) identificaron seis dominios conservados dentro de las proteínas L de virus de ARN de hebra negativa no segmentados, de los cuales el dominio III contenía los cuatro motivos de polimerasa central que se piensa que son esenciales para la función de la polimerasa. Estos motivos (A, B, C y D) están bien conservados en la proteína L de MPV: en los motivos A, B y C: MPV comparte un 100% de similitud con todos los pneumovirus, y en el motivo D, MPV comparte un 100% de similitud con APV y 92% con los RSVs. Para todo el dominio en (aa 627-903 en el ORF de L), MPV comparte una identidad de 77% con APV, 61-62% con RSV y 23-27% con otros paramixovirus (Figura 15). Además de los motivos de polimerasa, las proteínas L de pneumovirus contienen una secuencia que se conforma a un motivo de unión de ATP de consenso K(X)₂₁GEGAGN(X)₂₀K (Stec, 1991). El ORF de L de MPV contiene un motivo similar a APV, en el que el espaciamiento de los restos intermedios está apagado por uno: K(x)₂₂GEGAGN(X)₁₉K.

Análisis filogenéticos

20 Como indicador para la relación entre MPV y los miembros de los *Pneumovirinae*, se han construido previamente árboles filogenéticos basándose en los ORFs de N, P, M y F (van den Hoogen et al., 2001), y revelaron una relación estrecha entre MPV y APV-C. Debido a la baja homología de los genes SH y G de MPV con los de otros paramixovirus, no se pueden construir árboles filogenéticos fiables para estos genes. Además, la organización genómica distinta entre miembros de los géneros *Pneumovirus* y *Metapneumovirus* hace imposible generar árboles filogenéticos basados en toda la secuencia genómica. Por lo tanto, solamente se construyeron árboles filogenéticos para los genes M2 y L, además de los previamente publicados. Estos dos árboles confirmaron la relación estrecha entre APV y MPV dentro de la subfamilia de *Pneumovirinae* (Figura 16).

Secuencias no codificantes de MPV

30 Las uniones génicas e los genomas de paramixovirus contienen secuencias nucleotídicas cortas y muy conservadas al comienzo y al final de cada gen (señales de comienzo génico de terminación génica), que presentan posiblemente un papel en el inicio y la terminación de la transcripción (Curran et al., 1999). Comparando las secuencias intergénicas entre todos los genes de MPV, se reveló una secuencia de consenso para la señal de comienzo génica para el N, P, M, F, M2 y G: GGGACAAGU (Figura 17A), que es idéntica a la señal de comienzo génico de consenso de los metapneumovirus (Ling et al., 1992; Yu et al., 1992; Li et al., 1996; Bayon-Auboyer et al., 2000). Se encontró que las señales de comienzo génico para los genes SH y L de MPV son ligeramente diferentes de este consenso (SH: GGGAUAAAU, L: GAGACAAAU). Para APV, la señal de comienzo génico de L también se encontró que era diferente de la del consenso: AGGACCAAT (APV-A) (Randhawa et al., 1996) y GGGACCAGT (APV-D) (Bayon-Auboyer et al., 2000).

40 En contraste con las secuencias de comienzo génico similares de MPV y APV, la secuencia de terminación génica de consenso de APV, UAGUUAAUU (Randhawa et al., 1996), no se pudo encontrar en las secuencias intergénicas de MPV. La secuencia repetida encontrada en la mayoría de los genes, excepto la región intergénica G-L fue UAAAAA U/A/C, que podría actuar posiblemente como señal de terminación génica. Sin embargo, puesto que se secuenció ARN vírico en lugar de ARNm, no se pudieron asignar señales de terminación génica definitivas, y de este modo se requiere una investigación posterior. Las regiones intergénicas de los pneumovirus varían en tamaño y secuencia (Curran et al., 1999; Blumberg et al., 1991; Collins, et al., 1983;). Las regiones intergénicas de MPV no revelaron homología con las de APV y RSV, y oscilaron en tamaño de 10 a 228 nucleótidos (Figura 17B). La región intergénica entre los ORFs de M y F de MPV contienen parte de un ORF secundario, que comienza en el ORF de M primario (véase anteriormente). La región intergénica entre SH y G contiene 192 nucleótidos, y no parece tener potencial codificante basándose en la presencia de numerosos codones de parada en los tres marcos de lectura. 50 La región intergénica entre G y L contiene 241 nucleótidos, que puede incluir ORFs adicionales (véase anteriormente). De forma interesante, el comienzo del ORF de L está situado en estos ORFs secundarios. Mientras que el gen L de APV no comienza en el ORF de G precedente, el ORF de L de RSV también comienza en el gen M2 precedente. En las extremidades 3' y 5' del genoma de paramixovirus, la región extragénica corta se denomina como las secuencias líder y de rastreo, y aproximadamente los primeros 12 nucleótidos del líder y los últimos 12 nucleótidos del rastreador son complementarios, probablemente debido a que cada uno contiene elementos básicos del promotor vírico (Curran et al., 1999; Blumberg et al., 1991; Mink et al., 1986). El líder de 3' de MPV y APV tienen 41 nucleótidos de longitud, y se observa cierta homología entre el nucleótido 16 y 41 de ambos virus (18 de 26 nucleótidos) (Figura 17B). Como se menciona anteriormente, los primeros 15 nucleótidos del mapa genómico de MPV se basan en una secuencia cebadora basada en el genoma de APV. La longitud del rastreador de 5' de MPV 55 (188 nucleótidos) se asemeja al tamaño del rastreador de 5' de RSV (155 nucleótidos), que es considerablemente

más largo que el de APV (40 nucleótidos). Los alineamientos de los 40 nucleótidos de los extremos del rastreador de MPV y del rastreador de APV reveló homología de 21 de 32 nucleótidos, aparte de los 12 nucleótidos del extremo que representan secuencias cebadoras basadas en la secuencia genómica de APV. Nuestros análisis de secuencia reveló la ausencia de los genes NS1 y NS2 en el extremo 3' del genoma, y una organización genómica que se asemeja a la organización de los metapneumovirus (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'). La elevada homología de secuencia encontrada entre los genes de MPV y APV enfatiza adicionalmente la estrecha relación entre estos dos virus. Para los genes N, P, M, F, M2-1 y M2-2 de MPV, se encuentra una homología de aminoácidos global de 79% de APV-C. De hecho, para estos genes, APV-C y MPV revelaron homologías de secuencia que están en el mismo intervalo que las homologías de secuencia encontradas entre subgrupos de otros géneros, tales como RSV-A y B o APV-A y B. Esta estrecha relación entre APV-C y MPV también se ve en los análisis filogenéticos, que revelaron a MPV y a APV-C siempre en la misma rama, separada de la rama que contiene APV-A y B. La organización genómica idéntica, las homologías de secuencia y los análisis filogenéticos están todos a favor de la clasificación de MPV como el primer miembro del género *Metapneumovirus* que es aislable de mamíferos. Debería observarse que la variación de secuencia encontrada entre diferentes aislados víricos de MPV en los genes N, M, F y L reveló la posible existencia de diferentes genotipos (van den Hoogen et al., 2001). La estrecha relación entre MPV y APV-C no se ve reflejada en el intervalo de hospedante, puesto que APV infecta pájaros en contraste con MPV (van den Hoogen et al., 2001). Esta diferencia en el intervalo de hospedante se puede determinar por las diferencias entre las proteínas SH y G de ambos virus que son muy divergentes. Las proteínas SH y G de MPV no revelaron homología de secuencia de aa significativa con las proteínas SH y G de cualquier otro virus. Aunque el contenido de aminoácidos y las gráficas de hidrofobia están a favor de definir estos ORFs como SH y G, se requieren datos experimentales para evaluar su función. Tales análisis también arrojarán luz al papel de los ORF solapantes adicionales en estos genes SH y G. Además, los análisis de secuencia en los genes SH y G de APV-C pueden proporcionar más comprensión en la función de las proteínas SH y G de MPV y su relación con las de APV-C. Se encontró que las regiones no codificantes de MPV son bastante similares a las de APV. Las secuencias líder de 3' y rastreadora de 5' de APV y MPV presentaron un grado elevado de homología. Aunque las longitudes de las regiones intergénicas no fueron siempre las mismas para APV y MPV, se encontró que las señales de comienzo génico de consenso de la mayoría de los ORFs eran idénticas. Por el contrario, las señales de terminación génica de APV no se encontraron en el genoma de MPV. Aunque se encontró una secuencia repetitiva (U AAAAA U/A/C) en la mayoría de las regiones intergénicas, se requiere análisis de secuencia de los ARNm víricos para delinear formalmente esas secuencias de terminación génica. Se debería observar que la información de secuencia para 15 nucleótidos en el extremo 3' y 12 nucleótidos en el extremo 5' se obtiene usando amplificación rápida modificada de procedimientos de extremos de ADNc (RACE). Se ha demostrado que esta técnica es exitosa mediante otros para virus relacionados (Randhawa, J.S. et al., Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J. Virol*, 71, 9849-9854 (1997); Mink, M.A., et al. Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185, 615-24 (1991)). Para determinar la secuencia de la secuencia líder de 3' de ARNv, se añade una cola de homopolímero A al ARNv purificado usando poli-A-polimerasa, y la secuencia líder se amplifica subsiguientemente mediante PCR usando un cebador poli-T y un cebador en el gen N. Para determinar la secuencia de la secuencia rastreadora de 5' de ARNv, se realiza una copia de ADNc de la secuencia rastreadora usando transcriptasa inversa y un cebador en el gen L, seguido de una cola de homopolímero dG del ADNc con transferasa terminal. Subsiguientemente, la región rastreadora se amplifica usando un cebador poli-C y un cebador en el gen L. Como estrategia alternativa, ARNv se liga a sí mismo o a ligadores sintéticos, después de lo cual las regiones líder y rastreadora se amplifican usando cebadores en los genes L y N y cebadores específicos de ligadores. Para la secuencia rastreadora de 5', también es factible la secuenciación didesoxinucleotídica directa de ARNv purificado (Randhawa, 1997). Usando estos enfoques, se puede analizar la secuencia exacta de los extremos del genoma de hMPV. La información de secuencia proporcionada aquí es de importancia para la generación de ensayos de diagnóstico, vacunas y antivirales para las infecciones por MPV y para MPV.

Materiales y métodos

Análisis de secuencias

El aislado vírico 00-1 se propagó hasta títulos elevados (aproximadamente 10.000 TCID₅₀/ml) en células de riñón de mono terciarias como se describe previamente (van den Hoogen et al., 2001). El ARN vírico se aisló de los sobrenadantes a partir de células infectadas usando un kit de aislamiento de ARN muy puro, según las instrucciones del fabricante (Roch Diagnostics, Almere, Países Bajos). Los cebadores se diseñaron basándose en secuencias publicadas previamente (van den Hoogen et al., 2001), además de las secuencias publicadas para el líder y rastreador de APV/RSV (Randhawa et al., 1997; Mink et al., 1991) y están disponibles según pedido. Se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR con ARN vírico, usando un ensayo de un tubo en un volumen total de 50 µl con 50 mM de Tris pH 8,5, 50 mM de NaCl, 4,5 mM de MgCl₂, 2 mM DTT, 1 µM de cebador directo, 1 µM de cebador inverso, 0,6 mM de dNTP's, 20 unidades de RNAsin (Promega, Leiden, Países Bajos), 10 U de transcriptasa inversa AMV (Promega, Leiden, Países Bajos), y 5 unidades de Taq Polymerase (PE Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, Países Bajos). La transcripción inversa se llevó a cabo a 42°C durante 30 minutos, seguido de inactivación durante 8 minutos a 95°C. El ADNc se amplificó durante 40 ciclos de 95°C, 1 min; 42°C, 2 min; 72°C, 3 min., con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Tras el examen en gel de agarosa al 1%, los productos de la RT-PCR se purificaron del gel usando un kit de extracción en gel Qiaquick (Qiagen, Leusden, Países Bajos), y se secuenciaron

directamente usando un kit de secuenciación terminador Dyanamic ET (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, Países Bajo) y un secuenciador de ADN automático ABI 373 (PE Applied Biosystem, Nieuwerkerk aan den IJssel, Países Bajos), según las instrucciones del fabricante.

5 Se realizaron alineamientos de secuencia usando el paquete de software Clustal disponible en el paquete de software de BioEdit versión 5.0.6. (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html>; Hall, 1999).

Análisis filogenético

10 Para construir árboles filogenéticos, se alinearon las secuencias de ADN usando el paquete de software ClustalW y se generaron los árboles de verosimilitud máxima usando el paquete de software DNA-ML del programa Phylip 3.5 usando 100 bootstraps y 3 salteados. Los valores de bootstrap se computaron para árboles de consenso creados con el paquete de consenso (Felsenstein, 1989).

15 La secuencia genómica de MPV está disponible de Genbank con el número de acceso AF371337. Todas las otras secuencias usadas aquí están disponibles de Genbank con los números de acceso AB046218 (virus de las paperas, todos los ORFs), NC-001796 (virus de parainfluenza humano tipo 3, todos los ORFs), NC-001552 (virus Sendai, todos los ORFs), X57559 (virus de parainfluenza humano tipo 2, todos los ORFs), NC-002617 (virus de la enfermedad de New Castle, todos los ORFs), NC-002728 (virus Nipah, todos los ORFs), NC-001989 (bRSV, todos los ORFs), M11486 (hRSV A, todos los ORFs excepto L), NC-001803 (hRSV, L ORF), NC-001781 (hRSV B, todos los ORFs), D10331 (PVM, N ORF), U09649 (PVM, P ORF), U66893 (PVM, M ORF), U66893 (PVM, SH ORF), D11130 (PVM, G ORF), D11128 (F ORF). El M2 ORF de PVM se tomó de Ahmadian (1999), AF176590 (APV-C, N ORF), U39295 (APV-A, N ORF), U39296 (APV-B, N ORF), AF262571 (APV-C, M ORF), U37586 (APV-B, M ORF), X58639 (APV-A, M ORF), AF176591 (APV-C, P ORF), AF325443 (APV-B, P ORF), U22110 (APV-A, P ORF), AF187152 (APV-C, F ORF), Y14292 (APV-B, F ORF), D00850 (APV-A, F ORF), AF176592 (APV-C, M2 ORF), AF35650 (APV-B, M2 ORF), X63408 (APV-A, M2 ORF), U65312 (APV-A, L ORF), S40185 (APV-A, SH ORF).

Tabla 5: Longitudes de los ORFs de MPV y otros paramixovirus.

	N ¹	P	M	F	M2-1	M2-2	SH	G	L
MPV	394	294	254	539	187	71	183	236	2005
APVA	391	278	254	538	186	73	174	391	2004
APV B	391	279	254	538	186	73	- ²	414	- ²
APV C	394	294	254	537	184	71	- ²	2	- ²
APV	- ²	389	- ²						
hRSV A	391	241	256	574	194	90	64	298	2165
hRSVB	391	241	249	574	195	93	65	299	2166
bRSV	391	241	256	569	186	93	81	257	2162
PVM	393	295	257	537	176	77	92	396	- ²
otros ³	418-542	225-709	335-393	539-565	- ⁴	- ⁴	- ⁴	- ⁴	2183-2262

Notas al pie:

1. longitud en restos de aminoácidos.

2. secuencias no disponibles.

3. otros: virus de parainfluenza humano tipo 2 y 3, virus Sendai, virus del sarampión, virus Nipah, del moquillo procino, y virus de la enfermedad de New Castle.

4. ORF no presente en el genoma vírico

Tabla 6: Identidad de secuencia de aminoácidos entre los OFRs de MPV y aquellos de otros paramixovirus¹.

	N	P	M	F	M2-1	M2-2	L
APV A	69	55	78	67	72	26	64
APV B	69	51	76	67	71	27	- ²
APV C	88	68	87	81	84	56	- ²
hRSV A	42	24	38	34	36	18	42
hRSV B	41	23	37	33	35	19	44
bRSV	42	22	38	34	35	13	44
PVM	45	26	37	39	33	12	- ²
otros ³	7-11	4-9	7-10	10-18	- ⁴	- ⁴	13-14

Notas al pie:

1. No se encontraron homologías de secuencia con las proteínas G y SH conocidas, y de este modo se excluyeron.
2. Secuencias no disponibles.
3. Véase la lista en la tabla 5, pie de nota 3.
4. ORF ausente en el genoma vírico.

Referencias

- 5 Current Protocols in Molecular Biology, volumen 1-3 (1994-1998). Ed. por Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A y Struhl, K. publicado por John Wiley and sons, Inc., USA
- Current Protocols in Immunology, volumen 1-3. Ed. por Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. y Strobe, W. Publicado por John Wiley and sons, Inc., USA.
- Sambrook *et al.* Molecular cloning, a laboratory manual, segunda edición, vol. 1-3. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).
- 10 Fields, Virology. 1996. Vol. 1-2 3ª edición, Ed. por: Fields, B.N., Knipe, D.M. y Howley, P.M. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA.
1. Pringle, C.R. Virus taxonomy at the Xith international congress of virology, Sydney, Australia 1999. *Arch. Virol.* 144/2, 2065-2070 (1999).
- 15 2. Domachowske, J.B. y Rosenberg, H.F. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. *Clin. Microbio. Rev.* 12(2), 298-309 (1999). Repaso.
3. Giraud, P., Bennejean, G., Guittet, M. y Toquin, D. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. *Vet. Rec.* 119, 606-607 (1986).
- 20 4. Ling, R., Easton, A.J. y Pringle, C.R. Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. *J. Gen. Virol.* 73, 1709-1715 (1992).
5. Yu, Q., Davis, P.J., Li, J. y Cavanagh, D. Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus. *Virology* 186, 426-434 (1992).
- 25 6. Randhawa, J.S., Marriott, A.C., Pringle, C.R. y Easton, A.J. Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J. Virol.* 71, 9849-9854 (1997).
7. Evans, A.S. En: *Viral Infections of Humans. Epidemiology and control.* 3ª ed. (ed. Evans, A.S) 22-28 (Plenum Publishing Corporation, Nueva York, 1989).

8. Osterhaus, A.D.M.E., Yang, H., Spijkers, H.E.M., Groen, J., Teppema, J.S. y van Steenis, G. The isolation and partial characterization of a highly pathogenic herpesvirus from the Harbor Seal (*Phoca vitulina*). *Arch. of Virol.* 86, 239-251 (1985).
9. K.B. Chua *et al.* Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288, 1432-1435 (2000).
- 5 10. Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S., Cheng, R., Ralph, D. y McClelland, M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA *NAR.* 20, 4965-4970 (1992).
11. Bayon-Auboyer, M., Arnauld, C., Toquin, D. y Etteradossi, N. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J. of Gen. Virol.* 81, 2723-2733 (2000).
- 10 12. Mulder, J. y Masurel, N. Pre-epidemic antibody against 1957 strain of asiatic influenza in serum of older people living in The Netherlands. *The Lancet*, 19 de abril, 810-814 (1958).
13. Pringle, C.R. En: *The Paramyxoviruses*. 1ª ed. (ed. D.W. Kingsbury) 1-39 (Plenum Press, Nueva York, 1991).
14. Rothbarth, P.H., Groen, J., Bohnen, A.M., Groot, de R., y Osterhaus, A.D.M.E. Influenza virus serology-a comparative study. *J. of Virol. Methods* 78, 163-169 (1999).
- 15 15. Brandenburg, A.H., Groen, J., van Steensel-Moll, H.A., Claas, E.J.C., Rothbarth, P.H., Neijens, H.J. y Osterhaus, A.D.M.E. Respiratory syncytial virus specific serum antibodies in infants under six months of age: limited serological response upon infection. *J. Med. Virol.* 52, 97-104 (1997).
16. Lennette, D.A. *et al.* En: *Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections*. 7ª ed. (ed. Lennette, E.H., Lennette, D.A. & Lennette, E.T.) 3-25; 37-138; 431-463; 481-494; 539-563 (American public health association, Washington, 1995).
- 20 15. Felsenstein, J. Department of Genetics, University of Washington. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
16. Schnell *et al.* *EMBO J* 13, 4195-4203, 1994
- 25 17. Collins, P.L., Hill, M.G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R.M. y Murphy, B.R. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *PNAS* 92, 11563-11567 (1995).
18. Hoffmann, E., Neumann, G., Kawakao, Y., Hobom, G. y Webster, R.G. A DNA transfection system for generation of influenza virus from eight plasmids. *PNAS* 97, 6108-6113 (2000).
- 30 19. Bridgen, A., Elliot, R.M. Rescue of a segmented negative-strand virus entirely from cloned complementary DNAs. *PNAS* 93, 15400-15404 (1996).
20. Palese, P., Zheng, H., Engelhardt, O.G., Pleschka, S. y Garcia-Sastre, A. Negative-strand RNA viruses: genetic engineering and applications. *PNAS* 93, 11354-11358 (1996).
- 35 21. Peeters, B.P., de Leeuw, O.S., Koch, G. y Gielkens, A.L. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.* 73, 5001-5009 (1999).
22. Durbin, A.P., Hall, S.L., Siew, J.W., Whitehead, S.S., Collins, P.L. y Murphy, B.R. Recovery of infectious human parainfluenza virus type 3 from cDNA. *Virology* 235, 323-332 (1997).
- 40 23. Tao, T., Durbin, A.P., Whitehead, S.S., Davoodi, F., Collins, P.L. y Murphy, B.R. Recovery of a fully viable chimeric human parainfluenza virus (PIV) type 3 in which the hemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins have been replaced by those of PIV type 1. *J. Virol.* 72, 2955-2961 (1998).
24. Durbin, A.P., Skiadopoulos, M.H., McAuliffe, J.M., Riggs, J.M., Surman, S.R., Collins, P.L. y Murphy, B.R. Human parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the hemagglutinin protein of measles virus provides a potential method for immunization against measles virus and PIV3 in early infancy. *J. Virol.* 74, 6821-6831 (2000).
- 45 25. Skiadopoulos, M.H., Durbin, A.P., Tatem, J.M., Wu, S.L., Paschalis, M., Tao, T., Collins, P.L. y Murphy, B.R. Three amino acid substitutions in the L protein of the human parainfluenza virus type 3 cp45 live attenuated vaccine candidate contribute to its temperature-sensitive and attenuation phenotypes. *J. Virol.* 72, 1762-1768 (1998).
26. Teng, N., Whitehead, S.S., Bermingham, A., St.Claire, M., Elkins, W.R., Murphy, B.R. y Collins, P.L. *J. Virol.* 74, 9317-9321 (2000).

27. Masurel, N. Relation between Hong Kong virus and former human A2 isolates and the A/EQU12 virus in human sera collected before 1957. *The Lancet* 3 de mayo, 907-910 (1969).

Otras referencias usadas con el ejemplo 4

- 5 AHMADIAN, G., CHAMBERS, P., y EASTON, A. J. (1999). Detection and characterisation of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses. *J Gen Virol* 80, 2011-6.
- ALANSARI, H., y POTGIETER, L. N. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of the phosphoprotein, nucleocapsid protein, matrix protein and 22K (M2) protein of the ovine respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 75, 3597-601.
- 10 BARR, J., CHAMBERS, P., PRINGLE, C. R., y EASTON, A. J. (1991). Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J Gen Virol* 72, 677-85.
- BAYBUTT, H. N., y PRINGLE, C. R. (1987). Molecular cloning and sequencing of the F and 22K membrane protein genes of the RSS-2 strain of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 68, 2789-96.
- 15 BAYON-AUBOYER, M. H., ARNAULD, C., TOQUIN, D., y ETERRADOSSI, N. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J Gen Virol* 81, 2723-33.
- BERMINGHAM, A., y COLLINS, P. L. (1999). The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11259-64.
- 20 BLUMBERG, B.M., CHAN, J., y UDEM, S.A. (1991). Function of Paramyxovirus 3' and 5'end sequences: In theory and practice. En "the Paramyxoviruses" (Ed. D. Kingsbury), p. 235-247. Plenum, Nueva York.
- COLLINS, P. L., y WERTZ, G. W. (1983). cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 3208-12.
- COLLINS, P. L., y WERTZ, G. W. (1985). The envelope-associated 22K protein of human respiratory syncytial virus: nucleotide SEQUENCE of the mRNA and a related polytranscript. *J Virol* 54, 65-71.
- 25 COLLINS, P.L., DICKENS, L.E., BUCKLER-WHITE, A., OLMSTED, R.A., SPRIGGS, M.K., CAMARGO, E., y COELINGH, K.V.W. (1986). Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4594-98.
- COLLINS, P. L., HILL, M. G., y JOHNSON, P. R. (1990). The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression *in vitro*. *J Gen Virol* 71, 3015-20.
- 30 COLLINS, P. L., HILL, M. G., CAMARGO, E., GROSFELD, H., CHANOCK, R. M., y MURPHY, B. R. (1995). Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 11563-7.
- 35 COLLINS, P. L., MCINTOSH, K. y CHANOCK, R.M. (1996). "Respiratory syncytial virus." En: Fields virology (Ed. B. N. Knipe, Howley, P.M.) Lippencott-Raven, Philadelphia.
- COOK, J. K. (2000). Avian rhinotracheitis. *Rev Sci Tech* 19, 602-13.
- CUESTA, I., GENG, X., ASENJO, A., y VILLANUEVA, N. (2000). Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein. *J. Gen. Virol* 74, 9858-67.
- 40 CURRAN, J., y KOLAKOFSKY, D. (1999). Replication of paramyxoviruses. *Adu. Virus Res.* 50, 403-422.
- EASTON, A. J., y CHAMBERS, P. (1997). Nucleotide sequence of the genes encoding the matrix and small hydrophobic proteins of pneumonia virus of mice. *Virus Res* 48, 27-33.
- ELANGO, N., SATAKE, M., y VENKATESAN, S. (1985). mRNA sequence of three respiratory syncytial virus genes encoding two nonstructural proteins and a 22K structural protein. *J Virol* 55, 101-10.
- 45 FEARN, R., y COLLINS, P. L. (1999). Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* 73, 5852-64.
- FELSENSTEIN, J. (1989). "PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Versión 3.2. Cladistics 5)".

- GIRAUD, P., BENNEJEAN, G., GUITTET, M., y TOQUIN, D. (1986). Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. *Vet Rec* 119, 606-7.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- 5 HARDY, R. W., y WERTZ, G. W. (1998). The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J Virol* 72, 520-6.
- HORVATH, C.M., y LAMB, R. A. (1992). Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. *J Virol* 66, 2443-55.
- JENTOFT, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* 15, 291-4.
- 10 JOHNSON, P. R., JR., OLMSTED, R. A., PRINCE, G. A., MURPHY, B. R., ALLING, D. W., WALSH, E. E., y COLLINS, P. L. (1987). Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. *J Virol* 61, 3163-6.
- JUHASZ, K., y EASTON, A. J. (1994). Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J Gen Virol* 75, 2873-80
- 15 KYTE, J. y DOOLITTLE, R.F. (1982). A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-142.
- LAMB, R. A., y KOLAKOFSKY, D. (1996). "Paramyxoviridae: the viruses and their replication". En: Fields virology (Ed. B. N. Knipe, Howley, P.M.) Lippencott-Raven, Philadelphia.
- 20 LI, J., LING, R., RANDHAWA, J. S., SHAW, K., DAVIS, P. J., JUHASZ, K., PRINGLE, C. R., EASTON, A. J., y CAVANAGH, D. (1996). Sequence of the nucleocapsid protein gene of subgroup A and B avian pneumoviruses. *Virus Res* 41, 185-91.
- LING, R., EASTON, A. J., y PRINGLE, C. R. (1992). Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. *J Gen Virol* 73, 1709-15.
- 25 LING, R., DAVIS, P. J., YU, Q., WOOD, C. M., PRINGLE, C. R., CAVANAGH, D., y EASTON, A. J. (1995). Sequence and in vitro expression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus. *Virus Res* 36, 247-57.
- MARRIOT, A.C., SMITH, J.M., y EASTON, A. (2001). Fidelity of leader and trailer sequence usage by the respiratory syncytial virus and avian pneumovirus replication complexes. *J. Virol.* 75, 6265-72.
- 30 MINK, M. A., STEC, D. S., y COLLINS, P. L. (1991). Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185, 615-24.
- MIYAHARA, K., KITADA, S., YOSHIMOTO, M., MATSUMURA, H., KAWANO, M., KOMADA, H., TSURUDOME, M., KUSAGAWA, S., NISHIO, M., y ITO, Y. (1992). Molecular evolution of human paramyxoviruses. Nucleotide sequence analyses of the human parainfluenza type 1 virus NP and M protein genes and construction of phylogenetic trees for all the human paramyxoviruses. *Arch Virol* 124, 255-68.
- 35 MORRISON, T. G. (1988). Structure, function, and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res* 10, 113-35.
- NAYLOR, C. J., BRITTON, P., y CAVANAGH, D. (1998). The ectodomains but not the transmembrane domains of the fusion proteins of subtypes A and B avian pneumovirus are conserved to a similar extent as those of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 79, 1393-8.
- 40 PLOWS, D. J., y PRINGLE, C. R. (1995). Variation in the fusion glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus subgroup A. *Virus Genes* 11, 37-45.
- POCH, O., BLUMBERG, B. M., BOUGUELERET, L., y TORDO, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* 71, 1153-62.
- 45 POUCH, O., SAUVAGET, I., DELARUE, M., y TORDO, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J* 8, 3867-74.
- RANDHAWA, J. S., MARRIOTT, A. C., PRINGLE, C. R., y EASTON, A. J. (1997). Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J Virol* 71, 9849-54.

RANDHAWA, J. S., WILSON, S. D., TOLLEY, K. P., CAVANAGH, D., PRINGLE, C. R., y EASTON, A. J. (1996). Nucleotide sequence of the gene encoding the viral polymerase of avian pneumovirus. *J Gen Virol* 77, 3047-51.

SAMAL, S. K., y ZAMORA, M. (1991). Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 72, 1715-20.

SATAKE, M., y VENKATESAN, S. (1984). Nucleotide sequence of the gene encoding respiratory syncytial virus matrix protein. *J Virol* 50, 92-9.

SEAL, B. S., SELLERS, H. S., y MEINERSMANN, R. J. (2000). Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. *Virus Res* 66, 139-47.

SEDLMEIER, R., y NEUBERT, W. J. (1998). The replicative complex of paramyxoviruses: structure and function. *Adv Virus Res* 50, 101-39.

STEC, D.S., HILL, M.G., 3RD, y COLLINS, P.L. (1991). Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology* 183, 273-87.

VAN DEN HOOGEN, B. G., DE JONG, J. C., GROEN, J., KUIKEN, T., DE GROOT, R., FOUCHIER, R. A., y OSTERHAUS, A. D. (2001). A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 7(6), 719-24.

VIRUS TAXONOMY (2000). Seventh report of the international Committee on Taxonomy of Viruses.

WERTZ, G. W., COLLINS, P. L., HUANG, Y., GRUBER, C., LEVINE, S., y BALL, L. A. (1985). Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 4075-9.

YU, Q., DAVIS, P. J., BARRETT, T., BINNS, M. M., BOURSNEILL, M. E., y CAVANAGH, D. (1991). Deduced amino acid sequence of the fusion glycoprotein of turkey rhinotracheitis virus has greater identity with that of human respiratory syncytial virus, a pneumovirus, than that of paramyxoviruses and morbilliviruses. *J Gen Virol* 72, 75-81.

YU, Q., DAVIS, P. J., LI, J., y CAVANAGH, D. (1992). Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus. *Virology* 186, 426-34.

ZAMORA, M., y SAMAL, S. K. (1992). Sequence analysis of M2 mRNA of bovine respiratory syncytial virus obtained from an F-M2 dicistronic mRNA suggests structural homology with that of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 73, 737-41.

Cebadores usados para la detección mediante RT-PCR de paramixovirus conocidos. Los cebadores para hPIV-1 a 4, paperas, sarampión, Tupaia, Mapuera y Hendra se desarrollaron en nuestro laboratorio, y se basaron en alineamientos de secuencias disponibles. Los cebadores del virus de la enfermedad de New Castle se tomaron de Seal, J., J. et al; *Clin. Microb.*, 2624-2630, 1995. Los cebadores para Nipah y PCR de paramixovirus en general se tomaron de: Chua, K.B., et al; *Science*, 288 26 de mayo de 2000

Virus		cebadores	situado en la proteína
HPIV-1	fwd	5'-TGTTGTCGAGACTATTCCAA-3'	HN
	Rev	5'-TGTTG(T/A)ACCAGTTGCAGTCT-3'	
HPIV-2	Fwd	5'-TGCTGCTTCTATTGAGAAACGCC-3'	N
	Rev	5'-GGTGAC/TTC(T/C)AATAGGGCCA-3'	
HPIV-3	Fwd	5'-CTCGAGGTTGTCAGGATATAG-3'	HN
	Rev	5'-CTTTGGGAGTTGAACACAGTT-3'	
HPIV-4	Fwd	5'-TTC(A/G)GTTTTAGCTGCTTACG-3'	N
	Rev	5'-AGGCAAATCTCTGGATAATGC-3'	
Paperas	Fwd	5'-TCGTAACGTCTCGTGACC-3'	SH
	Rev	5'-GGAGATCTTTCTAGAGTGAG-3'	
NDV	Fwd	5'-CCTTGGTGATCTATCCGIAG-3'	F
	Rev	5'-CTGCCACTGCTAGTTGIGATAATCC-3'	
Tupaia	Fwd	5'-GGGCTTCTAAGCGACCCAGATCTTG-3'	N
	Rev	5'-GAATTTCTTATGGACAAGCTCTGTGC-3'	

ES 2 393 468 T3

Virus	cebadores		situado en la proteína
Mapuera	Fwd	5'-GGAGCAGGAACTCCAAGACCTGGAG-3'	N
	Rev:	5'-GCTCAACCTCATCATACTAACCC-3'	
Hendra	Fwd	5'-GAGATGGGCGGGCAAGTGCGGCAACAG-3'	N
	Rev	5'-GCCTTTGCAATCAGGATCCAAATTTGGG-3'	
Nipah	Fwd	5'-CTGCTGCAGTTCAGGAAACATCAG-3'	N
	Rev	5'-ACCGGATGTGCTCACAGAACTG-3'	
HRSV	Fwd	5'-TTTGTTATAGGCATATCATTG-3'	F
	Rev	5'-TTAACCAGCAAAGTGTTA-3'	
Sarampión	Fwd	5'-TTAGGGCAAGAGATGGTAAGG-3'	N
	Rev	5'-TTATAACAATGATGGAGGG-3'	

Paramyxoviridae en general:

Fwd	5'-CATTAAAAAGGGCACAGACGC-3'	P
Rev	5'-TGGACATTCTCCGCAGT-3'	

Cebadores para RAP-PCR:

ZF1:	5'-CCCACCACCAGAGAGAAA-3'
ZF4:	5'-ACCACCAGAGAGAAACCC-3'
ZF7:	5'-ACCAGAGAGAAACCCACC-3'
ZF10:	5'-AGAGAGAAACCCACCACC-3'
ZF13:	5'-GAGAAACCCACCACCAGA-3'
ZF16:	5'-AAACCCACCACCAGAGAG-3'

Cebadores para RAP-PCR:

CS1:	5'-GGAGGCAAGCGAACGCAA-3'
CS4:	5'-GGCAAGCGAACGCAAGGA-3'
CS7:	5'-AAGCGAACGCAAGGAGGC-3'
CS10:	5'-CGAACGCAAGGAGGCAAG-3'
CS13:	5'-ACGCAAGGAGGCAAGCGA-3'
CS16:	5'-CAAGGAGGCAAGCGAACG-3'

20 fragmentos se purificaron y secuenciaron con éxito:

10 fragmentos encontrados con homología de secuencia en APV

Fragmento 1	ZF 7, 335 pb	gen N
Fragmento 2	ZF 10, 235 pb	gen N
Fragmento 3	ZF 10, 800 pb	gen M
Fragmento 4	CS 1, 1250 pb	gen F
Fragmento 5	CS 10, 400 pb	gen F
Fragmento 6	CS 13, 1450 pb	gen F
Fragmento 7	CS 13, 750 pb	gen F
Fragmento 8	ZF 4, 780 pb	gen L (nivel proteico)

Fragmento 9	ZF 10, 330 pb	gen L (nivel proteico)
Fragmento 10	ZF10, 250 pb	gen L (nivel proteico)

Cebadores usados para la amplificación mediante RAP-PCR de ácidos nucleicos a partir del aislado prototípico.

Ejemplo 5

Explotación adicional de los dos subtipos de hMPV

5 Basándose en análisis filogenéticos de los diferentes aislados de hMPV obtenidos hasta ahora, se han identificado dos genotipos, siendo el aislado vírico 00-1 el prototipo del genotipo A, y el aislado 99-1 el prototipo del genotipo B.

Se teoriza que los genotipos están relacionados con subtipos, y que la reinfección con virus de ambos subgrupos se produce en presencia de inmunidad preexistente, y puede que no se necesite estrictamente la variación antigénica para permitir la reinfección.

10 Además, parece que hMPV está estrechamente relacionado con pneumovirus aviar, un virus encontrado principalmente en aves de corral. Las secuencias nucleotídicas de ambos virus muestran porcentajes elevados de homología, con la excepción de las proteínas SH y G. se muestra aquí que los virus reaccionan de forma cruzada en los ensayos, que se basan principalmente en la nucleoproteína y en la proteína de la matriz, pero responden de forma diferente en los ensayos, que se basan en las proteínas de unión. Las diferencias en los títulos de neutralización vírica proporcionan una prueba adicional de que los dos genotipos de hMPV son dos serotipos diferentes de un virus, en el que APV es un virus diferente.

La reacción cruzada entre los dos serotipos y la reacción cruzada entre APV y hMPV

Métodos

Protocolo para la detección de anticuerpos IgG, IgA e IgM para hMPV:

20 El EIA de IgG indirecta para hMPV se llevó a cabo en placas de microtitulación esencialmente como se describe previamente (Rothbarth, P.H. et al., 1999; Influenza virus serology-a comparative study. J. of Vir. Methods 78 (1999) 163-169.

25 De forma breve, se solubilizó hMPV concentrado mediante tratamiento con 1% de Triton X-100 revestido durante 16 h a temperatura ambiente en placas de microtitulación en PBS tras la determinación de la dilución de trabajo óptima mediante valoración de tipo damero. Subsiguientemente, se añadieron volúmenes de 100 ul de muestras de suero humano diluidas 1:100 en tampón de EIA a los pocillos, y se incubó durante 1h a 37°C. La unión de IgG humana se detectó añadiendo un conjugado de IgG antihumano de cabra con peroxidada (Biosource, USA). Añadiendo TMB como sustrato, se midió las placas desarrolladas y OD a 450 nm, los resultados se expresaron como la relación S (señal)/N(negativo) de la OD. Un suero se consideró positivo para IgG si la relación S/N estaba más allá del control negativo más tres veces el estándar.

30 Los anticuerpos de hMPV de las clases IgM e IgA se detectaron en sueros mediante EIA de captura esencialmente como se describe previamente (Rothbarth, P.H. et al. 1999; Influenza virus serology-a comparative study. J. Vir. methods 78 (1999) 163-169. Para la detección de IgA e IgM, se usaron placas de microtitulación comercialmente disponibles revestidas con anticuerpos monoclonales específicos de IgM o IgA anti-humanos. Los sueros se diluyeron 1:100 y, tras la incubación de 1h a 37C, se añadió una dilución de trabajo óptima de hMPV en cada pocillo (100 ul). Se incubó 1h a 37°C. Después de lavar, se añadió anti-hMPV policlonal marcado con peroxidada, la placa se incubó 1h a 37°C. Añadiendo TMB como placas desarrolladas de sustrato y midiendo OD a 450 nm, los resultados se expresaron como la relación S(señal)/N(negativo) de la OD. Un suero se consideró positivo para IgG si la relación S/N estaba más allá del control negativo más tres veces el estándar.

40 Los anticuerpos de AVP se detectaron en un ensayo de inhibición de AVP. El protocolo para el ensayo de inhibición de APV está incluido en el inmunoensayo enzimático de APV-Ab SVANOVIR® que está fabricado por SVANOVA Biotech AB, Uppsal Science Park Glutten SE-751 83 Uppsala Suecia. Los resultados se expresaron como la relación S(señal)/N(negativo) de la OD. Un suero se consideró positivo para IgG si la relación S/N estaba más allá del control negativo más tres veces el estándar.

45 1. Cobayas

A. (re)infección de cobayas con ambos subtipos de hMPV

Se han usado aislados víricos ned/00/01 (subtipo A) y ned/99/01 (subtipo B) para inocular 6 cobayas por subtipo (intratraqueal, nariz y ojos).

6 cobayas infectados con hMPV 00-1 (10e6,5 TCID50)

6 cobayas infectados con hMPV 99-1 (10e4,1 TCID50)

54 días después de la infección primaria, los cobayas se inocularon con los subtipos homólogos y heterólogos (10e4 TCID50/ml):

5 2 cobayas: 1ª infección 00-1; 2ª 99-1 (heterólogo)

3 cobayas: 1ª infección 00-1; 2ª 00-1 (homólogo)

2 cobayas: 1ª infección 99-1; 2ª 00-1 (heterólogo)

3 cobayas: 1ª infección 99-1; 2ª 99-1 (homólogo)

10 Se recogieron torundas de garganta y nariz durante 12 días (1ª infección) u 8 días (2ª infección) después de la infección, y se ensayaron para determinar la presencia del virus mediante ensayos de RT-PCR.

Resultados del ensayo de RT-PCR: Figura 29

15 Sumario de resultados: los cobayas inoculados con aislado vírico ned/00/01 muestran infección de las vías respiratorias superiores en el día 1 a 10 después de la infección. Los cobayas inoculados con ned/99/01 muestran infección de las vías respiratorias superiores en el día 1 a 5 después de la infección. Parece que la infección con ned/99/01 es menos severa que la infección con ned/00/01. Una segunda inoculación de los cobayas con el virus heterólogo da como resultado una reinfección en 3 de 4 cobayas, y con el virus homólogo en 2 de 6 cobayas. No se observaron síntomas clínicos, o se observaron muy pocos, en aquellos animales que se re infectaron, y no se observaron síntomas clínicos en aquellos animales que estuvieron protegidos frente a las reinfecciones, demostrando que incluso con el virus de tipo salvaje, es evidente un efecto protector de la primera infección, mostrando el uso posible de aislados heterólogos (y por supuesto homólogos) como una vacuna, incluso en una forma atenuada.

20 Ambos subtipos de hMPV son capaces de infectar cobayas, aunque la infección con el subtipo B (ned/99/01) parece menos severa (período más corto de presencia del virus en la nariz y en la garganta) que la infección con el subtipo A (ned/00/01). Esto puede ser debido a la mayor dosis dada para el subtipo A, o a la menor virulencia del subtipo B.

25 Aunque la presencia de inmunidad preexistente no protege completamente frente a la reinfección tanto con el virus homólogo como heterólogo, parece que la infección es menos prominente por cuanto se observó un período más corto de presencia de virus, y no todos los animales se convirtieron en positivos al virus.

I B. Serología de cobayas infectados con ambos subtipos de hMPV

30 En los días 0, 52, 70, 80, 90, 110, 126 y 160, se recogieron sueros de los cobayas, y se ensayaron a una dilución 1:100 en un ELISA de virus completo frente al antígeno de ned/00/01 y ned/99/01.

Figura 30 A y B: Respuesta de IgG frente a ned/00/01 y ned/99/01 para cada cobaya individual.

Figura 31: Especificidad del ELISA de ned/00/01 y ned/99/01. Sólo se han usado datos de cobayas re infectados homólogos.

35 Figura 32: Respuesta media de IgG frente a ELISA de ned/00/01 y ned/99/01 de 3 cobayas infectados homólogos (00-1/00-1), 2 cobayas infectados homólogos (99-1/99-1), 2 cobayas infectados heterólogos (99-1/00-1) y 2 cobayas heterólogos (00-1/99-1).

Sumario de resultados:

Sólo se observó una pequeña diferencia en la respuesta a los dos ELISA diferentes.

El ELISA de virus completo frente a 00-1 o 99-1 no se puede usar para discriminar entre los dos subtipos.

40 C. Reactividad de los sueros producidos frente a hMPV en cobayas con antígeno de APV

Los sueros recogidos de los cobayas infectados se han ensayado con un ELISA de inhibición de APV.

Figura 33: Porcentaje medio de inhibición de APV de cobayas infectados con hMPV.

Sumario de resultados:

45 Los sueros producidos frente a hMPV en cobayas reaccionan en el ensayo de inhibición de APV de la misma manera como reaccionan en los ELISA de IgG de hMPV.

Los sueros provocados contra ned/99/01 revelan un porcentaje menor de inhibición en el ELISA de inhibición de APV que los sueros provocados contra ned/00/01. Los cobayas infectados con ned/99/01 pueden tener un menor título (como se observa en los ELISA de hMPV), o la reacción cruzada de ned/99/01 con APV es menor que la de ned/00/01. No obstante, el ELISA de inhibición de APV-Ab se puede usar para detectar anticuerpos de hMPV en cobayas.

D. Ensayos de neutralización vírica con sueros provocados frente a hMPV en cobayas.

Los sueros recogidos en el día 0, día 52, 70 y 80 después de la infección se usaron como un ensayo de neutralización (cruzada) vírica con ned/00/01, ned/99/01 y APV-C. La dilución de partida fue 1 a 10, y se usaron 100 TCID₅₀ de virus por pocillo. Después de la neutralización, el virus se llevó sobre células tMK, se centrifugó 15 minutos a 3500 RPM, después de lo cual los medios se refrescaron.

Los ensayos de APV se hicieron crecer durante 4 días, y los ensayos de hMPV se hicieron crecer durante 7 días. Las células se fijaron con acetona al 80%, y se llevaron a cabo los IFAs con anti-hMPV de mono marcado con fitc. Los pocillos que fueron negativos en la tinción se consideraron como el título neutralizante. Para cada virus, se incluyó una titulación de 10-log del lote vírico y una titulación de 2 veces de la disolución de trabajo.

Figura 34: Títulos de neutralización vírica de cobayas infectados con ned/00/01 y ned/99/01 frente a ned/00/01, ned/99/01 y APV-C

2. Macacos cinomolgos

A. (re)infección de macacos cinomolgos con ambos subtítulos de hMPV.

Se han usado aislados víricos ned/00/01 (subtipo A) y ned/99/01 (subtipo B) (1e⁵ TCID₅₀) para inocular 2 macacos cinomolgos por subtipo (intratraqueal, nariz y ojos). Seis meses después de la infección primaria, el macaco se inoculó una segunda vez con ned/00/01. Se recogieron torundas de garganta durante 14 días (1^a infección) u 8 días (2^a infección) después de la infección, y se ensayaron para determinar la presencia del virus mediante ensayos de RT-PCR.

Figura 35: Resultados de ensayos de RT-PCR sobre torundas de algodón de macacos cinomolgos inoculados (dos veces) con ned/ 00/01.

Sumario de resultados:

Sumario de resultados: los macacos cinomolgos inoculados con aislado vírico ned/00/01 muestra infección de las vías respiratorias superiores en el día 1 a 10 después de la infección. Los síntomas clínicos incluyen una rinitis que supura. Una segunda inoculación de los macacos con el virus homólogo da como resultado reinfección, como se demuestra mediante PCR; sin embargo, no se observaron síntomas clínicos.

B. Serología sobre sueros recogidos de macacos cinomolgos infectados con hMPV.

De los macacos que recibieron ned/00/01, se recogieron sueros durante 6 meses tras la infección primaria (la reinfección se produjo en el día 240 para el mono 3, y en el día 239 para el mono 6).

Los sueros se usaron para ensayar la presencia de anticuerpos IgG frente a ned/00/01 o APV, y para determinar la presencia frente a anticuerpos IgA e IgM frente ned/00/01.

Resultados: Figura 36A

Respuesta de IgA, IgM e IgG frente a ned/00/01 de 2 macacos cinomolgos (re)infectados con ned/00/01.

Figura 36B

Respuesta de IgG frente a APV de 2 macacos cinomolgos infectados con ned/00/01.

Sumario de resultados:

Se han infectado con éxito dos macacos con ned/00/01 y en presencia de anticuerpos frente a ned/ 00/01 se re infectaron con el virus homólogo. La respuesta a los anticuerpos IgA e IgM muestra la producción de anticuerpos IgM tras la primera infección, y la ausencia de los mismos tras la reinfección. Los anticuerpos IgA sólo se detectan tras la reinfección, mostrando la inmediatez de la respuesta inmunitaria tras una primera infección.

Los sueros provocados frente a hMPV en macacos que se ensayaron en un ELISA de inhibición de APV muestran una respuesta similar a la de ELISA de IgG de hMPV.

Discusión/conclusión

Los anticuerpos de hMPV en macacos cinomolgos se detectan con el ELISA de inhibición de APV con una sensibilidad similar a la de un ELISA de hMPV, y por lo tanto un EIA de inhibición de APV es adecuado par ensayar muestras humanas para determinar la presencia de anticuerpos de hMPV.

C. Ensayos de neutralización (cruzada) vírica con sueros recogidos de macacos cinomolgos infectados con hMPV

5 Sumario de resultados: Los sueros tomados desde el día 0 al día 229 después de la infección primaria sólo muestran bajos títulos de neutralización vírica frente a ned/00/01 (0-80), y los sueros tomados tras la infección secundaria muestran títulos de neutralización elevados frente a ned/00/01: >1280. Sólo los sueros tomados tras la infección secundaria muestran títulos de neutralización frente a ned/99/01 (80-640), y ninguno de los sueros neutraliza el virus APV C.

10 No hay reacción cruzada entre APV-C y hMPV en ensayos de neutralización (cruzada) vírica, en los que hay una reacción cruzada entre ned/00/01 y ned/99/01 después de un recordatorio de la respuesta de anticuerpo.

3. Seres humanos

Los sueros de pacientes que oscilan en edad <6 meses a >20 años de edad se han ensayado previamente en IFA y ensayos de neutralización vírica frente a ned/00/01. (Véase la tabla 1 de la patente).

15 Aquí se ha ensayado un número de estos sueros en busca de la presencia de anticuerpos IgG, IgM e IgA en un ELISA frente a ned/00/01, y se ensayaron las muestras en el ELISA de inhibición de APV.

20 Resultados: Figura 37 Comparación del uso del ELISA de hMPV y del ELISA de inhibición de APV para la detección de anticuerpos IgG en sueros humanos, hay una fuerte correlación entre el ensayo de IgG hMPV y el ensayo de APV-Ab, y por lo tanto el ensayo de APV-Ab es esencialmente capaz de determinar anticuerpos IgG para hMPV en seres humanos.

4. Aves de corral.

Se han ensayado 96 pollos tanto en el ELISA de inhibición de APV como en el ELISA de ned/00/01 en busca de la presencia de anticuerpos IgG frente a APV.

25 Sumario de resultados: Tanto el ELISA de hMPV como el ELISA de la inhibición de APV detectan anticuerpos frente a APV (datos no mostrados).

Sumario de resultados

Se encontraron dos genotipos de hMPV, siendo ned/00/01 el prototipo del subgrupo A, y ned/99/01 el prototipo del subgrupo B.

30 Según análisis serológicos clásicos (como por ejemplo los conocidos Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., y Brown, F., Classification and nomenclature of viruses Fifth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol, 1991. Supplement 2: p. 140-144), se pueden definir dos subtipos en base a sus diferencias inmunológicas, como se determina mediante ensayos de neutralización cuantitativos con antiseros animales. Dos serotipos distintos no tienen reacción cruzada entre sí o muestran una relación de título homólogo a heterólogo >16 en ambas direcciones. Si la neutralización muestra un cierto grado de reacción cruzada entre dos virus en una o 35 ambas direcciones (relación de título homólogo a heterólogo de ocho o 16), se supone distinción de serotipo si existen diferencias biofísicas/bioquímicas sustanciales de los ADN. Si la neutralización muestra un grado distinto de reacción cruzada entre dos virus en una o ambas direcciones (relación de título homólogo a heterólogo más pequeña que ocho), se supone identidad de serotipo de los aislados bajo estudio.

40 Para RSV, se sabe que la reinfección se produce en presencia de inmunidad preexistente (tanto homóloga como heteróloga). La infección de cobayas y macacos cinomolgos tanto con serotipos homólogos como heterólogos de hMPV reveló que esto es también cierto para hMPV. Además, los ELISA de IgA e IgM frente a hMPV revelaron que la reacción de los anticuerpos IgA sólo se produce tras la reinfección. Los sueros provocados frente a hMPV o APV responden de una manera igual en los ELISAs de APV y hMPV. A partir de las comparaciones de secuencias nucleotídicas, se sabe que los virus muestran alrededor de 80% de homología de aminoácidos para los genes N, P, 45 M y F. En los ELISAs, las proteínas N y M son los antígenos principales a reaccionar. Los ensayos de neutralización vírica (conocidos para reaccionar frente a las glucoproteínas de superficie G, SH y F) muestran una diferencia entre los dos sueros diferentes. Aunque APV y hMPV reaccionan de forma cruzada en los ELISAs, los análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas de hMPV y APV, las diferencias en los títulos de neutralización vírica de sueros provocados frente a los dos virus diferentes, y las diferencias en el uso de hospedantes revelan 50 nuevamente que APV-C y hMPV son dos virus diferentes. Basándose en los resultados, se teoriza que la infección de hMPV en mamíferos es posiblemente un resultado de un suceso zoonótico de pájaros hacia mamíferos. Pero el virus se ha adaptado de tal manera (es decir, las proteínas G y SH) que parece improbable un suceso zoonótico de retorno (de mamíferos a los pájaros), considerando la presencia de AVP en pájaros.

Adenda

Información antecedente sobre *Pneumovirinae*

La familia de *Paramyxoviridae* contiene dos subfamilias: la *Paramyxoviridae* y la *Pneumovirinae*. La subfamilia *Pneumovirinae* consta de dos géneros: *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*. El género *Pneumovirus* contiene los virus sincitiales respiratorios humanos, bovinos, ovinos y caprinos, y el virus de la neumonía de los ratones (PVM). El género *Metapneumovirus* contiene los pneumovirus aviarios (APV, también denominado como TRTV).

La clasificación de los géneros en la subfamilia *Pneumovirinae* se basa en características víricas clásicas, orden génico y constelación génica. Los virus del género *Pneumovirus* son únicos en la familia de *Paramyxoviridae* por cuanto tienen dos proteínas no estructurales en el extremo 3' del genoma (3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'). Por el contrario, los virus del género *Metapneumovirus* carecen de los genes NS1 y NS2, y la organización de los genes entre las regiones codificantes de M y L es diferente: 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'.

Todos los miembros de la subfamilia *Paramyxovirinae* tienen actividad hemoaglutinante, pero esta función no es una característica definitoria para la subfamilia *Pneumovirinae*, estando ausente en RSV y APV pero presente en PMV. La actividad de Neuraminidasa está presente en miembros de los géneros *Paramyxovirus* y *Rubulavirus* (subfamilia *Paramyxovirinae*), pero está ausente en el género *Morbillivirus* (subfamilia *Paramyxovirinae*) y los géneros *Pneumovirus* y *Metapneumovirus* (subfamilia *Pneumovirinae*).

Una segunda característica distintiva de la subfamilia *Pneumovirinae* es la utilización aparente limitada de los ORFs alternativos en ARNm mediante RSV. Por el contrario, varios miembros de la subfamilia *Paramyxovirinae*, tales como los virus de Sendai y de las paperas, acceden a para dirigir la síntesis de una nueva proteína.

La proteína G de los *Pneumovirinae* no tiene relación de secuencia o similitud estructural con las proteínas HN o H de *Paramyxovirinae*, y solamente tienen aproximadamente la mitad del tamaño de su longitud de cadena. Además, las proteínas N y P son más pequeñas que sus contrapartes en las *Paramyxovirinae*, y carecen de homología de secuencia no ambigua. La mayoría de los virus de ARN de cadena negativa no segmentados tienen una única proteína de la matriz (M). Los miembros de la subfamilia *Pneumovirinae* son una excepción por cuanto tienen dos de tales proteínas, M y M2. La proteína M es más pequeña que sus contrapartes de *Paramyxovirinae*, y carece de relación de secuencia con *Paramyxovirinae*.

Cuando se hacen crecer en cultivos celulares, los miembros de la subfamilia *Pneumovirinae* muestran efectos citopáticos típicos; inducen formación característica de sincitios de las células (Collins, 1996).

La subfamilia *Pneumovirinae*, género *Pneumovirus*

hRSV es la especie tipo del género *Pneumovirus*, y es una causa principal y ampliamente extendida de enfermedad del aparato respiratorio inferior durante la infancia y la niñez temprana (Selwyn, 1990). Además, hRSV es reconocido cada vez más como un patógeno importante en otros grupos de pacientes, incluyendo individuos inmunodeficientes y ancianos. RSV es también una causa importante de neumonía adquirida en comunidad entre adultos de todas las edades hospitalizados (Englund, 1991; Falsey, 2000; Dowell, 1996).

Se han identificado dos tipos antigénicos principales para RSV (A y B) basándose en diferencias en su reactividad con anticuerpos monoclonales y policlonales y mediante análisis de secuencias de ácidos nucleicos (Anderson, 1985; Johnson, 1987; Sul-lender, 2000). En particular, la proteína G se usa para distinguir los dos subtipos. RSV-A y B comparten sólo un 53% de homología de secuencia de aminoácidos en G, mientras que las otras proteínas muestran mayores homologías entre los subtipos (tabla 1) (Collins, 1996).

La detección de las infecciones por RSV se ha descrito usando anticuerpos monoclonales y policlonales en técnicas de inmunofluorescencia (DIF, IFA), ensayos de neutralización vírica y ELISA o RT-PCR (Rothbarth, 1988; Van Milaan, 1994; Coggins, 1998). Estrechamente relacionados con hRSV se encuentran el RSV (bRSV), ovino (oRSV) y caprino RSV (cRSV), de los cuales se ha estudiado muy ampliamente el bRSV. Basado en homología de secuencia con hRSV, los RSVs de rumiantes se clasifican dentro del género *Pneumovirus*, subfamilia *Pneumovirinae* (Collins, 1996). El diagnóstico de la infección por RSV de rumiantes y el subtipado se basa en el uso combinado de serología, detección de antígenos, aislamiento vírico y ensayos de RT-PCR (Uttenthal, 1996; Valarcher, 1999; Oberst, 1993; Vilcek, 1994).

Se han llevado a cabo varios análisis en la organización molecular de bRSV usando antisueros humanos y bovinos, anticuerpos monoclonales y sondas de ADNc. Estos análisis revelaron que la composición proteica de hRSV y bRSV es muy similar, y la organización genómica de bRSV se asemeja a la de hRSV. Tanto para bRSV como hRSV, las proteínas G y F representan los antígenos principales de neutralización y protectores. La proteína G es muy variable entre los subtipos de hRSV y entre hRSV y bRSV (53 y 28%, respectivamente) (Prozzi, 1997; Lerch, 1990). Las proteínas F de las cepas de hRSV y bRSV presentan características estructurales y relevancia antigénica comparables. La proteína F de bRSV muestra una homología de 80-81% con hRSV, mientras que los dos subtipos de hRSV comparten un 90% de homología en F (Walravens, K. 1990).

Los estudios basados en el uso de anticuerpos monoclonales específicos de hRSV y bRSV han sugerido la existencia de subtipos antigénicos diferentes de bRSV. Los subtipos A, B y AB se distinguen basándose en patrones

de reacción de anticuerpos monoclonales específicos para la proteína G (Furze, 1994; Prozzi, 1997; Elvander, 1998). La epidemiología de bRSV es muy similar a la de hRSV. La infección espontánea en ganado vacuno joven está asociada frecuentemente con signos respiratorios graves, mientras que la infección experimental generalmente da como resultado una enfermedad más leve con cambios patológicos ligeros (Elvander, 1996).

5 RSV también se ha aislado de ovejas infectadas de forma natural (oRSV) (LeaMaster, 1983) y cabras (cRSV) (Lehmkuhl, 1980). Ambas cepas comparten una secuencia nucleotídica del 96% del RSV bovino, y reaccionan de forma cruzada antigénicamente. Por lo tanto, estos virus también se clasifican dentro del género *Pneumovirus*.

Un miembro distinto de la subfamilia *Pneumovirinae*, género *Pneumovirus* es el virus de la neumonía de ratones (PVM).

10 PVM es un patógeno común en colonias de animales de laboratorio, particularmente aquellas que contienen ratones atímicos. Se piensa que la infección adquirida de forma natural es asintomática, aunque la pasada del virus en pulmones de ratón dio como resultado signos claros de enfermedad, que oscilan desde infección de las vías respiratorias superiores hasta neumonía mortal (Richter, 1988; Weir, 1988).

15 Se ha descrito la reactividad cruzada serológica restringida entre la proteína de la nucleocápside (N) y la fosfoproteína (P) de PVM y hRSV, pero ninguna de las proteínas externas muestra reactividad cruzada, y los virus se pueden distinguir entre sí en ensayos de neutralización vírica (Chambers, 1990a; Gimenez, 1984; Ling, 1989a).

20 Las glucoproteínas de PVM parece que difieren de aquellas de otros paramixovirus, y se asemejan a aquellas de RSV en términos de su patrón de glucosilación. Sin embargo, difieren en términos de procesamiento. A diferencia de RSV, pero similar a los otros paramixovirus, PVM tiene actividad hemoaglutinante con eritrocitos murinos, para la cual la proteína G parece ser responsable puesto que un anticuerpo monoclonal para esta proteína inhibe la hemoaglutinación (Ling, 1989b).

El genoma de PVM se asemeja al de hRSV, incluyendo dos proteínas no estructurales en su extremo 3', y una organización genómica similar (Chambers, 1990a; Chambers, 1990b).

25 Las secuencias nucleotídicas de los genes NS1/NS2 de PVM no son detectablemente homólogas con las de hRSV (Chambers, 1991). Algunas proteínas de PVM muestran una fuerte homología con hRSV (N: 60%, y F: 38 a 40%), mientras que G es muy diferente (la secuencia de aminoácidos es 31% más larga) (Barr, 1991; Barr, 1994; Chambers, 1992). Se ha dado a conocer que el gen P de PVM, pero no el de RSV o APV, codifica un segundo ORF, que representa una proteína de PVM única (Collins, 1996). Se identifican nuevos aislados de PVM mediante aislamiento vírico, ensayos de hemoaglutinación, ensayo de neutralización vírica y diversas técnicas de inmunofluorescencia.

Tabla con adenda: Homología de aminoácidos entre los diferentes virus dentro del género *Pneumovirus* de la subfamilia *Pneumovirinae*.

Gen	hRSV's	bRSVs	oRSV frente a hRSV	bRSV frente a hRSV	bRSV frente a oRSV	PVM frente a hRSV
NS1	87			68-69	89	*
NS2	92			83-84	87	*
N	96		93			60
P	-		81			
M	-		89			
F	89			80-81		38-40
G	53	88-100	21-29	38-41	60-62	*
M2	92		94			41
SH	76		45-50		56	
L	-					

Gen	hRSV's	bRSVs	oRSV frente a hRSV	bRSV frente a hRSV	bRSV frente a oRSV	PVM frente a hRSV
*Homología de secuencia no detectable						

El género *Metapneumovirus*

Se han identificado los pneumovirus aviares (APV) como el agente etiológico de la rinitis del pavo (McDougall, 1986; Collins, 1988), y por lo tanto a menudo se denomina como el virus de la rinitis del pavo (TRTV). La enfermedad es una infección de las vías respiratorias superiores de los pavos, que da como resultado morbilidad elevada y mortalidad variable, pero a menudo elevada. En hembras de pavo, el virus también puede inducir reducciones sustanciales en la producción de huevos. El mismo virus también puede infectar a los pollos, pero en esta especie, el papel del virus como patógeno primario está menos claramente definido, aunque normalmente está asociado con el síndrome de cabeza hinchada (SHS) en pollo de criador (Cook, 2000).

Los viriones son pleiomórficos, aunque principalmente esféricos, con tamaños que oscilan de 70 a 600 nm, y la nucleocápside que contiene el genoma de ARN de sentido negativo, no segmentado, lineal, muestra simetría helicoidal (Collins, 1986; Giraud, 1986). Esta morfología se asemeja a la de los miembros de la familia *Paramyxoviridae*. Los análisis de las proteínas y ARNs codificados por APV sugieren que de las dos subfamilias de esta familia (*Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*), el APV se asemeja muy estrechamente a los *Pneumovirinae* (Collins, 1988; Ling, 1988; Cavanagh, 1988).

APV no tiene proteínas no estructurales (NS1 y NS2), y el orden génico (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') es diferente de los pneumovirus de mamíferos tales como RSV. Por lo tanto, APV se ha clasificado recientemente como la especie tipo para el nuevo género *Metapneumovirus* (Pringle, 1999).

Las diferencias en los patrones de neutralización, ELISA y reactividad con anticuerpos monoclonales han revelado la existencia de tipos antigénicos de APV diferentes. La secuenciación nucleotídica del gen G condujo a la definición de dos subtipos víricos (A y B), que comparten sólo una homología de aminoácidos de 38% (Collins, 1993; Juhasz, 1994). Se mostró que un aislado de APV de Colorado, USA (Cook, 1999), se neutraliza pobremente de forma cruzada con virus del subtipo A y B, y basándose en la información de secuencia se designó a un nuevo subtipo, C (Seal, 1998; Seal 2000). Se aislaron dos APVs noA/noB en Francia, y se mostró que son antigénicamente distintos de los subtipos A, B y C. Basándose en las secuencias de aminoácidos de los genes F, L y G, estos virus se clasificaron nuevamente como un nuevo subtipo, D (Bayon-Auboyer, 2000).

El diagnóstico de la infección por APV se puede lograr mediante aislamiento vírico en cultivos de órganos traqueales (TOCs) de pollos o pavos, o en cultivos de células Vero. Generalmente se observa un efecto citopático (CPE) después de una o dos pasadas adicionales. Este CPE se caracteriza por áreas focales dispersas de redondeamiento celular, conduciendo a la formación de sincitios (Buys, 1989). Se ha desarrollado un número de ensayos serológicos, incluyendo IF y ensayos de neutralización vírica. La detección de anticuerpos para APV mediante ELISA es el método más normalmente usado (O'Loan, 1989; Gulati, 2000). Recientemente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha usado para diagnosticar infecciones por APV. Las torundas tomadas del esófago se pueden usar como el material de partida (Bayon-Auboyer, 1999; Shin, 2000).

Alansari, H. y Potgieter, L.N.D. 1994. Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the ovine respiratory syncytial virus non-structural 1C and 1B genes and the small hydrophobic protein gene. *J.Gen.Virol.* 75: 401-404.

Alansari, H., Duncan R.B., Baker, J.C. y Potgieter, L.N. 1999. Analysis of ruminant respiratory syncytial virus isolates by RNase protection of the G glycoprotein transcripts. *J.Vet.Diagn.Invest.* 11: 215-20

Anderson, L.J., Hierholzer, J.C., Tsou, C., Hendry, R.M., Fernic, B.F., Stone, Y. y McIntosh, K 1985. Antigenic characterisation of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Inf. Dis.* 151: 626-633.

Barr, J., Chambers, Pringle, C.R., Easton, A.J. 1991. Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J.Gen.Virol.* 72: 677-685.

Barr, J., Chambers, P., Harriott, P., Pringle, C.R. y Easton, A.J. 1994. Sequence of the phosphoprotein gene of pneumonia virus of mice: expression of multiple proteins from two overlapping reading frames. *J. Virol.* 68: 5330-5334.

Bayon-Auboyer, M.H., Jestin, V., Toquin, D., Cherbonnel, M. y Eterradosi, N. 1999. Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Arch.Vir.* 144: 1091-1109.

- Bayon-Auboyer, M.H., Arnauld, C., Toquin, D., y Etteradossi, N. 2000. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J. Gen. Virol.* 81: 2723-2733.
- 5 Buys, S.B., Du Preez, J.H. y Els, H.J. 1989. The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 56: 87-98.
- Cavanagh, D. y Barrett, T. 1988. Pneumovirus-like characteristics of the mRNA and proteins of turkey rhinotracheitis virus. *Virus Res.* 11: 241-256.
- Chambers, P., Pringle, C.R. y Easton, A.J. 1990a. Molecular cloning of pneumonia virus of mice. *J. Virol.* 64: 1869-1872.
- 10 Chambers, P., Matthews, D.A, Pringle, C.R. y Easton, A.J. 1990b. The nucleotide sequences of intergenic regions between nine genes of pneumonia virus of mice establish the physical order of these genes in the viral genome. *Virus Res.* 18: 263-270.
- Chambers, P., Pringle, C.R., y Easton, A.J. 1991. Genes 1 and 2 of pneumonia virus of mice encode proteins which have little homology with the 1C and 1B proteins of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Vir.* 72: 2545-2549.
- 15 Chambers, P. Pringle CR, Easton AJ. 1992. Sequence analysis of the gene encoding the fusion glycoprotein of pneumonia virus of mice suggests possible conserved secondary structure elements in paramyxovirus fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 73: 1717-1724.
- Coggins, W.B., Lefkowitz, E.J. y Sullender, W.M. 1998. Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3552-3557.
- 20 Collins, M.S. and Gough, R.E., Lister, S.A., Chettle, N. y Eddy, R. 1986. Further characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis. *Vet. Rec.* 119: 606.
- Collins, M.S. y Gough, R.E. 1988. Characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis. *J. Gen.Virol.* 69: 909-916.
- 25 Collins, M.S., Gough, R.E., y Alexander, D.J. 1993. Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. *Avian Pathology* 22: 469-479.
- Collins, P.L., McIntosh, K., Chanock, R.M. 1996. Respiratory syncytial virus. P. 1313-1351. en: B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley (ed.). *Fields virology*, 3ª ed., vol. 1 Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa, USA.
- Cook, J.K.A., Huggins, M.B., Orbell, S.J. y Senne, D.A. 1999. Preliminary antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA. *Avian pathol.* 28: 607-617.
- 30 Cook, J.K.A. 2000. Avian rhinotracheitis. *Rev. Sci.tech. off int. Epiz.* 19: 602-613.
- Dowell, S.F., Anderson, L.J., Gary, H.E., Erdman, D.D., Plouffe, J.F., File, T.M., Marston, B.J. y Breiman, R.F. 1996. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. *J. Infect. Dis.* 174: 456-462.
- 35 Elvander, M. 1996. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Rec.* 138: 101-105.
- Elvander, M., Vilcek, S., Baule, C., Uttenthal, A., Ballagi-Pordany, A. y Belak, S. 1998 Genetic and antigenic analysis of the G attachment protein of bovine respiratory syncytial virus strains. *J. Gen. Virol.* 79: 2939-2946.
- Englund, J.A., Anderson, L.J., y Rhame, F.S. 1991. Nosocomial transmission of respiratory syncytial virus in immunocompromised adults. *J. Clin. Microbiol.* 29: 115-119.
- 40 Falsey, A.R. y Walsh, E.E. 2000. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin. Microb. Rev.* 13: 371-84.
- Furze, J., Wertz, G., Lerch, R. y Taylor, G. 1994. Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 75: 363-370.
- Gimenez, H.B., Cash, P. y Melvin, W.T. 1984. Monoclonal antibodies to human respiratory syncytial virus and their use in comparison of different virus isolates. *J. Gen. Virol.* 65: 963-971.
- 45 Gulati, B.R., Cameron, K.T., Seal, B.S, Goyal, S.M., Halvorson, D.A. y Njenga, M.K 2000. Development of a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant matrix protein for detection of avian pneumovirus antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4010-4.

- Johnson, P.R., Spriggs M.K., Olmsted, R.A. y Collins, P.L. 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5625-5629.
- 5 Juhasz, K. y Easton, A.J. 1994. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.* 75: 2873-2880.
- LeaMaster, B.R., Evermann, J.F., Mueller, M.K., Prieur, M.K. y Schlie, J.V. 1983. Serologic studies on naturally occurring respiratory syncytial virus and Haemophilus sommus infections in sheep. *American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians* 26: 265-276.
- 10 Lehmkuhl, H.D., Smith, M.H., Cutlip, R.C. 1980. Morphogenesis and structure of caprine respiratory syncytial virus. *Arch.Vir.* 65: 269-76.
- Lerch, R.A., Anderson, K y Wertz, G.W. 1990. Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 64: 5559-5569.
- 15 Ling, R. y Pringle, C.R. 1988. Turkey rhinotracheitis virus: in vivo and *in vitro* polypeptide synthesis. *J. Gen. Virol.* 69: 917-923.
- Ling, R. y Pringle, C.R. 1989a. Polypeptides of pneumonia virus of mice. I. Immunological cross-reactions and post-translational modifications. *J. Gen. Virol.* 70: 1427-1440.
- Ling, R. y Pringle, C.R. 1989b. Polypeptides of pneumonia virus of mice. II. Characterization of the glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 70: 1441-1452.
- 20 McDougall, J.S. y Cook, J.K.A. 1986. Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations. *Vet. Rec.* 118: 206-207.
- Oberst, R.D., M.P. Hays, K.J. Hennessy, L.C. Stine, J.F. Evermann, y Kelling, C.L. 1993. Characteristic differences in reverse transcription polymerase chain reaction products of ovine, bovine and human respiratory syncytial viruses. *J. Vet. Diagn. Investig.* 5: 322-328.
- 25 O'Loan, C.J., Allan, G., Baxter-Jones, C. y McNulty, M.S. 1989. An improved ELISA and serum neutralisation test for the detection of turkey rhinotracheitis virus antibodies. *J. Virol. Meth.* 25: 271-282.
- Paccaud, M.F. y Jacquier, C., 1970. A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Arch. Ges. Virusforsch.* 30: 327-342.
- Pringle, C.R. 1999 Virus taxonomy at the Xith international congress of virology, Sydney, Australia 1999. *Arch. Virol.* 144/2: 2065-2070.
- 30 Prozzi, D., Walravens, K., Langedijk, J.P.M, Daus, F., Kramps, J.A. y Letesson, J.J. 1997. Antigenic and molecular analysis of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 78: 359-366.
- Randhawa, j.S., Marriott, A.C., Pringle, C.R., y A.J. Easton 1997. Rescue of synthetic minireplicons establish the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumoviruses. *J. Virol.* 71: 9849-9854.
- 35 Richter, C.B., Thigpen, J.E., Richter, C.S. y Mackenzie, J.M. 1988. Fatal pneumonia with terminal emaciation in nude mice caused by pneumonia virus of mice. *Lab. Anim. Sci.* 38: 255-261.
- Rothbarth, P.H., Habova, J.J. y Masurel, N. 1988. Rapid diagnosis of infections caused by respiratory syncytial virus. *Infection* 16:252.
- Seal, B.S. 1998. Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. *Virus Res.* 58, 45-52.
- 40 Seal, B.S., Sellers, H.S., Meinersmann, R.J. 2000. Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. *Virus Res.* 66: 139-147.
- Selwyn, B.J. 1990. The epidemiology of acute respiratory tract infection in young children: comparison findings from several developing countries. *Rev. Infect. Dis.* 12: S870-S888.
- 45 Shin, H.J., Rajashekara, G., Jirjis, F.F., Shaw, D.P., Goyal, S.M., Halvorson, D.A. y Nagaraja, K.V.2000. Specific detection of avian pneumovirus (APV) US isolates by RT-PCR. *Arch. Virol.* 145: 1239-1246.
- Sullender, W.M. 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin. Microb. Rev.* 13: 1-15.
- Trudel, M., Nadon, F., Sinnard, C., Belanger, F., Alain, R., Seguin, C. y Lussier, G. 1989. Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus. *Arch. Vir.* 107: 141-149.

Uttenthal, A., Jensen, N.P.B. y Blom, J.Y. 1996. Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds, diagnostic tools and epidemiology. *Vet. Rec.* 139, 114-117.

5 Valarcher, J., Bourhy, H., Gelfi, J. y Schelcher, F. 1999. Evaluation of a nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections. *J. Clin. Microb.* 37: 1858-1862

Van Milaan, A.J., Sprenger, J.J., Rothbarth, P.H., Brandenburg, A.H., Masurel, N. y Claas, E.C. 1994. Detection of respiratory syncytial virus by RNA-polymerase chain reaction and differentiation of subgroups with oligonucleotide probes. *J. Med. Virol.* 44:80-87.

10 Vilcek, S., Elvander, M., Ballagi-Pordany, A., y Belak, S. 1994. Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. *J. Clin. Microb.* 32: 2225-2231.

Walravens, K., Kettmann, R., Collard, A., Coppe, P. y Burny, A. 1990. Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses. *J. Gen. Virol.* 71: 3009-3014.

Weir, E.C., Brownstein, D.G., Smith, A.L. y Johnson, E.A. 1988. Respiratory disease and wasting in athymic mice infected with pneumonia virus of mice. *Lab. Anim. Sci.* 34: 35-37.

REIVINDICACIONES

1. Metapneumovirus de mamífero aislado con ARN monocatenario y de sentido negativo, en el que:

la secuencia de aminoácido de la proteína N del metapneumovirus de mamífero aislado con ARN monocatenario y de sentido negativo es idéntico al 91% con la secuencia de aminoácido de la proteína N de SEC ID nº 1 ó 91, en la que la identidad de secuencia de determina sobre toda la longitud de la proteína N.

2. Metapneumovirus de mamífero aislado con ARN monocatenario y de sentido negativo según la reivindicación 1, en el que el metapneumovirus de mamífero aislado con ARN monocatenario y de sentido negativo codifica también:

(a) una proteína P que tiene una identidad de secuencia mayor que 68% con la secuencia de aminoácido de la proteína P de la SEC ID nº 8 ó 92;

(b) una proteína M que tiene una identidad de secuencia mayor que 87% con la secuencia de aminoácido de la proteína M de la SEC ID nº 14 ó 93;

(c) una proteína F que tiene una identidad de secuencia mayor que 81% con la secuencia de aminoácido de la proteína F de la SEC ID nº 21 ó 94;

(d) una proteína M2-1 que tiene una identidad de secuencia mayor que 84% con la secuencia de aminoácido de la proteína M2-1 de la SEC ID nº 47 ó 95;

(e) una proteína M2-2 que tiene una identidad de secuencia mayor que 56% con la secuencia de aminoácido de la proteína M2-2 de la SEC ID nº 55 ó 96;

(f) una proteína L que tiene una identidad de secuencia mayor que 90% con la secuencia de aminoácido de la proteína L de la SEC ID nº 99 ó 100;

(g) una proteína SH que tiene una identidad de secuencia mayor que 29% con la secuencia de aminoácido de la proteína SH de la SEC ID nº 63 ó 97; o

(h) una proteína G que tiene una identidad de secuencia mayor que 29% con la secuencia de aminoácido de la proteína G de la SEC ID nº 64 ó 98;

en la que la identidad de secuencia se determina sobre toda la longitud de la proteína respectiva.

3. Metapneumovirus de mamífero aislado con ARN monocatenario y de sentido negativo según la reivindicación 1, en el que el metapneumovirus de mamífero aislado con ARN monocatenario y de sentido negativo codifica:

(a) una proteína P que tiene una identidad de secuencia mayor que 68% con la secuencia de aminoácido de la proteína P de la SEC ID nº 8 ó 92;

(b) una proteína M que tiene una identidad de secuencia mayor que 87% con la secuencia de aminoácido de la proteína M de la SEC ID nº 14 ó 93;

(c) una proteína F que tiene una identidad de secuencia mayor que 81% con la secuencia de aminoácido de la proteína F de la SEC ID nº 21 ó 94;

(d) una proteína M2-1 que tiene una identidad de secuencia mayor que 84% con la secuencia de aminoácido de la proteína M2-1 de la SEC ID nº 47 ó 95;

(e) una proteína M2-2 que tiene una identidad de secuencia mayor que 56% con la secuencia de aminoácido de la proteína M2-2 de la SEC ID nº 55 ó 96;

(f) una proteína L que tiene una identidad de secuencia mayor que 90% con la secuencia de aminoácido de la proteína L de la SEC ID nº 99 ó 100;

(g) una proteína SH que tiene una identidad de secuencia mayor que 29% con la secuencia de aminoácido de la proteína SH de la SEC ID nº 63 ó 97; y

(h) una proteína G que tiene una identidad de secuencia mayor que 29% con la secuencia de aminoácido de la proteína G de la SEC ID nº 64 ó 98,

en la que la identidad de secuencia se determina sobre toda la longitud de la proteína respectiva.

4. Metapneumovirus de mamífero aislado con ARN monocatenario y de sentido negativo según la reivindicación 1, en el que el genoma del virus comprende una secuencia nucleotídica, en la que dicha secuencia nucleotídica es idéntica a al menos el 90% con la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 36, 38 ó 40.

5. Virus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, no replicándose el virus en la especie aviar.
6. Virus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, siendo el virus un virus atenuado.
7. Composición inmunogénica, comprendiendo dicha composición inmunogénica el virus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, siendo preferiblemente el virus recombinante un virus atenuado.
- 5 8. Ácido nucleico aislado, codificando el ácido nucleico un virus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
9. Ácido nucleico aislado, hibridándose el ácido nucleico específicamente en condiciones muy restrictivas con el ácido nucleico según la reivindicación 8, preferiblemente las condiciones muy restrictivas comprenden la hibridación, en un tampón compuesto de 6x SSC, 50 mM (pH = 7,5), 1 mM de EDTA, 0,02% de PVP, 0,02% de Ficoll, 0,02% de BSA y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, durante 48 horas a 65°C, el lavado en un tampón compuesto de 2X SSC, 0,01% de PVP, 0,01% de Ficoll y 0,01 de BSA, durante 45 minutos a 37°C y el lavado en un tampón que contiene 0,1 x SSC, durante 45 minutos a 50°C.
- 10 10. Procedimiento de detección de un metapneumovirus de mamífero en una muestra, comprendiendo el procedimiento la puesta en contacto de la muestra con el ácido nucleico según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, siendo el MPV de mamífero preferiblemente un MPV humano.
- 15 11. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 8 ó 9.
12. Célula hospedante que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 8 ó 9.
13. Proteína aislada, siendo la proteína derivada del virus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
14. Anticuerpos, enlazándose el anticuerpo específicamente al virus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 20 15. Procedimiento de detección de un metapneumovirus de mamífero en una muestra, comprendiendo el procedimiento la puesta en contacto de la muestra con el anticuerpo según la reivindicación 14.
16. Procedimiento de diagnóstico virológico de una infección por MPV en un mamífero, que comprende la determinación en una muestra de la presencia de dicho aislado de virus o de un componente de este mediante la puesta en contacto de la muestra con el ácido nucleico según las reivindicaciones 8 ó 9.
- 25 17. Procedimiento de diagnóstico serológico de una infección por MPV en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la detección en una muestra extraída en un mamífero de la presencia de un anticuerpo específicamente dirigido contra un MPV o un componente de este mediante la reacción de dicha muestra con la proteína según la reivindicación 13.
- 30 18. Composición farmacéutica, comprendiendo dicha composición farmacéutica (i) un virus MPV de mamífero aislado con ARN monocatenario de sentido negativo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
19. Composición farmacéutica según la reivindicación 18, codificando el genoma del virus además secuencias de otros virus, o no teniendo dicho genoma del virus ninguna parte del genoma vírico para la generación de la replicación de virus defectuoso, y puede contener mutaciones, supresiones o inserciones para la generación de virus atenuados.
- 35 20. Kit de diagnóstico de una infección por MPV que comprende un virus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un ácido nucleico según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, una proteína o un fragmento de esta según la reivindicación 13 o un anticuerpo según la reivindicación 14.
21. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 7, 18 ó 19, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección por MPV o una enfermedad respiratoria.
- 40 22. Procedimiento según la reivindicación 16, teniendo el ácido nucleico una longitud de al menos 18, de al menos 20, de al menos 23 o de al menos 25 nucleótidos.
23. Composición farmacéutica según la reivindicación 19, siendo el otro virus un paramixovirus de tipo 3 (PI3).
24. Composición farmacéutica según la reivindicación 23, que comprende una secuencia nucleotídica de RSV.
- 45 25. Virus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; la composición inmunogénica según la reivindicación 7; o la composición farmacéutica según la reivindicación 18 o la reivindicación 19, siendo el virus un aislado de MPV humano 00-1 depositado en el CNCM, Instituto Pasteur con un número de acceso I-2614.
26. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 17, 18 ó 19 para su utilización en el tratamiento o prevención de una infección por MPV o una enfermedad respiratoria.

Tabla 1

M							
	00-1	hRSV	bRSV	PMV	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,37	0,37	0,37	0,77	0,87	0,75
hRSV	---	1,00	0,91	0,41	0,37	0,37	0,37
bRSV	---	---	1,00	0,42	0,35	0,36	0,35
PMV	---	---	---	1,00	0,37	0,38	0,38
APV-A	---	---	---	---	1,00	0,78	0,89
APV-C	---	---	---	---	---	1,00	0,77
APV-B	---	---	---	---	---	---	1,00
N							
	00-1	hRSV	bRSV	PVM	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,20	0,22	0,21	0,40	0,52	0,40
hRSV	---	1,00	0,59	0,30	0,18	0,21	0,18
bRSV	---	---	1,00	0,31	0,21	0,23	0,21
PVM	---	---	---	1,00	0,21	0,23	0,21
APVA	---	---	---	---	1,00	0,42	1,00
APVC	---	---	---	---	---	1,00	0,42
APVB	---	---	---	---	---	---	1,00
F							
	00-1	hRSV	bRSV	PVM	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,32	0,33	0,37	0,67	0,80	0,66
hRSV	---	1,00	0,82	0,40	0,35	0,35	0,35
bRSV	---	---	1,00	0,41	0,34	0,36	0,34
PVM	---	---	---	1,00	0,38	0,38	0,39
APV-A	---	---	---	---	1,00	0,72	0,84
APV-C	---	---	---	---	---	1,00	0,72
APV-B	---	---	---	---	---	---	1,00
P							
	00-1	hRSV	bRSV	PMV	APV-A	APV-C	
00-1	1,00	0,25	0,26	0,27	0,55	0,67	
hRSV	---	1,00	0,81	0,30	0,28	0,26	
bRSV	---	---	1,00	0,29	0,28	0,26	
PMV	---	---	---	1,00	0,23	0,27	
APV-A	---	---	---	---	1,00	0,52	
APV-C	---	---	---	---	---	1,00	
L8							
	00-1	hRSV	bRSV	APV-A			
00-1	1,00	0,36	0,35	0,56			
hRSV	---	1,00	0,79	0,36			
bRSV	---	---	1,00	0,35			
APV-A	---	---	---	1,00			
L9/10							
	00-1	hRSV	bRSV	APV-A			
00-1	1,00	0,30	0,30	0,53			
hRSV	---	1,00	0,83	0,34			
bRSV	---	---	1,00	0,32			
APV-A	---	---	---	1,00			

Fig. 1a

Tabla 2

Seroprevalencia de hMPV en seres humanos categorizados por grupo de edad usando ensayos de inmunofluorescencia y de neutralización vírica

Edad (Años)	Ensayos de inmunofluorescencia		Ensayos de neutralización vírica		Intervalo del título
	N ensayados	N positivos	N ensayados	N positivos	
< 1	20	5	12	3	16-32
1-2	20	11	13	4	16-32
2-5	20	14	8	3	16-512
5-10	20	20	4	4	32-256
10-20	20	20	4	3	32-128
> 20	20	20	4	3	32-128
8-99 ¹	72	72	11	11	16-128

¹Análisis serológico usando sueros recogidos en 1958

Fig. 1b

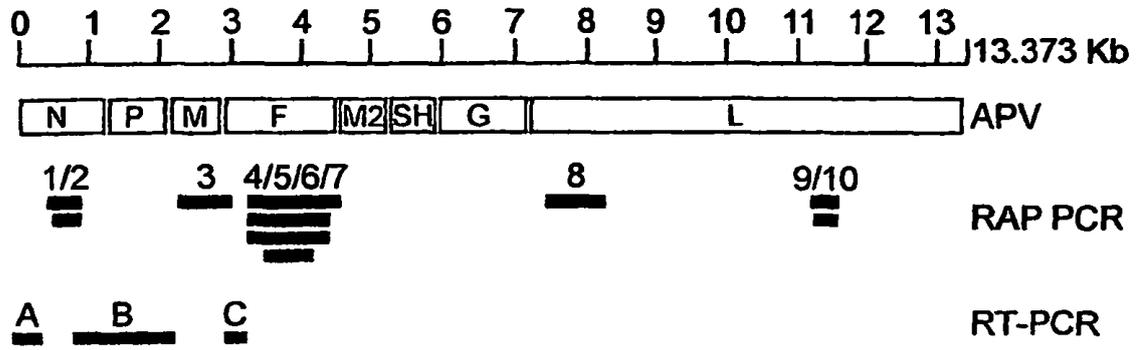


Fig. 2

Fig. 3

Nucleoproteína

00-1 NP	MSLQGIHLSDLSYKHAALKESQYTIKRDVGTITAVTPSSIQEITLLCGEILYAKHADYKAAEIGIQYISTALGSEVQQTIRNSGSEVQVWLTITYSL	10
APV A	...ES.R...E...ED...R...A...I...E...PQVST...MV.F...T...EP...V.M...AD.T...K...G.M.RIVP.	10
APV B	...Q...R.VS...T...SH...V.M.V...T.A.T...K...A...K...	10
APV C	...Q...R.VS...T...SH...V.M.V...T.A.T...K...A...K...	10
brSV	.A.SKVK.N.TFN.DQL.ST.K...Q.ST.DNIDIPNYDV.KHLNK...ML.ITED.NH.FTGL.ML.AMSR.R.DTLK.KDA.YQ.RANGVDVITH	10
hrSV	.A.SKVK.N.TLN.DQL.SS.K...Q.ST.DNIDIPNYDV.KHLNK...ML.ITED.NH.FTGL.ML.AMSR.R.DTIK.KDA.YH.KANGVDITTY	10
FVM	...DRLK.N.V.N.DSL.SNCK.SVT.ST.DV.S.SGHAM.KALARTL.MF.LTAFNRCEEV...L.AMSL.RRDSIK...EA.YN.KC.D.QLKDF	10
00-1 NP	GKTKNKGEDLQMLDIHGVEKSWVEEIKKARKMATLLKSSGNIQONRPSAPDTPIIILLCVGLIFTKLASTIEVGLLETTVRRANRVLSDALKRYPR	20
APV A	SAEGSVRKREV...N.D.GVG.ADDVERTT.EA.GAMVR.KV-QLTK...K...L.A.V...I...V...AI...S...IS...	19
APV B	...G...S...E...R...I...V...SAT.DN.P...S.A...I...A...N...F...	20
APV C	...G...S...E...R...I...V...SAT.DN.P...S.A...I...A...N...F...	20
brSV	RQDV.G.EMKFEV.TLVSLTSEVQGN.EI.S.SYKGM...M.EVAPEY.HDS.CGM.V...A.VI...AGDRS.TAVI...N.RNEM...KG	19
hrSV	RQDI.G.EMKFEV.TLVSLTSEIQVN.EI.S.SYKGM...M.EVAPEY.HDS.CGM.I...IA.VI...AGDRS.TAVI...N.RNEI...KG	19
FVM	TIHLQG.EYKI.V...V.IDAANLADLEIQ.GVV.KE.TG-ARL.D.R.HD...CGV.V...IA.VVS...AGDRG.DAVE...LN.KAEKA...N	19
00-1 NP	MDIPKLIARSFYDLFEQKVYHRSLEFTEYKALGSSSTGSKAESLFVNIEMQAYGAGQTMIRWGVIRASSNNIMLGHVSVQAEKQVTEVYDLVREMGPESG	30
APV A	...R...K...FE...K...Y.N...T...RM...R...S...K...	29
APV B	I...Y...	30
APV C	I...Y...	30
brSV	LIPKD...N...EV...KYPHYIDV.VHF.I.QS.TRG.RV.GI.AGL.N...V...L.K.VK...A...ME.V...EYAKQL.G.A	29
hrSV	LIPKD...N...EV...KHPHLIDV.VHF.I.QS.TRG.RV.GI.AGL.N...S.V...L.K.VK...A...ME.V...EYAKQL.G.A	29
FVM	.EVKQ...E...R.P.YIDV.TF.L.QS.VRG...V.G.SGL.N...V...LL.K.VK...A...ME.V...EYAKQK.G.A	29
00-1 NP	LLHLRQSPKAGLLSLANCPNFASVVLGNASGLGIQMYRGRVPMTELPSAESAESYAKSLKESNKNFSSGLTDEEKEAHEFIVNSDDSQNDYE	39
APV A	...T...A...K.A.L.A...RT.R.N...LAA...D.R...TSY.GGD.ERSSKF.	39
APV B	...N...L...A...R...E...N...INEEG...	39
APV C	...N...L...A...R...E...N...INEEG...	39
brSV	FY.I.LAN...S...TQF...S...A...M.E...TPR.QD.YD.KA.EQ...NGV.Y.V.D.T.L.IKNQ.PK.N-DVEL	39
hrSV	FY.I.LAN...S...TQF...S...A...M.E...TPR.QD.YD.KA.EQ...NGV.Y.V.D.A.L.IKNQ.PKE.-DVEL	39
FVM	FY.I.NN...S...T...T...A...S.K.APR.R...D.KD.ER.DN.V.Y.A.N.A.R.LISQQ.IV.TPD.DI	39

Fosfoproteína

00-1 P	MS-FPEGKDIILFMGNEAAKLAFAF-----QKSLRKPQHKRSQSIIGEKVNTVSETLELPTISRPAKPTIPSEFKLAWTDKGGATKTEIKQAIKVMDP	91
APV-A	...M...S...M.D.Y-----R...NTSAG-GR...S...PI...IA.KVP...PLCN.TT-----SCI.PNKAPVP.K--	76
APV-C	...L...A...-----R...K.I.R.T...V.D.II...V.K...KST.V.T.P.R.N...GE.PDT.RSQTEE.RNEAT.	91
brSV	-----	80
hrSV	.EK.APE---.H.ED.NNK.TK.LES-----IKGKF-----ASSKPKK.DS.ISVNS	45
FVM	.EK.APE---.V.ED.N.K..E.LKHSFPSE.P.AGIPNTATHVTKYNMPPILRSSEK..SPRVA.NL.E..A.---PTTFPP.PPQN.EEQPKESD	92
00-1 P	IEEEESTEKVLPSSDGKTPAEKLLKPFSTNT---KQKVSFTPNEP---GKYTKLEKDALDLLSDNEEEDAE-SSILTTEE---RDTSSLSIEARLESIE	18
APV-A	---I...IYP.LPTAPVATDPTSTSTE.AKK---S...K.DNPKV---EEG.E...P...DND.K...K.A.T...A..	16
APV-C	EDASRLY.EVFA.T...GKETPEKP---T.KND.S---R...ME..E...DD...V...K...A..L...D	18
brSV	-----	16
hrSV	.DI.VTK.SPITSGINIIN.TSEADSTPETKANYR.PL...KEDLTPSDNPF.S.Y.ETIETF---DNN---EE.SYSY..INDQ.-NDN.T...DR.D	13
FVM	VDI.TMHVC..PDNPEHSHKPKCCDDTD.KKT---R.PM.T.VEP.EKFV.LGAS.YRETMQTF---AADGYDEE.N.S...TNQEPG.S.V.Q..DR..	18
00-1 P	EKLSMILGLLRTINATAGPTAARDGIRDAMIGVREELIADIYKEA---KKAEM---MEEEMQORSKIGNKSVKLTAKELNKQVEDESTSGESEEE	27
APV-A	...M.K...M...NS.MT...D.I...K...DT.A...D...L.Q.S...S.	25
APV-C	...V...V.L...K...AK.K...G...	27
brSV	-----X-----	26
hrSV	...E...M.H..VV.S...S...V.L...M.EK.RA.LMTNDRLEA.ARLRN..SEKMA.DTSDE.P.NPTS.K.SDLL..N-----	23
FVM	...Y.I...N.IMV...T...E...L...T...EM.KSDILTVNDRIVA.EKLRD..CSRADTDDGSACY...DR.RI.D...SSNA-----	27
00-1 P	EEPKDTQDNSQEDDIY---QLIM.	29
APV-A	.SGESEDEE.S...NLDL..L	28
APV-C	.EE.EEESNPD..L.SLTM..LIK	29
brSV	-----	28
hrSV	---SDNDLSL.---DF.	24
FVM	---EEAKEDLDV...MGINF..LI	29

Fig. 3, cont.

Proteína de la matriz

00-1 matriz	MESYLVDYVYQGIPTAAVQVDLIEKDLFLASLTYWFFLFQANTPPAVLLDQLKLTITTTLYAASQNGPILKVNASQGAAMFVLKPKFEVNAVAXDEYS	10
APV-B	...II...V...V...NN...K...V...SS...AP...S...Q...TV...FE...V...Q...T...SA...S...S...AA...L...D...G...10	10
APV-A	...II...V...SN...T...V...SS...AP...S...Q...T...FE...V...Q...A...SA...A...S...A...L...D...G...10	10
APV-C	...V...T...V...Q...R...V...V...T...T...E...T...SA...S...D...S...L...D...G...10	10
hRSV	...T...V...N...K...L...H...E...S...T...Y...N...V...D...D...V...M...S...S...I...S...A...D...L...I...K...E...I...N...V...N...L...V...R...Q...I...S...T...L...K...S...I...M...I...N...S...R...S...V...L...A...Q...M...S...T...I...S...N...S...L...R...10	10
hRSV	...T...V...N...K...L...H...E...S...T...Y...N...V...L...D...D...V...M...S...S...V...A...D...L...I...K...E...A...S...I...N...L...V...R...Q...I...S...T...P...K...S...R...T...I...N...S...R...S...V...L...A...Q...M...S...N...I...S...N...S...L...R...10	10
PvM	...A...E...M...H...V...L...N...V...H...S...A...N...I...V...I...M...T...S...L...K...N...S...V...M...L...H...D...V...I...C...T...Q...I...S...T...V...H...M...I...D...L...S...S...N...G...L...A...M...R...Q...L...I...I...L...D...W...G...10	10
00-1 matriz	KLEFDKLTIVCEVKTVYLTMPKPYGMVSKFVSSAKSVGKKTDLIALCDFMLEKNTPTVTIPAFIKSVSIKESASATVEAAISSEADQALTOAKIAPYAGL	20
APV-B	...D...G...V...D...R...A...L...I...T...N...M...T...R...I...M...R...G...I...Y...A...D...G...I...R...20	20
APV-A	R...GT...D...R...S...I...L...I...M...T...D...V...R...I...I...G...V...I...Y...A...D...G...I...R...20	20
APV-C	...L...A...N...A...L...G...V...Y...G...I...R...20	20
hRSV	...A...Y...I...T...P...I...A...C...S...C...L...V...K...N...L...T...T...V...K...D...L...M...K...T...F...N...P...E...I...E...N...I...M...T...S...K...R...V...T...L...R...I...N...V...A...K...D...L...S...L...N...I...A...T...T...F...K...N...I...N...I...20	20
hRSV	...A...Y...V...T...P...I...A...C...S...C...L...V...K...S...L...T...T...V...K...D...L...M...K...T...F...N...P...E...I...E...N...I...M...T...S...K...R...I...T...Y...L...R...I...V...N...K...D...L...S...L...N...I...A...T...T...F...K...N...I...N...I...20	20
PvM	NMDYEVVPAFDK.SFCV.IL.KN.LYVVP.ITPTN-RP.E.V.S.HNRVTLKSFN.V.RALY.RQGLDS.Q.DV.H.I.T.RV.19	19
00-1 matriz	IMIDTMNPKGIFKILGAGTQVIVELGAYVQRESISKICKTWSHQTRVVLKSR.	25
APV-B	...L...L...A...R...P...L...G...N...R...I...L...K...S...R...25	25
APV-A	...L...M...P...L...G...N...R...R...G...Y...P...K...A...I...C...Y...Q...K...27	27
APV-C	...V...R...R...N...R...25	25
hRSV	V...L...V...I...V...T...D...N...A...Y...I...K...P...Q...S...F...D...L...E...K...Y...Y...V...I...T...N...K...T...A...K...E...S...I...P...I...E...D...25	25
hRSV	V...L...V...I...V...T...D...N...A...Y...I...K...P...Q...S...F...D...L...E...K...Y...Y...V...I...T...N...K...T...A...K...E...S...I...P...I...E...D...25	25
PvM	T...L...V...I...N...I...T...S...T...A...L...K...S...I...L...A...P...L...T...Q...V...L...H...D...V...I...M...N...K...T...S...I...S...S...T...S...G...25	25

Proteína de fusión

00-1 F MSW	---KVVIFSLII---TPXHGKESYLEESCSTITEGYLSVLRGTWYVNFVLEVGDVENLTCADGPS---LIKTELDLTKSAIAELRTVSADQ	88
APV-A	...D...V...R...I...C...L...L...F...I...S...N...S...C...I...Q...T...N...V...R...K...N...I...N...I...N...D...V...N...K...88	88
APV-B	...Y...L...L...L...I...Y...V...V...G...A...S...G...K...I...Q...T...S...V...R...K...N...I...N...I...N...S...S...Q...N...Q...88	88
APV-C	...L...L...L...V...A...T...G...E...Y...V...R...T...R...E...N...E...K...88	88
hRSV	...A...T...T...A...M...R...M...S...I...I...F...I...S...T...Y...V...T...H...I...L...C...O...N...I...T...E...F...Y...Q...S...T...A...V...S...R...A...S...V...I...L...S...K...I...Q...K...V...K...S...T...D...K...V...K...Q...E...R...Y...N...V...V...Q...S...I...M...Q...N...E...10	10
hRSV	...E...L...L...I...H...R...L...S...A...I...T...A...I...N...A...L...Y...L...S...S...O...N...I...T...E...F...Y...Q...S...T...A...V...S...R...F...A...S...I...I...L...S...N...I...K...E...T...K...N...G...T...D...T...K...V...K...Q...K...Y...N...V...T...Q...L...I...M...Q...N...T...10	10
PvM	...I...P...G...R...F...L...V...I...F...N...T...K...I...H...P...N...T...T...K...Y...S...T...V...E...A...K...A...R...M...T...M...S...I...K...L...S...Q...I...N...I...E...S...K...S...N...L...A...H...A...I...Y...S...V...D...L...S...N...A...93	93
00-1 F LAREEQ	---IENPRQSRFVLGALGAVATAAAVITAGVIAKIIRLESEVTAIKNALKKCNQAVSTLGNVRLVATAVREIKL	16
APV-A	V...K...S...R...L...S...S...R...R...L...G...K...R...N...N...D...16	16
APV-B	I...T...K...N...R...L...S...H...K...K...T...L...G...K...L...R...S...I...N...D...16	16
APV-C	...K...A...R...M...S...K...A...G...A...G...R...16	16
hRSV	P...S...F...S...R...A...K...R...G...I...P...E...L...I...H...Y...T...R...N...S...T...K...F...Y...L...M...G...K...K...R...L...G...F...L...I...G...S...A...S...V...S...V...L...H...G...N...K...L...S...K...V...S...S...S...T...S...K...L...D...19	19
hRSV	P...A...N...N...R...R...A...R...E...A...P...Q...M...Y...N...T...I...N...T...K...N...L...A...V...S...K...K...R...L...G...F...L...I...G...S...I...A...S...I...V...S...V...L...H...G...N...K...L...S...K...V...S...S...S...T...S...K...L...D...19	19
PvM	...L...K...S...K...K...L...G...L...I...L...G...L...V...Q...I...A...L...R...D...V...R...N...V...S...T...M...S...K...V...D...D...16	16
00-1 F DFVSKNLRTRAINKNRCDIADLQMAVSPSQFNRRFLAVVRFQSDNAGITPAI SLDIIMTDAELARAVSNMPTSSAGQIKMLNRRAMVRRKGFGLIGVYSS	26	
APV-A	E...I...K...P...Q...N...I...I...G...N...S...S...V...D...V...I...N...R...S...S...N...D...G...T...26	26
APV-B	E...I...K...P...Q...N...I...R...I...G...N...S...S...V...V...K...I...N...R...S...S...N...I...G...T...26	26
APV-C	...Y...K...P...R...S...G...Y...V...S...N...I...26	26
hRSV	N...Y...I...D...E...L...P...Q...V...N...H...D...R...S...N...I...E...T...V...I...E...Q...K...S...L...E...I...A...E...V...T...P...L...T...Y...M...L...N...S...L...S...L...I...N...D...I...T...N...D...K...S...S...V...Q...I...Q...Q...S...Y...S...I...M...S...V...K...E...E...V...29	29
hRSV	N...Y...I...N...Q...L...P...T...V...Q...Q...S...R...S...N...I...E...T...V...I...E...Q...K...S...L...E...I...N...E...V...V...T...P...L...T...Y...M...L...N...S...L...S...L...I...N...D...I...T...N...D...K...S...S...V...Q...I...Q...Q...S...Y...S...I...M...S...I...K...E...E...V...29	29
PvM	N...I...E...L...E...K...R...V...S...V...H...I...T...A...V...I...R...Q...L...K...L...E...S...E...S...L...H...T...V...S...F...M...L...R...T...S...I...G...G...A...V...K...E...I...S...S...K...I...M...N...L...A...I...S...S...N...A...D...T...26	26
00-1 F VIKMVLQPIFGVIDTPCIVKAAAPSC	---SGKKGNVYACLLREDQGWYQAGSTVYYPNEKDCETRGRDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISITNYECKVS	36
APV-A	...V...Y...E...R...V...L...R...K...E...I...T...A...K...D...V...D...Y...L...E...V...Q...Y...S...K...36	36
APV-B	...V...Y...E...R...V...L...R...H...E...R...E...S...T...A...D...V...D...Y...L...S...E...V...E...Q...H...S...T...36	36
APV-C	...V...Y...I...K...L...D...E...V...S...K...E...R...K...36	36
hRSV	L...A...Y...V...Y...K...L...H...T...S...L...T...I...N...I...E...S...N...I...T...T...R...D...V...S...F...F...Q...T...E...T...K...V...Q...S...N...R...M...N...S...L...T...P...T...D...V...N...L...T...D...E...N...K...D...I...M...39	39
hRSV	L...A...Y...V...Y...Y...K...L...H...T...S...L...T...I...N...I...E...S...N...I...T...T...R...D...V...S...F...F...Q...A...D...T...K...V...Q...S...N...R...M...N...S...L...T...P...E...V...S...L...T...D...E...N...S...K...D...I...M...39	39
PvM	L...V...Y...V...I...L...M...D...V...I...R...S...S...I...D...H...N...I...A...D...K...A...A...N...H...L...S...F...S...P...T...I...H...N...G...Y...A...L...K...S...L...T...P...V...T...R...S...M...Y...D...I...35	35
00-1 F TGRHPISAVALSPLGALVACVYKGVSCSISGRVGIKQLNKGCSYITNQDADVTIDVTYQLSKVEGEQHVIKGRFVSSSFPDKFPEDQFNVALDQVF	46	
APV-A	...V...T...G...S...E...S...K...G...T...K...T...A...S...N...R...T...F...S...N...D...V...S...K...G...V...S...V...G...L...Y...N...L...K...A...L...Y...E...I...N...Y...L...V...S...E...D...A...S...I...A...N...49	49
APV-B	...V...T...G...S...E...S...K...G...T...K...T...A...S...N...R...T...F...S...N...D...V...S...K...G...V...S...V...G...L...Y...N...L...K...N...L...Y...V...E...I...N...Y...L...V...S...E...D...A...S...I...S...N...49	49
APV-C	...D...M...K...R...P...G...S...T...K...N...I...E...I...46	46
hRSV	S...K...T...D...S...S...V...I...T...S...I...S...G...K...T...K...T...A...S...N...R...R...T...F...S...N...D...V...S...K...G...V...S...V...G...L...Y...N...L...K...A...L...Y...V...E...I...N...Y...L...V...S...E...D...A...S...I...A...N...49	49
hRSV	S...K...T...D...S...S...V...I...T...S...I...S...G...K...T...K...T...A...S...N...R...R...T...F...S...N...D...V...S...K...G...V...S...V...G...L...Y...N...L...K...N...L...Y...V...E...I...N...Y...L...V...S...E...D...A...S...I...S...N...49	49
PvM	S...K...T...Y...V...T...A...V...T...I...M...C...S...G...H...T...V...I...N...D...K...R...T...P...D...H...S...K...G...V...R...Q...V...G...Y...E...V...K...S...I...V...R...E...L...V...I...K...Y...L...S...D...K...D...I...R...D...E...45	45
00-1 F ESTIENQALVDQSNRILS	---SAEKNGTGFII---VIIILAVLGSMTILVSVPII IKKTKRPTGAP-PELSGVTNNGFIPIH-N.	54
APV-A	...D...D...I...K...D...L...G...A...D...A...S...K...A...I...A...V...V...L...V...I...I...F...F...L...A...V...T...Y...Y...C...S...R...V...R...T...K...P...K...H...D...Y...A...T...T...H...S...S...M...A...Y...S...53	53
APV-B	...V...D...K...D...I...K...D...L...D...I...E...V...S...I...A...A...L...A...T...I...L...V...S...M...I...L...V...G...L...A...Y...Y...V...R...A...K...S...N...G...Y...K...T...Q...S...M...Y...S...53	53
APV-C	...V...K...N...I...K...D...I...A...V...V...L...M...L...A...A...V...G...G...F...V...R...A...A...P...K...F...H...M...N...K...F...L...L...K...G...G...K...K...K...55	55
hRSV	A...K...N...Q...L...F...I...R...R...D...E...L...H...S...V...D...V...G...S...T...N...V...V...T...T...I...V...V...V...I...M...L...A...G...L...L...F...Y...C...T...K...S...T...I...M...L...G...K...D...I...N...L...S...K...57	57
hRSV	K...N...Q...L...F...I...R...R...D...E...L...H...S...V...D...V...G...S...T...N...I...M...T...T...I...V...I...V...L...L...S...A...I...G...L...L...Y...C...A...K...N...T...V...T...L...S...K...D...I...N...I...A...S...K...57	57
PvM	H...N...Q...R...T...F...F...K...A...D...Q...L...D...L...S...E...R...E...N...N...I...A...K...S...Y...L...I...T...L...L...E...V...V...H...I...I...A...V...I...G...F...I...L...Y...K...V...L...K...H...I...R...D...N...K...K...S...K...S...T...P...L...T...V...L...S...53	53

Fig. 3, cont.

fragmento 8 de RAP PCR de L polimerasa

00-1	fragmento 8	-----TVNVYLPDSYLKGVISFSEINAIGSCLLRPYLAKNDNAKVAIENPVIEHVRLEKAVNSKMKISDYK-----IVEPVMQHE	77
APV-A		ME-ISNESV.....V.N...I.D.Y..H..MT.....Q..RALFK.LTISRE.R-----V...LMI.K.	84
bRSV		MDFLIHENST...T.....C..L..Y..DG.....Y.NIISRQK.L...IN..KLSIQSFVTK.NKGELGLE..TYF.SL	90
hRSV		MDPIINGNSA...T.G.....C..L..YIFNG.....Y.NIISRQ..L...MN..KLNITQSL..K.HKGEIKLE..TYF.SL	90
00-1	fragmento 8	IM-KNVHSCEL---TLLKQFLTRSKNISTLKLAMICDMLQLK-----STSDDTLSILSFIDVEFI-----	13
APV-A		LL.VAAGAR---KK..KW.G..D..EV..K.VT...K.S-----Q.PGRGK.IDR.Q..NL-----	13
bRSV		L.TY.SLSTFS..ITTT..F.KIIR.AIE..DV.VYA.LNK.G..EKGKVDRC---DDTN.TLSNTVDRNLSVISDNTPTKPKPNSSCK	17
hRSV		L.TY.SMT.S.QIATTN...KIIR.AIE..DV.VYA.LNK.G..EKGKRSNNGQDE.NSV.TTI.KDDILSAVKDQSHLQADRNHSTK	18
00-1	fragmento 8	-----PSWVSNWFSNWNLANKLIIEFRKEEVIRTGSIL---CRSLGKLVFVSSYGCIVKSNKSKRVSFPTYNQLL	20
APV-A		-----D.LEH..DS.LI..DV.QSY.CL..SQ.SA..---RK.SLNFF.A...F...II.R..R.IC.C.....	20
bRSV		PQPIKPTTLCKLLSSMHP.T.LIH..NLYTK..DILTQY.TN.ARNH.Y..IDT.T..EFQ.IINQ.....YHK.L.KITIT...F.	26
hRSV		QKDTIKPTTLKQKMCSPHP...LIH..NLYTK..NILTOY.SN..KNH.FT.IDNQ.T.SGRQ.IINQ.....YHKEL..ITVT...F.	27
00-1	fragmento 8	TWKDVMLSRFNANFCIWWNSLNENQEGVGLRSNL-----Q	23
APV-A	LA.....L.V....C..SA.D.L....K.VGELLAR	24
bRSV	IS...L.VCMIT.I..C..TLNKSL...C	30
hRSV	IS...L.VCLIT.I..C..TLNKSL.	30

fragmento 9/10 de RAP PCR de L polimerasa

00-1	fragmento 9/10	--KLVDKITSQHIHFSPDKIDMLTLGKMLMP---TIKQKTDQ---FLNKRENYFHGNLIESLSAALAKHWCGILTEQC	72
APV-A		-F.S.R..VT.....N..H..LVM...L.L.--VRSNINNN---KPAT..F.N...IV.A.TSC..C...TV.IILT	72
bRSV		-ICKLNQVIQR..M.L....SLSQYVELFSLNK.L.NSPHISSNLVLVH.MSD..LHKYV---.TN..G..IM.IQLMK	76
hRSV		DIHKLKQVIQR..M.L....SLTQYVELFSLNK.L.SGSHVNSNLILAH.ISD...NTYI---.TN..G..IL.IQLMK	77
00-1	fragmento 9/10	IENNIFFKQWGDGFISDHFMDFKIFLQVFKYKLLC	10
APV-A		T..S..Q.E.....T....IN.TW..MS...Y...HW	11
bRSV		DSKG..E...E.Y.T..M.L.LANV.FDAY..Y.	11
hRSV		DSKG..E...E.Y.T..M.INL.V.ENAY..Y	11

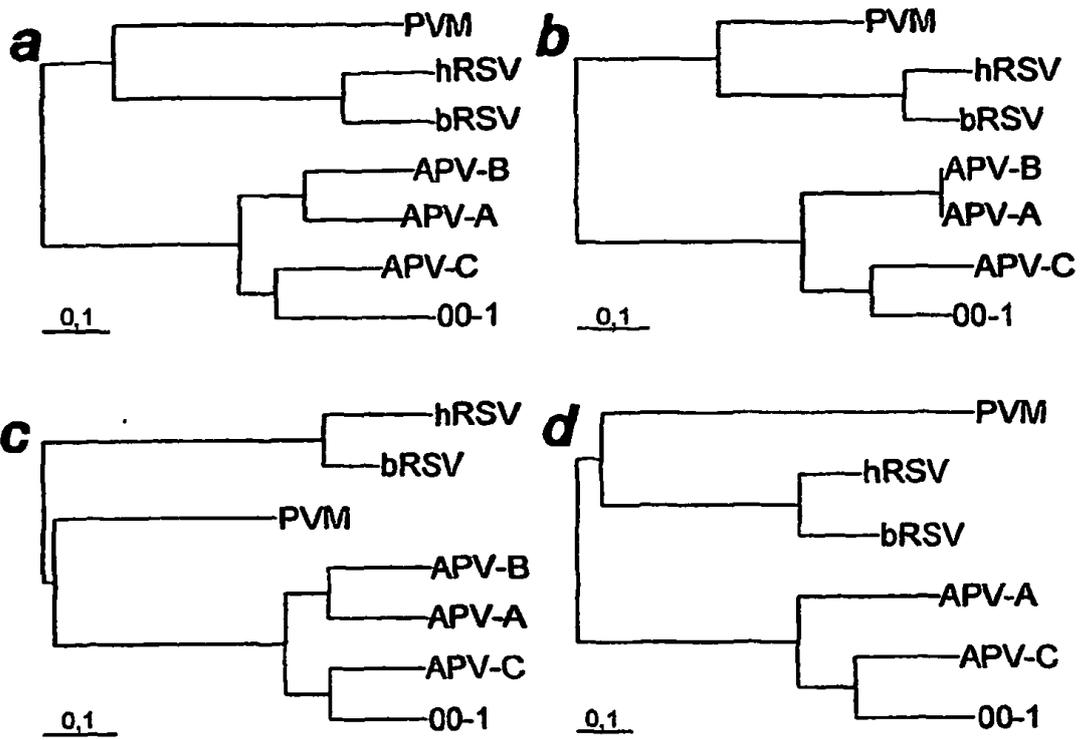


Fig. 4

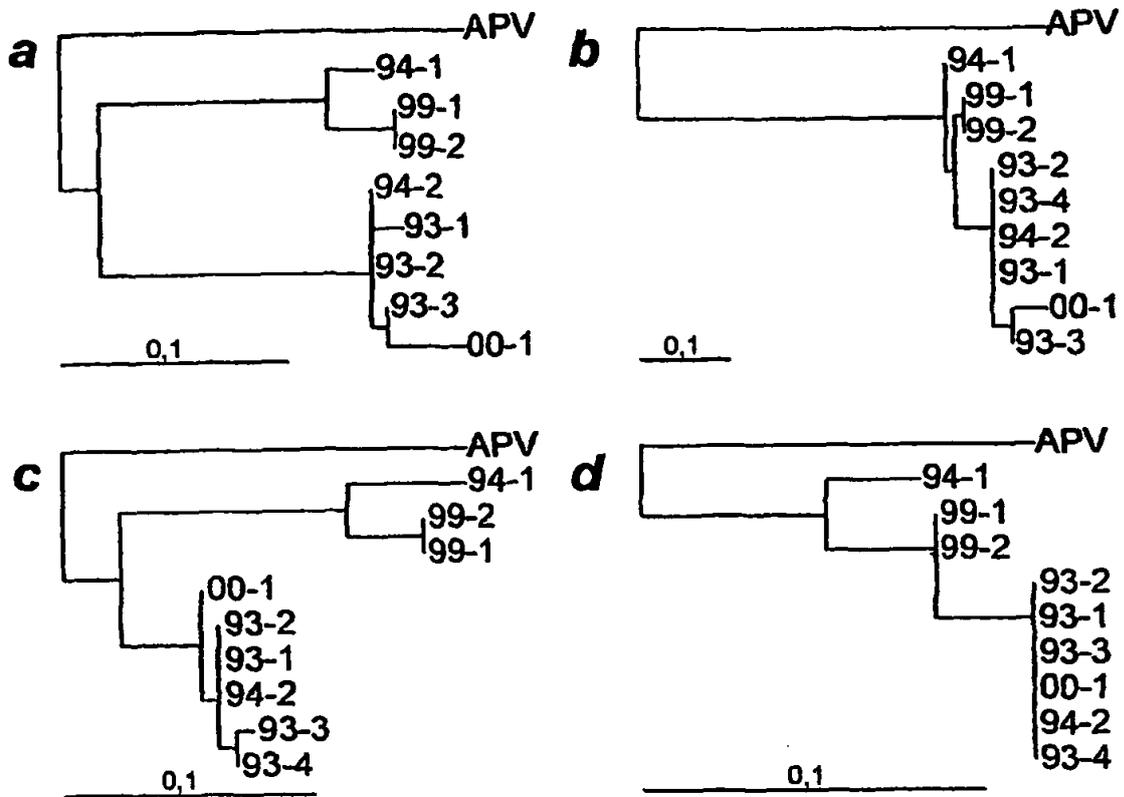


Fig. 5

Fig. 6A

150 ACCCGTAAATTAGATTCAAAATAATGGCAACAAGTGAATAATGCTCTTCAAGGATTCACCTGAGTGTATATACACAGCAATGCTATATAAAGAGTCTACGTACACAAATAAAGAGAGATGGGTACACAACTGCAGTGACA
 175 **175** H G O V K H S L O G I H L S D L S Y K H A I L K E S O Y T I K R O V G T T A V T
 200 CCTCATATGCCAACAGAAATAACACTGTTGGTGGAGAAATTCGTATGCTAAACAATGCTGACTACAAATATCTGCGAATAAGAAATACAATATAAGCACAGCTTTAGGATCAGAGAGAGTGCAGCAGATCTTGAGGAACCTCA
 225 P S S L O O E I T L L C G E I L Y A K H A D Y K Y A A E I G I O Y I S T A L G S E R Y O O I L R M S
 250 GCGATGAAGTCCAAAGTGGTCTTAACCAACAGTACTCTCGGGAAAATTAAGAAATAAAGAGAGAGATTTACAGATGTTAGACATACACGGGTAGAGAGAGCTGGCTAGAGAGATAGACAAAGAGCAAGAAAACVATGGCCA
 275 G S E V O V L T R T Y S L S K I K N N K G E D L O M L D I H G V E K S W Y E E I O K E A R K T M A
 300 ACCTGCTAAGGAAATCCCAAAAATCAGAGGCTCAGCACAGACACCCATAATCTTATGTTAGTGGTCCCTTAATATTCTACTAACTAGCATCAACCAATAGAAAGTGGACTAGACACACAGCTCAGAGAGG
 325 T L L K E S S G N I P O N O R P S A P D T P I L L C V G A L I F T K L A S T I E V G L E T T V R R
 350 GCTAACCTGTACTAAGTATGCCACTCAGAGATACCTAGATGGACATACCAAGATGCCAGATCTTCTATGACTTATTCACAAAAGTGTATCACAGAAATTTGTTTCATTTGAGTATGGCAAGCATTAGGCTCATCTACACA
 375 A N R V L S D A L K R Y P R M D I P K I A R S F Y D L F E O K V Y H R S L F I E Y G K A L G S S S T
 400 GGCAGCAAGCAGAAAGTCTATTTGTTAAATATTCATGCAAGCTTATGGGCGGTCAAGCAATGCTAAGGTGGGGGTCTATCCAGGTCCCAACAATATAATGTTAGGACATGATATCCGCTCAAGCTGAGTTAAACACAGGTCAACA
 425 G S K A E S L F V N I F M O A Y G A G O T M L R N G V I A R S S N N I M L G H V S V Q A E L K Q V T
 450 GAAGTCTAGCTTGGTGGAGAAATGGCCCTGAACTGGACTTCTACATTAAGSCAAAGCCAAAGCTGCACTGTATACATGACCAACTGTCACCAACTTTCGAAGTGTGTTCTCGGAAAATGCCCTCAGGCTTAGGCATAATCGGT
 475 E V Y D L Y R E H G P E S G L L H L R O S P K A G L L S L A N C P N F A S V V L G N A S G L G I G
 500 ATGATCGAGGAGATACCAACAGAAATTTTTCAGCAGCTGAAAGTATGCAAAAGTTGAAAGAAAGCAATAAAATAAATTTCTCTCTTAGGACTTACAGATGAAGAGAAAGAGGCTGCAGAACATTTCTTAATATGTGAGT
 525 M Y R G R V P N T E L F S A A E S Y A K S L K E S N K I N F S S L G L T O E E K E A A E H F L N V S
 550 GAGCAGCTCAAAATGATGAGTATTAAGAAAGTGGACAAAGTCAAAATGTCATCCCTGAGSAAAGATATCTTTCTGAGTAAAGTGAAGCAGCAAAAATAGCAGAACTTCCAGAAATCATTAAGAAACCCAGGCTCAAAAA
 575 D O S O N O Y E . **175** H S F P E G K D I L F M G N E A A K L A E A F O K S L R K P G H K
 600 GATCTCAATCTATAGGAGAAAGTGAATCTATTCAGAACATTTGAAATTAACCTACTACTAGTACCTGCAAAACCAACCAATCCGCTCAGAACCAAGTTAGCATGGACAGATAAAGGTGGGCCAACCAAACTCAAAATAAAGC
 625 R S D S I I G E K V N T V S E T L E L P T I S R P A K P T I P S E P K L A W T D K G S A T K T E I K
 650 AACCAATCAAGTCAATGCAAGAGAGCTTACCAGAGAGAGTGTACCTCCAGTGTGGGAAACCCCTGCAGAAAAGAACCTGAACCACTAACCTAACCAAAAAGAGGTTTCATTTACACCAAAATGAACCCAG
 675 O A I K V H D P I E E E S T E K K Y L P S S D G K T P A E K K L K P S T N T K K K Y S F T P N E P
 700 GCAATAACAAAGTGGAAAAGATGCTTAGATTTGCTCTCAGATAATGAAGAGAGATGCAGAACTTCAACTTAACCTTGAAGAGAGATACCTTCACTAATTAAGCATTAAGGCTGAGGCTAGGAAATAGAGAGAAATTAAG
 725 G K Y T K L E K D A L D L S D N E E D A E S I L T F E E R D T S L S I E A R L E S I E E K L
 750 GCTGATTAAGGCTATTAAGAACTCAACTTCTACAGCAGGAGCCACAGCAGCAGAGATGGATCAGAGATGCAATGATTTGCTAAGAGAGAAATTAATAGCAGACATAATTAAGAGAGCTTAAGGGAGAGCAGCAGAAATGA
 775 S M I L G L L R T L N I A T A G P T A A R D G I R D A M I G V R E E L I A D I I K E A K G K A A E H
 800 TGGAGGAAATGATCAGCATCAAAATAGBAATGGTATGTAATAATTAACAGAAAAGCAAGAGCTCAACAATAATGTTGAGATGAAGACAAAGTGGAGAAATCCAGAGAGAGAGAGAACCAAAAAGACACACAGACAAATA
 825 M E E E M 7 O R S K I G N G S V K L T E K A K E L N K I V E D E S T S G E S E E E E P K D T O D N

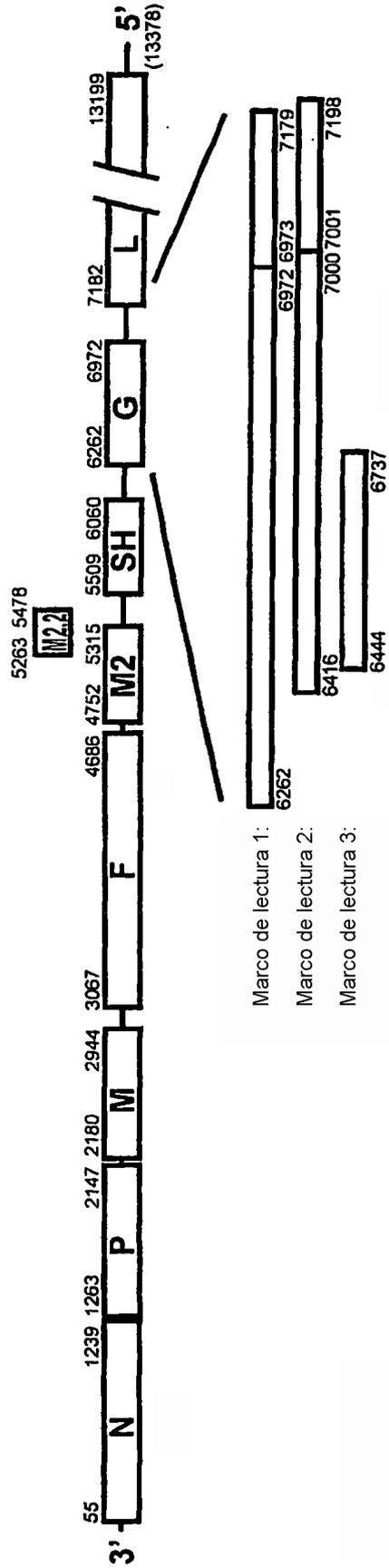


Fig. 7

Fig. 8

50
HMPV MSLQGIHLSDL SYKHA ILKESQYTIKRDVGT TTA VTPSS LQOEITLLCGE
APVCQ.....R.VS.....
APVB ...ES.R...E.....D.....R...A...I...E..PKVST...M
APVA ...ES.R...E.....ED.....R...A...I...E..PQVST...M
HRSVA .A.SKVK.N.TLN.DQL.SS.K...Q.ST.DSIDTPNYDV.KH.NK...M
HRSVB .A.SKVK.N.TLN.DQL.SS.K...Q.ST.DNIDTPNYDV.KHLNK...M
BRSV .A.SKVK.N.TFN.DQL.ST.K...Q.ST.DNIDIPNYDV.KHLNK...M
PVM ...DRLK.N.V.N.DSL.SNCK.SVT.ST.DV.S.SGHAM.KALARTL.M

100
HMPV ILYAKHADYKAAEIGIQYISTALGSERVQQILRNSGSEVQVVLTRTYSL
APVCT.SH...V.M.V.T.A.T...K.....A..K....
APVB ...F.....EP..QV.M.....ADKT...KS.....G.M.KIVT.
APVA V.F...T..EP...V.M.....AD.T...K.....G.M.KIVT.
HRSVA L.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTIK...DA.YH.KANGVDVTTH
HRSVB L.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTIK...KDA.YH.KANGVDITTY
BRSV L.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTLK...KDA.YQ.RANGVDVITH
PVM F.LTAFNRCEEV....L..AMSL..RDDSİK...EA.YN.KC.D.QLKDF

150
HMPV GKIKNNKGEDLQMLDIHGVEKSWVEEIDKEARKTMATLLKESSGNIPQNO
APVC ...G..S...E.....R..I..V.....SAT.DN..P.....
APVB PAEGPIR--KREV.N..DIGPA.ADNVERT..E..SLMV..K-AQ..K..
APVA SAEGSVR--KREV.N..D.GVG.ADDVERTT.EA.GAMVR.K-VOLTK..
HRSVA RQDI.G.EMKFEV.TLASLTTEIQIN.EI.S.SYKKM...M-EVAPEY
HRSVB RQDI.G.EMKFEV.TLSSLTSEIQVN.EI.S.SYKKM...M-EVAPEY
BRSV RQDV.G.EMKFEV.TLVSLTSEVQGN.EI.S.SYKKM...M-EVAPEY
PVM TIKLQG.EYKI.V...V.IDAANLADLEIQ..GVV.KE..TG-ARL.D.R

200
A
HMPV RPSAPDTPTEILLCVGALEPTKLSSTFEVGLTFFVRANRVLSDAIKRYPR
APVC ...S..A...I.....A.....N.....F..
APVB K...L.A.V...I.....V.....AI...S.....IS...
APVA K...L.A.V...I.....V.....AI...S.....IS...
HRSVA .HDS..CGM.I..IA..VI...AGDRS..TAVI...N..KNEM...KG
HRSVB .HDS..CGM.I..IA..VI...AGDRS..TAVI...N..KNEI...KG
BRSV .HDS..CGM.V...A..VI...AGDRS..TAVI...N..RNEM...KG
PVM .HD...CGV..V..IA..VVS...AGDRG..DAVE...LN..KAEKA...N

250
HMPV MDIEKTAARSEYDLFEQKZHSDEYKSKALGSSSTGSKAESLEWLFMO
APVC I.....Y.....
APVB ...R..K..FE..K...Y.N.....T.S..RM.....
APVA ...R..K..FE..K...Y.N.....T...RM.....
HRSVA LLPKD..N...EV..KHPHFIDV.VHF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N
HRSVB LIPKD..N...EV..KHPHLIDV.VHF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N
BRSV LIPKD..N...EV..KYPHYIDV.VHF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N
PVM .EVKQ..E.....R.P.YIDV..TF.L.QS.VRG...V.G..SGL..N

300
B **C**
HMPV AYGAGQTMERWGVPARSSNNIMLGHVSVQAEKQVTEVYDLYREMGPESG
APVCR..V.....R..S.....K.....
APVBR..S.....K.....
APVAR..S.....K.....
HRSVA ...V...L.K.VK...A...ME..V...EYAQKL.G.A.
HRSVB ...S.V...L.K.VK...A...ME..V...EYAQKL.G.A.
BRSV ...V...L.K.VK...A...ME..V...EYAQKL.G.A.
PVM ...V...L.K.VK...A...ME..V...EYAOKO.G.A.

350
HMPV LILHROS PKAGILSLANGPNEASVILNASLGLHGMXRGVNPTELFS
APVCN.....L.....A.....
APVBTS.....A.....K..A..L....
APVAT.....A.....K..A..L....A.
HRSVA FY..ILNN...S...TQF.H.S...A...M.E...TPR.QD.YD.
HRSVB FY..ILNN...S...TQF..S...A...M.E...TPR.QD.YD.
BRSV FY..ILNN...S...TQF..S...A...M.E...TPR.QD.YD.
PVM FY..I..NN...S...T...T...A...S.K.APR.R...D.

395
HMPV AESYAKSLKESNKNIFSSGLTDEEKEAAEHFLNVSDDS-QNDYE
APVC ...R.....E.....N...INEEG-....
APVB ...R.....LAA...ED.R...TSY.GGDE.K-SQKF.
APVA ...RT.R.N...LAA...D.R...TSY.GGD.ER-SSKF.
HRSVA .KA..EQ...NGV..Y.V.D..A..L..IK.Q..PK.N--DVEL-
HRSVB .KA..EQ...NGV..Y.V.D..A..L..IKNQ..PKE.--DVEL-
BRSV .KA..EQ...NGV..Y.V.D..T..L..IKNQ..PK.N--DVEL-
PVM .KD..ER..DN.V..Y.A.N..A..R.LISQQ..IV..TPDD.I-

Fig. 9

```

50
HMPV MSFPEGKDILFMGNEAAKLAEAFQKSLRKPGRKRS-----QSIIGEK
APVC .....L.....A.....R..K.I..R.T-----..V.D.
APVB ..L.....M..S.....Y.Q.IKNSTSV-----R..S.DP
APVA .....M..S.....M.D.Y.R...NTSAGG-----R..S..P
HRSVA ---M.KFAPE.H.ED.NNR.TK.LE.-----
HRSVB ---M.KFAPE.H.ED.NNK.TK.LE.-----
BRSV ---M.KFAPE.H.ED.NTK.TK.LE.-----
PVM ---M.KFAPE.V.ED.N.K..E.L.HRSF.SE.PLAGIPNTATHVTKYNM
100
HMPV VNTVSETLELPTISRPAKPTIPSEPKLAWTDKGGATKTEIKQAIKVM DPI
APVC II.....V.K...KST.V.T.P.R.N..GE.PDT.RSQTEE.RNEAT.E
APVB .S....KVP..PLCSSETS-----R.ACIRPT..STLPPIK--
APVA I..IA.KVP..PLCN.TT.-----..SCI.PN-.APVPKVK--
HRSVA ---IKGKETS.-----KDPKK.DS.ISVNS.
HRSVB ---IKGKFASS-----KDPKK.DS.ISVNS.
BRSV ---LKGKFTSS-----KDSRK.DS.ISVNSV
PVM PPILRSSFK..SPRVA.NL.E..A.P---TTPPP.PPQN.EEQPKESDV
150
HMPV EEEESTEKVLPSSDGKTPAEKKLKPSTNTKKK-----VSFTPNPEPGKYT
APVC DASRLY.EVFA.T.....GKETPEKP...-----T.KND.S.R..
APVB .V.SIYP.LPTAPP.AMIETAHPGAPKKAQ.R-----K.ESSKA....
APVA .I.SIYP.LPTAPVATD.YTSTSTESAKKS.-----K.DNPKV....
HRSVA DI.VTK.SPITSN.TIIN.TNETDDTAG.KPNYQRKPL...KEDPTPSDN
HRSVB DI.VTK.SPITSGTNIIN.TSEADSTPETKANYPRKPL...KEDLTPSDN
BRSV DI.LPK.SPITSTNQINQPSEINDTIATNQVHIRKPL...KEEL.SSEN
PVM DI.TMHVC..PDNPEHSKKPCCSDDTD.KKT---RKPM.T.VEP.EKFGV
200
HMPV KLEKDALDLLSD-NEEDAESSILTFEERD--TSSLSTEARLESIEEKLS
APVC ...ME..E....-..DD.....V.....K---A..L.....D....
APVB ...EE..E....PD.DN.EK..V.....K--NAPS.....A.....
APVA ...EEG.E....PE.DN.EK.....K---A.T.....A.....
HRSVA PFS.LYKETIETFDNN--E.E.SYSY..INDQ.NDN-.T...DR.D...
HRSVB PFS.LYKETIETFDNN--E.E.SYSY..INDQ.NDN-.T...DR.D...
BRSV PFTRLYKETIETFDNN--E.E.SYSYD.INDQ.NDN-.T...DR.D...
PVM LGASLYRETMQTFAADGYD.E.N.S...TNQEPG.S.V.O..DR.....
250
HMPV MILGLLRLTLNIATAGPTAARDGIRDAMIGVREELIADIKEAKGK-----
APVC .....V.....L.....
APVB ...M.K..S.....V.....NS.MA.....
APVA ...M.K.....M.....NS.MT...D.....
HRSVA E...M.H..VV.S...S.....L..M.EK.RT..LMTNDRLE
HRSVB E...M.H..VV.S...S.....V.L..M.EK.RA..LMTNDRLE
BRSV E.I.M.H..VV.S.....V.L..M.EK.RS..LMTNDRLE
PVM Y.I...N.IMV.....T...E...L..T...EM.KSIILTVNDRIV
300
HMPV -AAEMMEEEMSORSKIINGSVKLTAKAKELNKIVEBESSTSGESEBEEEPK
APVC -....K..AK.K.....G.....EE
APVB -I..I.K..DA..A...D.....R...RML..O.S...S..ET
APVA -I...K..DT..A...D.....L..O.S...S..SG
HRSVA AM.RLRN..SEKMA.DTSDE.S.NPTSEK..NLL.G-----N
HRSVB AM.RLRN..SEKMA.DTSDE.P.NPTS.K.SDLL..-----N
BRSV AM.RLRD..SEKMT.DTSDE...PTSEK..MVL..-----E
PVM AMEKLRD..C.RADTDDGSACY..DR.RI.D...SSNA-----E
316
HMPV DTQDNSQEDDIYQLIM
APVC :EESNPD..L.S.T.
APVB ERDTDGEN...SFD.
APVA ESESDEE.S...N.DL
HRSVA .SDNDLSLE.F-----
HRSVB .SDNDLSL..F-----
BRSV SSDNDLSLE.F-----
PVM EAKEDLDV...MGINF

```

Fig. 10

```

50
HMPV MESYLVDTYQGI PYTAAVOVDLIEKDLLPASLTIWFPLFOANTPPAVLLD
APVC .....V.....T..V...Q...R..V.V....T...T...E
APVB .....II.....V.....V...NN..K..V.....SS..AP....
APVA .....II.....V.....SN..T..V.....SS..AP....
HRSVA ..T.VNKLHE.ST.....YNVL...DD.....V.M..SSM.ADL.IK
HRSVB ..T.VNKLHE.ST.....YNVL...DD.....V.M..SSV.ADL.IK
BRSV  ..T.VNKLHE.ST.....YNV...DD.....V.M..SSISADL.IK
PVM   ..A...EM.H.V.....LN.V..HSANI...V.I.M..TSL.KNSVM.

100
HMPV QLKTLTITTLYAASONGPILKVNASAQGAAMSVLPKKFEVNATVALDEYS
APVC .....T.....A...S.D.S.S....D..
APVB .....S...Q.TV.PE..V.Q...T.....A.....S.S.AA.....
APVA .....S...Q.T..PE..V.Q...A.....A.....A.S.A.....
HRSVA E.ANVN.LVKQISTPK..S.R.MINSRS.VLAQM.S..TIC.N.S...R.
HRSVB E.ASIN.LVKQISTPK..S.R.TINSRS.VLAQM.SN.IIS.N.S...R.
BRSV  E.INVN.LVRQISTLK..S..IMINSRS.VLAQM.S..TIS.N.S...R.
PVM   L.HDV.VICTQISTVH..MI..DL.SSN.GLATM.RQ.LI..II...DWG

150
HMPV KLEFDKLTVCVKTVYLLTMMKPYGMVSKFVSSAKSVGKKT HDLIALCDFM
APVC .....L.A.....N...A.....L
APVB ..D.GV....D.RA....L.....I.TNMNT..R.....I
APVA R...GT...D.RSI...L.....IMTDVR...R.....I
HRSVA ..AY.VT.P..I.ACS..CL.SKN.LTTVKDLTMKTLNP...I...E.E
HRSVB ..AY.VT.P..I.ACS..CL.VKS.LTTVKDLTMKTFNP..EI...E.E
BRSV  ..AY.IT.P..I.ACS..CL.VKN.LTTVKDLTMKTFNP..EI...E.E
PVM   NMDYEVVAFDK.SECV.IL..KN.LYTVP.ITP-TNRP..E...V.S.H

200
HMPV DLEKNTPV TIPAFIKSVSIKESATVEAAISSEADQALTOAKIAPYAGL
APVC ....GV.....Y.....G.....I...R.....
APVB .M.RGI.....Y..A...D.....G.....I...R.....
APVA .I..GV.I...Y..A...D.....G.....I...R.....
HRSVA NIVTSKK.I..TYLR.I.VRNKDLN.L.NITTT.FKN.I.N...I..S..
HRSVB NIMTSKR.I..TYLRPI.V.NKDLNSL.NIATT.FKN.I.N...I....
BRSV  NIMTSKR.V..T.LR.INV.AKDLSL.NIATT.FKN.I.N...I....
PVM   NRVTLKSFN..V..RALY.RQGLDS..Q....DV.H.I.T.RV.....

250
HMPV IMIMTMNPKGIFKKLGAGTQVIVELGAYVOAESISKICKTWSHQTRYV
APVC .....V.....R..RN.....
APVB .LL.A.....R.....P.....LG.....N..R..I
APVA .L.....M.....P.....LG.....N..R...
HRSVA LLVI.VTDN..A..YIKPOS.F..D....LEK...YYVTTN.K.TA..FA
HRSVB VLVI.VTDN..A..YIKPOS.F..D....LEK...YYVTTN.K.TA..FS
BRSV  VLVI.VTDN..A..YIKPOS.F..D....LEK...YYVTTN.K.TA..KFS
PVM   TLVINITST..A..L.K..S.ILA...P.LTQV.LHDVIMN.K.T..S.I

258
HMPV LKSR-----
APVC -----
APVB -----
APVA .R.-----
HRSVA I.PMED--
HRSVB I.PLED--
BRSV  I.PIED--
PVM   ...SSTSG

```

Fig. 11

	Péptido señal		100
HMPV	MSWVVIIFSLITPQHLKESYLEES	STITEGYLSVLRGTWYNTVFTLEVGDVENLTCADGPS	LIKTELDLTKSALRELRTVSADQ
APVC	LLLV.A.TG.E	Y.V.R	T.R.E.N.E.K
APVB	YL.LLL.IY.VVGASGKIQ.T.S	V.R.K	N.I.N.I.N.S.S.QN.Q
APVA	DVRICLLF.ISN.SSCIQ.T.N	V.R.K	N.I.N.I.N.D.V.N.K
HRSVA	MELLILKANAITILTAVTFCFASGQNI	AVSK.A	S.I.I.LSNIKENHNGTDAKVK.Q.KY.N.VT.QLLMQST
HRSVB	MELLIHRLSAIFLTLA.NA.YL.SSQNI	AVSR.F.A	S.I.I.LSNIKETHNGTDTKVK.Q.KY.N.VT.QLLMQNT
BRSV	MATTAMRMII.IIFISTYVTH	LCNI	EFYQST.AVSR.A.S.V.I.LSKIQKNV.KSTD.KVK.Q.ERYNN.VV.QSLMQNE
PVM	MIPGRIFLVLLV.NTKPIHPNT.T.K.Y.ST	VE.A.K.A	HMT.MSIKLSQINIES.KSSN.LAH.AIYS.VD.L.SN
	Dominio de fusión	HRA	200
HMPV	LAREEQ	IENPRQSRFVLGALALGVATAAAV	TAGVALAKTIRLESEVTAIKNALKKTNEAVSTLGNVVRVLATAVRELK
APVC	K.AR	MS	KA.G.A.G.R
APVB	ITK.NR	LSH.KK	T.L.G.K.L.RS.I.ND
APVA	V.K.SR	LSS.RR	L.G.K.RN.ND
HRSVA	PPTNNRARRRELPRFMNYTLNNAKTNVTL	SKK.KR	LG-FL-G-S.IAS.VS.VLH.G.NK.S.LS.K.VS.S.TSK.LD
HRSVB	P.ANNRARRREARQYMNNTINTKLN	V.S.KK	LG-FL-G-S.IAS.I.VS.VLH.G.NK.LS.K.VS.S.TSK.LD
BRSV	P.SFSRAKRGIPELHHTYRNSTK	KKFKYGLMGKK.KR	LG-FL-IG-S.AS.VS.VLH.G.NK.LS.K.VS.S.TSK.LD
PVM	ALKSK	KK	LG-LI.LG.L.VQ.IAL.RD.VRN.VS.T.MS.KV.DD
			300
HMPV	DFVSKNLTIRAINKNC	DIADLKMVAFSFSQFNRRFLNVVRFQSDNAGITPAISLDLHMTDAELARAVSNMPTSAGQIKMLNENRAMVRRKGFGLIGVYSS	
APVC	I.K.P.R	S	G.Y.V.S.N.I
APVB	E.I.K.P.Q	N.IR.I.G.N	S.S.V.VK.INR.S.S.N.I.GT
APVA	E.I.K.P.Q	N.I.I.G.N	S.S.V.D.V.INR.S.S.N.I.DGT
HRSVA	NYID.Q.LPIV.QS	R.SNIETVIE.Q.K.N.L.EIT.E.V	V.TPV.TYML.NS.LSLIND.ITND.K.SN.VQI.QQSYSIMSIIKEEV
HRSVB	NYINNO.LPIV.QQS	R.SNIETVIE.Q.K.S.L.EIN.E.V	V.TPL.TYML.NS.LSLIND.ITND.K.SS.VQI.QQSYSIMSIIKEEV
BRSV	NYID.E.LPOV.NHL	R.SNIETVIE.Q.K.N.L.EIA.E.V	TPL.TYML.NS.LSLIND.ITND.K.SS.VQI.QQSYSIMSIVKEEV
PVM	N.I.E.LPK.RVS	VH.ITAVIR.Q.L.K.L.E.S.E.S	L.HTV.SFML.R.TSI.GG.AV.KEI.SSK.IM.N.LAI.SS.NADT
			400
HMPV	VIYMVOLPIFGVIDTH	QIVKAAPSCSG--KKGNYA	CLLREDQWVQONAGSTVYYPNEKICETRGDHFVCDTAAGINVAEQSKENINISTTNYIKVVS
APVC	V.I	K	D
APVB	V	R.V	IRH--ERES
APVA	V	R.V	IRK--E
HRSVA	LA.V	LY	KLHTS.LTTNT.E.SNI
HRSVB	LA.V	Y	KLHTS.LTTNI.E.SNI
BRSV	IA.V	Y	KLHTS.LTTDN.E.SNI
PVM	LV.VI	L.M	L.VIRSSIIHN--IADK
			500
HMPV	TGRHPISMVALSPLGALV	YKGVSCBISGSRVGI	IKQLNKCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGEQHVIGKRFVSSSDFPVKFPEDQFNVALDQVF
APVC	V	T	G.S.E
APVB	V	T	G.S.E
APVA	V	T	G.S.E
HRSVA	SKTDV.SSVITS	I.S	GKTK.PASNKNR.TFSN
HRSVB	SKTD.SSVITS	I.S	GKTK.PASNKNR.TFSN
BRSV	SKTD.SSVITS	I.S	GKTK.PASNKNR.TFSN
PVM	SKTYV.TAV.TTM.C	S	GHN.PVIN.DK.RT.PD
	HRB	Anclaje de membrana	583
HMPV	ESIENSQALVDQSNRI	LSSAE---KGNTGFTIVVILLAVLGS	TMILVSVFTIIKKTKKPTG---AP-PELSGVTNNGFIPHN
APVC	V.K.N.I	K.D.I	A.V.V.VL.MLAAVG.G.FVV.R.AAPK---F.M.MN.N.K
APVB	VDR.KD.I	K.DL.DIEV---S.I	AALA.TILV.SMLI.VGIAYV.V.R.AK.S---NGY.KTT.QS.M.Y.S
APVA	DR.D.I	K.DL.GADA---SKA	IA.A.VVLVI.IFFL.AVIYYCSRVR.TKPK---HDY.ATT.HSSMAYVS
HRSVA	K.NO.L	FIRK.DEL.HNVN--AG	ST.NIM.TT.I.VIIVILLS.IA.GLLLYCKARS.P-VTLSKDQ..IN.IA.SN--
HRSVB	K.NO.L	FIRR.DEL.HNVN--TG	ST.NIM.TT.I.VIIVILLS.IAIGLLLYCKA.N.P-VTLSKDQ..IN.IA.SK--
BRSV	AK.NO.L	FIRR.DEL.H.VD--VG	ST.NVV.TT.I.VIVVILM.IA.GLLFYCKT.S.P-IMLGKDQ..IN.LS.SK--
PVM	H	NOTRTFFKA.DQL.DLS	NREN.NLNKSY.LTT.LF.VMLII.NAVIGF.LY.VL.MIRDNKLKSKSTP.L.VLS----

Fig. 12

A

```

# # # 50
HMPV MSRKAPCKYEMRGKCNRGSECKFNHNYWSWBRYLIRSNYLLNQLERNI
APVC .....L.....
APVB ..GRN..R..T..R.....S.T.....HV..V.A..M...V...
APVA ..RN..R..I.....S.T.....HV..V.A..M.....
HRSVA ...RN...F.I..H.LN.KR.H.S...FE..PHA..V.Q.FM..RI.KSM
HRSVB ...RN...F.I..H.LN.RR.HYS...FE..PHA..V.Q.FM..KI.KSM
BRSV ...RN.....I..H.LN.KK.H.S...FE..PHA..V.Q.FM..KI.KSM
PVM ..VR-...F..Q.F.S..RN..YS.K..E..LKT.ML.Q..M..RIY.FL
# 100
HMPV DRA=DGLSIFSCAGREDRTODEVLGSSINWQGYIDDNOSITKAAACYSLH
APVC ..S-...L.....D.....N...N.EN...ST...Y
APVB ..T-...L.....A...N..EG.AT...S...Y
APVA ..T-...L.....A...N..EG.TT...S...Y
HRSVA .KSI.T.E...AEL...EEYA..VVG.LES..GSINN...QS..VAMS
HRSVB .KSI.T.E...AEL...EEYA..IVG.LES..GSINN...QS..VAMS
BRSV ..NN.T.E...AEL...EEYA..VIG.LES.LGSINN...QS..VAMS
PVM .TNT.AI.DV..FDAPO..AEYA..TIG.LKS.LEKTNN...SI..G..I
# 150
HMPV NIIKQLQEVEVRQARDNKLSDSKHVALHNLVLSYMEMS-KTPASLINNLK
APVC .....TD.....VD.....-.....
APVB .....ND.KS...LMVD.P.....ID..-N..N...S..
APVA .....ND.KTS..SM.E.P.....I..VD..-N.....S..
HRSVA KLLTE.NSDDIKKL...EELN.PKIRVY.T.I..I.SNR.NNKQT.HL..
HRSVB KLLIEINSDDIKKL...EEPN.PKIRVY.T.I..I.SNR.NNKQT.HL..
BRSV KLLAEINNDIKRL.NKEVPT.PKIRIY.T.I..IDSNKRNTKQT.HL..
PVM TVLQN.DVGL.I...SNTE.TNYLRSC.TI...IDKIL.K-RQI.HI..
# 195
HMPV RLPREKLLKLAkliIDLSAGAE--NDSSYALQDSESTNQVQ----
APVC K..K.....E...V.--...TA.M...ANSD-----
APVB ...K.....I..Q...S.GE.AN.NT..KGD.S.-----
APVA .....I.LQ...P.SD.A.GNT..KGD.N.-----
HRSVA ...ADV...TI.NTL.IHKSITIN.PKESTVS.TNDHAKNNDTT-
HRSVB ...ADV...TI.NTL.IHKSIIIS.PKESTVN.QNDQTKNNDITG
BRSV ...ADV...TI.NT..IHNEINGN.QGDIIVNEQNE-----
PVM ...VGV.CN.IQSV.SIEEKINSSMKTE-----

```

B

```

# 50
HMPV -----MTLHMP-CKTVKALIKCS-----EHGPFVITIEVDDMIW
APVC -----...QL...I.QT...G-----LI.LKMKL...V.
APVB -----PIVI...R.T.V.R.N-----TL.VCLFKRTYEHN.I
APVA -----PVVI...RR.T.I...N-----AL.LCMVRKIY.YS.A
HRSVA MTMPKIMILPDKY.-.SITSI..TSRCRVTMYNQKNTLY.NQNNPNNHMY
HRSVB MTKPKIMILPDKY:-.SISSI..SSESMIATFNHKNILQ.NHNHL.NHOR
BRSV MNNSNIIIFPEKY.-.SISSL...NENDVIVLSHQNVLDYLQFQYPCNMY
PVM MQSDPICHLRGEDKFFYENRM.RLPKYYPAILHKMYIIRVNRNLTIDGS
# 97
HMPV THKDLKEA---L---SDGIVKSHTNIYNCYLENIEIIVKAYLS----
APVC .KNE.VDI---I---TE...V.A..FK.R..D.....TF.----
APVB NLG..I.E---V---ARM.IID.I.RKQ.NECRKDFEF.AV.T.YT--
APVA SWS..I.E---V---ANMVLID.I.RKQ.VECRKDFEFIAI.T.YN--
HRSVA SPNQTFNE---IHWT.QELIDTIQ.FLQHLGIIED.YTIYILV.----
HRSVB LLNNI FDE---IHWTPKNLLDATQQFLQHLNIPED.YTIYILV.----
BRSV SQNHMLDD---IYWT.QELIEDV.LK.LHLSGIS.SKYVIYVVLV----
PVM GPSTIID.GKSVVWNRVDVIACVKEALC.IEFSWNNQVIIDFDYSQAR

```

Fig. 13

A

```

MITLDVIKSDGSSKTCTHLKKIIKDHSGKVLIVLKLILALLTFLVTITI 50
NYIKVENNLQICQSKTESDKKDSSNTTSVTTKTTLNHDITQYFKSLIQR 100
YTNSAINSDTCWKINRNQCTNIITYKFLCFKSEDTKTNNCDKLTDLCRNK 150
PKPAVGVIHIVECHCIYTVKWKCYHYPTDETQS 183
    
```

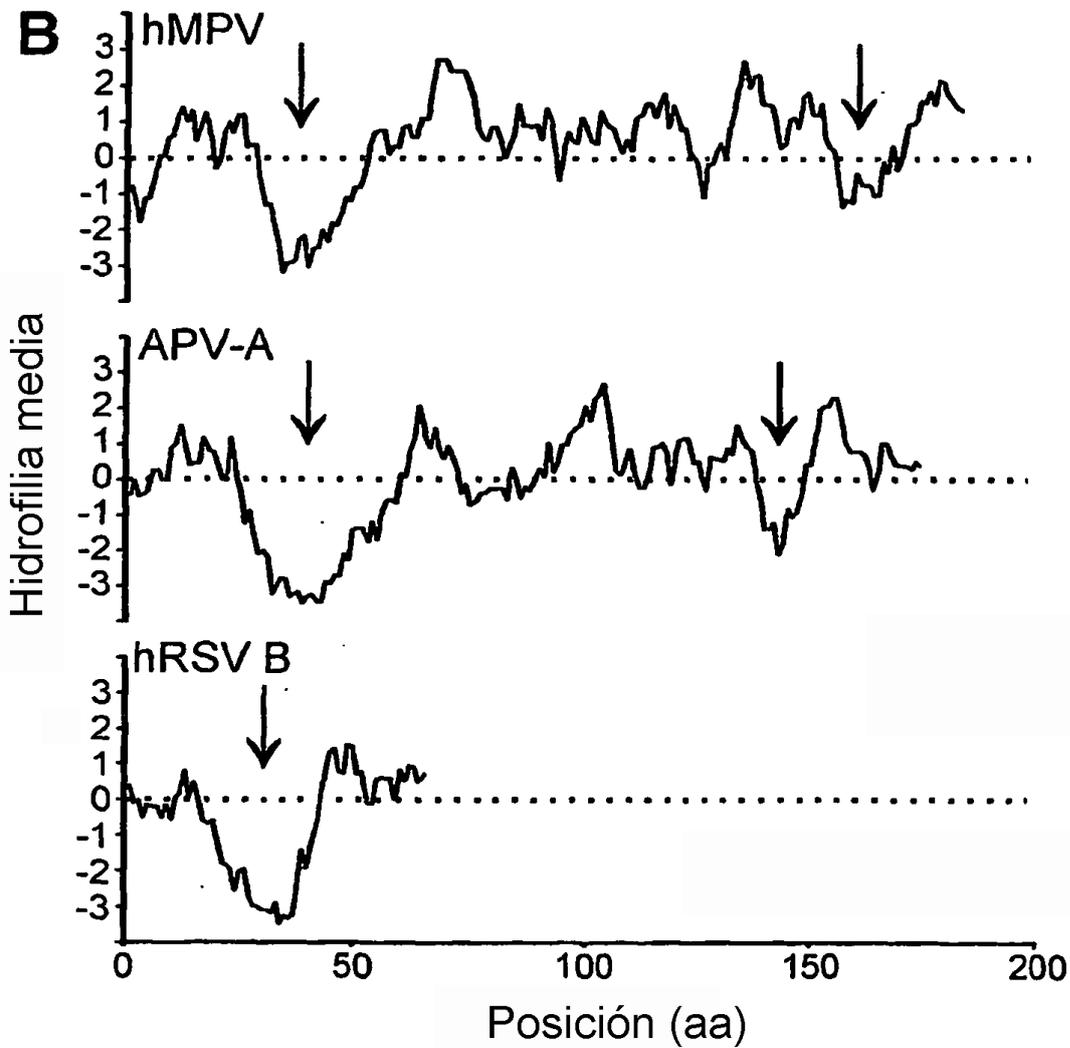


Fig. 14

A

```

MEVKVENI RTIDMLKARVKNRVARSKCFKNASLVLIGITTL SIALNIYLI 50
INYKMQKNTSESEHHTSSSPMESSRETPTVPTDNSDTNSSPQHPTQOSTE 100
GSTLYFAASASSPETEPTSTPDTTNRPPFVDTHHTPPSASRTKTSPAVHT 150
KNNPRTSSRTHSPPRATTRTARRTTTLRTSSSTRKRPSTASVQPDISATTH 200
KNEEASPA SPQTSASTTRIQRSVEANTSTTYNOTS 236
    
```

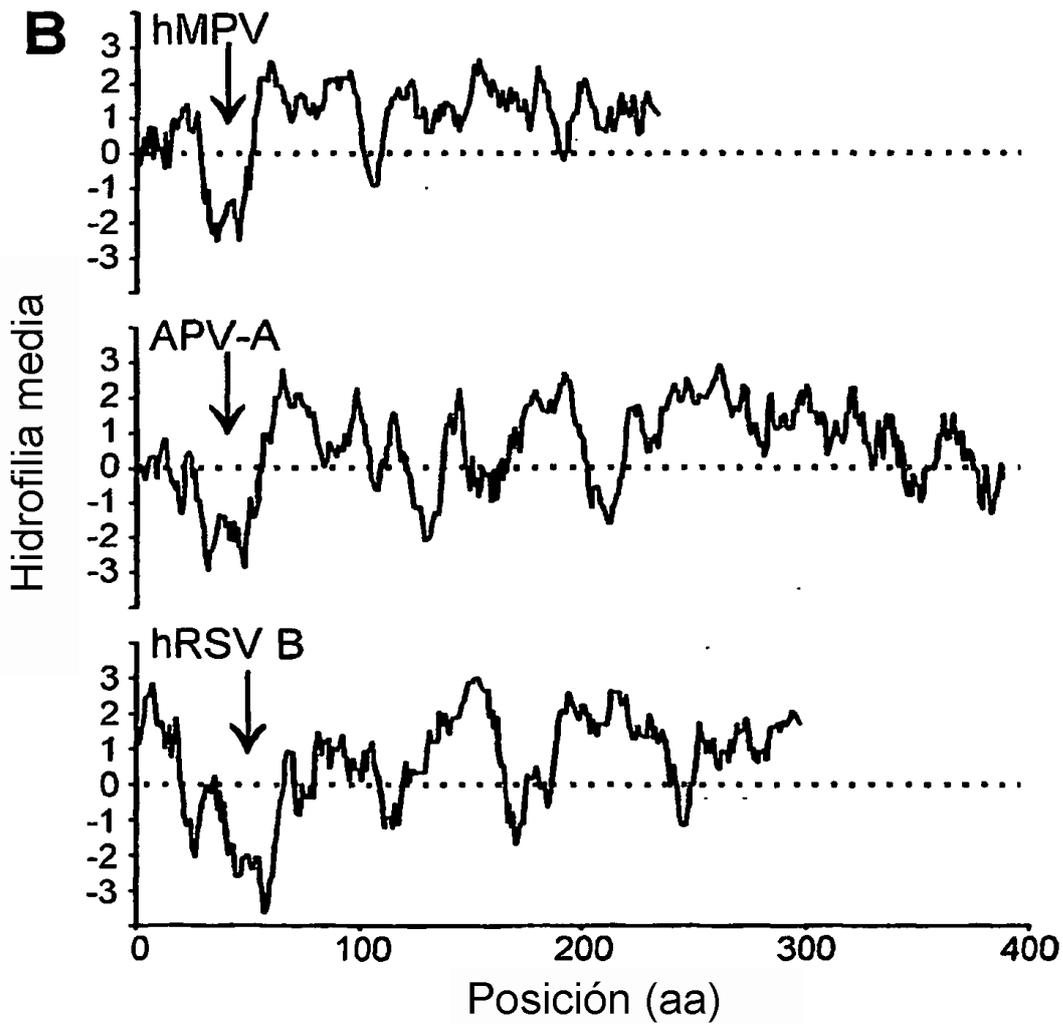


Fig. 15

A 674

HMPV NYIARASIVTDLSKFNQAFRYETTAICADVADELHGTQSLFCWLHLIVPM
 APVASV.....T.SS
 HRSVA ...SKC...I.....SC..S..L....V....F...AI.H
 HRSVB ...SKC...I.....SC..S..L....V....S...TI.L
 BRSV ...SKC...I.....SC..S..L....V....S...TI.F
 HPIV2 FELSACF.T...A.YCLQW...Q.IIHF.RTLNRMV.VPH..E.I..RLIR
 NDV RRRVATF.T...Q.YCLNW...Q.IKLF.HAINQ.M.LPHF.E.I..RLMD
 SV YETLSCFLT...K.YCLNW...F.S..LFGQRN.IF.FKTF.N.M.PVLEK
 HPIV3 YETVSCFLT...K.YCLNW...S..LFGGETCNQIF.LNK..N...PRLEG
 MV YETVS.F.T...K.YCLNW...ISLF.QRLN.IY.LP.F.Q...KRLET
 NIPAH FDTVS.FLT...K..CLNW...SM..F.ERL..IY..LPGF.N.M.KRLER

B 723

HMPV TTMICAYRHAPPETKG-EYDIDKIEEQSGLYRYHMGGIEGWCQKLTWMEA
 APVAT.....D.G.-I....Q.P.....F.....M.....
 HRSVA V.I..T.....YIRDHIV.LNNVD.....I..
 HRSVB V.I..T.....FI.DHVNLNEVD.....I..
 BRSV A.V..T.....YIRNHIT.LN.VD.....I..
 HPIV2 S.LYVGDPFN..AATD-AF.L.VLNGIIFIVSK-....L..M..IS
 NDV ...FVGDPFN..SDPT-DC.LSRVPNDIYIVSAR....L.....IS
 SV C.IYVGDPYC.VADRM-HRQLQDHADSCIFIHNPR.....Y.....LIS
 HPIV3 S.IYVGDPYC..SD.E-HISLEDHPDSCFYVHNPR.....F.....LIS
 MV SVLYVSDP.C..DLDA-HIPLY.VPNDQIFIK.P.....Y.....IST
 NIPAH SVIYV.DPNC..NIDK-HMELE.TP.DIIFIH.PK....YS..T..IAT

C 772

HMPV TSLIDVSVKTRCOMTSLNNGDNQSTIDVSKPVKLESEG-LDEVKADYSLAV
 APVARN.V.L.....R.TGA-QT.IQ.....I
 HRSVA ...LI.L.GKFSI.A.I.....I...R.M.-QTHAQ..L..L
 HRSVB ...LI.L.GKFSI.A.I.....I...R.I.-QTHAQ..L..L
 BRSV ...LI.L.GKFSI.A.I.....I...I.N.-QTHAQ..L..L
 HPIV2 ..VILLS.AESKTRVM.MVQ...A.A.TTR.PR.LPSIQKKELA.AASK
 NDV ..AATQLAAARSH.RVPCMVQ...V.A.TRE.RSDDSPEMVLTLHQASD
 SV ..AIHLAA.RVGVRSAMVQ...A.A.TSR.PVAQTYKQKKNHV.EEIT
 HPIV3 ..AIHLAA.RIGVRV.AMVQ...A.A.TTR.PNNYDYRIKKEIV.KDV.
 MV ..PY.YLAAYESGVRIA..VQ...T.A.T.R.PSTWPNLKKREARVTR
 NIPAH ..PFLSAYE.NTRIPAIVO...E..AITOK.HPNLPYKVKKEICAKQ.Q

D 822

HMPV KMLKEIRDAYRNIGHKLKEGETYISRDLQFISKVIOSEGVMHPTPIKKIL
 APVA ...TAV...Y.....V.....M..T.....Y.AA..V.
 HRSVA NS..LLYKE.AG.....GT.....M..M..T..HN..YY.AS...V.
 HRSVB NS..LLYKE.AG.....GT.....M..M..T..HN..YY.AS...V.
 BRSV .S..LLYKE.AS.....GT.....M..M..T..HN..YY.AS...V.
 HPIV2 LFFERL.ANNYGL..Q..AQ..I..STFFIY..RVFYQ.RILTOAL.NAS
 NDV NFF..LIHVNL...N..DR..IR.DTFFIY..R.FKD.AILSQVL.NSS
 SV RYFGAL.HVMFD...E..LN..I..SKMFVY..R.YYD.KIL.QCL.AIT
 HPIV3 RFFDSL.EVMDDL..E..LN..I..SKMFIY..R.YYD.RIL.QAL.AIS
 MV DYFVIL.QRLHD...H..AN..IV.SHEFVY..G.YYD.LLVSQSL.S.A
 NIPAH LYFERL.MNL.AL..N..AT..I..TH.FIY..K.HYD.AVLSQAL.SMS

847

HMPV RVGPWINTILDDIKTSAESIGSLCQ
 APVAM.A.....
 HRSVAF.V.L.....T.
 HRSVBF.V.L.....T.
 BRSVF.V.M.....T.
 HPIV2 KLCLTADVLGECTQA.CSNSATTIM
 NDV KLVLVSGDLSSENTVM.CAN.A.TVA
 SV .CVF.SE.LV.ETRSACSN.STSIA
 HPIV3 .CVF.SE.VI.ETRSASSNLATSFA
 MV .CVF.SE..V.ETRAACSN.ATTMA
 NIPAH .CCF.SE.LV.ETRSACSN.STTIA

Fig. 16

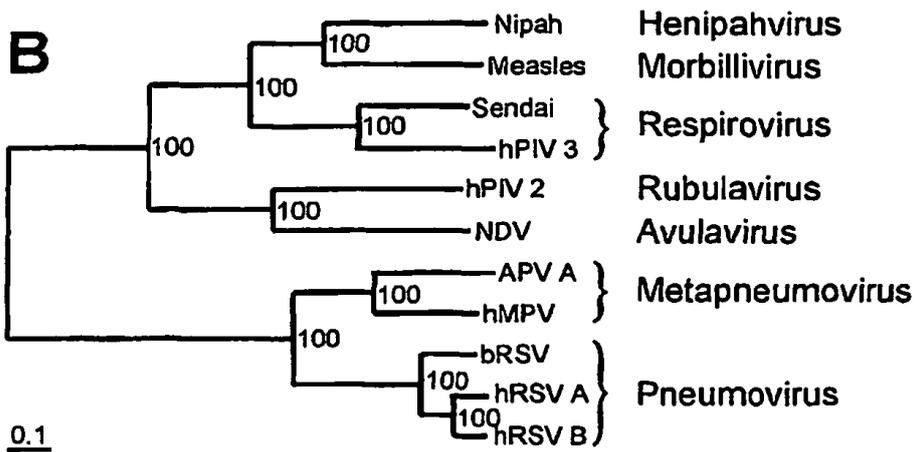
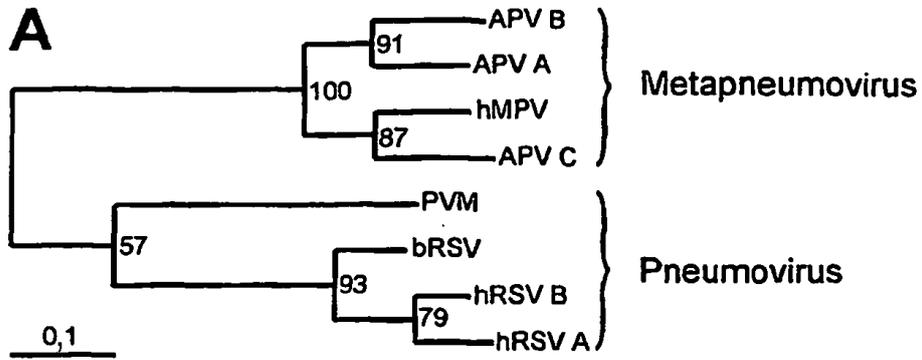


Fig. 18a

Comparación de dos aislados de hMPV prototípicos con APV-A y APV-C

Matrices de similitud de ADN

<u>N</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,862	0,757	0,660
99-1	---	1,000	0,757	0,663
APVC	---	---	1,000	0,656
APVA	---	---	---	1,000

<u>P</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,811	0,677	0,588
99-1	---	1,000	0,674	0,593
APVC	---	---	1,000	0,584
APVA	---	---	---	1,000

<u>M</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,865	0,766	0,695
99-1	---	1,000	0,773	0,707
APVC	---	---	1,000	0,705
APVA	---	---	---	1,000

<u>F</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,838	0,706	0,662
99-1	---	1,000	0,716	0,655
APVC	---	---	1,000	0,685
APVA	---	---	---	1,000

<u>M2-1</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,863	0,764	0,668
99-1	---	1,000	0,744	0,657
APVC	---	---	1,000	0,670
APVA	---	---	---	1,000

<u>M2-2</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,861	0,648	0,486
99-1	---	1,000	0,675	0,486
APVC	---	---	1,000	0,463
APVA	---	---	---	1,000

<u>SH</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,688	N.A.	0,421
99-1	---	1,000	N.A.	0,380
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

<u>G</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,543	N.A.	0,262
99-1	---	1,000	N.A.	0,263
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

Fig. 18b

<u>5'L</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,835	N.A.	0,596
99-1	---	1,000	N.A.	0,605
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

5'L: sólo estuvieron disponibles los primeros 1500 nucleótidos de 99-1

N.A.: secuencia no disponible

Matrices de similitud de proteínas

<u>N</u>	00-1	99-1	APVC	APVA	
	00-1	1,000	0,949	0,880	0,685
	99-1	---	1,000	0,883	0,682
	APVC	---	---	1,000	0,700
	APVA	---	---	---	1,000
<u>P</u>	00-1	99-1	APVC	APVA	
	00-1	1,000	0,860	0,683	0,552
	99-1	---	1,000	0,676	0,549
	APVC	---	---	1,000	0,528
	APVA	---	---	---	1,000
<u>M</u>	00-1	99-1	APVC	APVA	
	00-1	1,000	0,976	0,874	0,775
	99-1	---	1,000	0,874	0,763
	APVC	---	---	1,000	0,775
	APVA	---	---	---	1,000
<u>F</u>	00-1	99-1	APVC	APVA	
	00-1	1,000	0,938	0,810	0,677
	99-1	---	1,000	0,803	0,674
	APVC	---	---	1,000	0,719
	APVA	---	---	---	1,000
<u>M2-1</u>	00-1	99-1	APVC	APVA	
	00-1	1,000	0,946	0,844	0,719
	99-1	---	1,000	0,834	0,703
	APVC	---	---	1,000	0,704
	APVA	---	---	---	1,000
<u>M2-2</u>	00-1	99-1	APVC	APVA	
	00-1	1,000	0,901	0,563	0,246
	99-1	---	1,000	0,577	0,232
	APVC	---	---	1,000	0,191
	APVA	---	---	---	1,000
<u>SH</u>	00-1	99-1	APVC	APVA	
	00-1	1,000	0,570	N.A.	0,178
	99-1	---	1,000	N.A.	0,162
	APVC	---	---	N.A.	N.A.
	APVA	---	---	---	1,000
<u>G</u>	00-1	99-1	APVC	APVA	
	00-1	1,000	0,326	N.A.	0,094
	99-1	---	1,000	N.A.	0,107
	APVC	---	---	N.A.	N.A.
	APVA	---	---	---	1,000
<u>5'L</u>	00-1	99-1	APVC	APVA	
	00-1	1,000	0,921	N.A.	0,600
	99-1	---	1,000	N.A.	0,594
	APVC	---	---	N.A.	N.A.
	APVA	---	---	---	1,000

Fig. 19

5'L: sólo estuvieron disponibles los primeros 500 restos de aminoácidos de 99-1

N.A.: secuencia no disponible

Fig.20

Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de dos aislados de hMPV prototípicos

Nucleoproteína (N)

```

          10      20      30      40      50      60
00-1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
99-1  MSLQGIHLS DLSYKHAILKESQYTIKRDVGT TTA VTPSSLQQEITLLCGEILYAKHADYK 60
          70      80      90     100     110     120
00-1  YAAEIGIQYI S TALGSERVQQILRNSGSEVQVVLTRTYSLGKIKNNKGEDLQMLDIHGVE 120
99-1  YAAEIGIQYI CTALGSERVQQILRNSGSEVQVVLTKTYSLGKIKNSKGEELQMLDIHGVE 120
          130     140     150     160     170     180
00-1  KSWVEEIDKEARKTMA TLLKESSGNIPQNQRPSAPDTP IILLCVGALIFTKLASTIEVGL 180
99-1  KSWIEEIDKEARKTMV TLLKESSGNIPQNQRPSAPDTP IILLCVGALIFTKLASTIEVGL 180
          190     200     210     220     230     240
00-1  ETTVRRANRVLS DALKRYPRMDI PKIAR SFYDLFEQKVYHRSLFIEYGKALGSSSTGSKA 240
99-1  ETTVRRANRVLS DALKRYPRIDIPKIAR SFYELFEQKVYYRSLFIEYGKALGSSSTGSKA 240
          250     260     270     280     290     300
00-1  ESLFVNIFMQAYGAGQ TMLRWGV IARSSNNIMLGHVSVQAE LKQVTEVYDLVREMGPESG 300
99-1  ESLFVNIFMQAYGAGQ TLLRWGV IARSSNNIMLGHVSVQSE LKQVTEVYDLVREMGPESG 300
          310     320     330     340     350     360
00-1  LLHLRQSPKAGLLS LANCPNFASVVLGNASGLGI GMYRGRVPNTELFSAAESYAKSLKE 360
99-1  LLHLRQSPKAGLLS LANCPNFASVVLGNASGLGI GMYRGRVPNTELFSAAESYARSLKE 360
          370     380     390
00-1  SNKINFSSLGLTDEE KEAAEHFLNVS DSDSONDYE 394
99-1  SNKINFSSLGLTDEE KEAAEHFLNMS GDNQDDYE 394

```

Fig.21

Fosfoproteína (P)

```

      10      20      30      40      50      60
00-1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
99-1  MSFPEGKDILFMGNEAAKLAFAFQKSLRKP[GHKRSQSIIGEKVNTVSETLELPTISRPAK 60
      70      80      90     100     110     120
00-1  [PTIPSEPKLAWTDKGGATKTEIKQAIKVM[DP[IEEEEEST[TEKKVLPSSDGKTPAEKKLKP[ST 120
99-1  [SSTLLEPKLAWADNSGITKITEKPAKTI[DPV[EEEEFN[NEKKVLPSSDGKTPAEKKSKE[ST 120
      130     140     150     160     170     180
00-1  [NTKKKVSFT[PN[EPGKYTKLEKDALDLLSDNEEEDAESSILTFEERDTSSLSIEARLESIE 180
99-1  [SVKKKVSFT[SN[EPGKYTKLEKDALDLLSDNEEEDAESSILTFE[EKDTSSLSIEARLESIE 180
      190     200     210     220     230     240
00-1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
99-1  EKLSMILGLLRTLNIATAGPTAARDGIRDAMIGVREELIADI[KEAKGKAAEMMEEEMSQ 240
      250     260     270     280     290
00-1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
99-1  RSKIGNGSVKLTEKAKELNKIVEDESTSGE[EEEEEPKDTQDNSQ[EDDIYQLIM 294
          
```

Fig.22

Proteína de la matriz (M)

	10	20	30	40	50	60	
						
00-1	MESYLVDTYQGI PYTAAVQVDLIEKDLLPASLTIWFPLFQANTPPAVLLDQLKTLTITTL						60
99-1	MESYLVDTYQGI PYTAAVQVDLVEKDLLPASLTIWFPLFQANTPPAVLLDQLKTLTITTL						60
	70	80	90	100	110	120	
						
00-1	YAASQNGPILKVNASAQGAAMSVLPKKFEVNATVALDEYSKLEFDKLTVCVKTIVYLTMM						120
99-1	YAASQNGPILKVNASAQGAAMSVLPKKFEVNATVALDEYSKLDKLTVCVKTIVYLTMM						120
	130	140	150	160	170	180	
						
00-1	KPYGMVSKFVSSAKSVGKKTDLIALCDFMDLEKNTIPVTIPAFIKSVSIKESATVEAA						180
99-1	KPYGMVSKFVSSAKSVGKKTDLIALCDFMDLEKNTIPVTIPAFIKSVSIKESATVEAA						180
	190	200	210	220	230	240	
						
00-1	ISSEADQALTQAKIAPYAGLIMIMTMNPKGIFKKLGAGTQVIVELGAYVQAESISKICK						240
99-1	ISSEADQALTQAKIAPYAGLIMIMTMNPKGIFKKLGAGTQVIVELGAYVQAESISRICK						240
	250						
						
00-1	TWSHQGTRYVLKSR						254
99-1	SWSHQGTRYVLKSR						254

Fig.23

Proteína de fusión (F)

```

      10      20      30      40      50      60
00-1 MSWKVVIIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTC 60
99-1 MSWKVMIIISLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTC 60

      70      80      90      100     110     120
00-1 ADGPSLIKTELDLTKSALRELRTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTA 120
99-1 ADGPSLIKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTA 120

     130     140     150     160     170     180
00-1 GVAIAKTIRLESEVTAIKNAALKKTNEAVSTLGNQVVRVLATAVRELKDFVSKNLTTRAINKN 180
99-1 GIAIAKTIRLESEVNAIKGALKQTNEAVSTLGNQVVRVLATAVRELKEFVSKNLTSAINRN 180

     190     200     210     220     230     240
00-1 KCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQ 240
99-1 KCDIADLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLDLMTDAELARAVSYMPTSAGQ 240

     250     260     270     280     290     300
00-1 IKMLLENRAMVRRKGFGLIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSKKKGNYA 300
99-1 IKMLLENRAMVRRKGFGLIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIIKAAPSCSEKKNKGYA 300

     310     320     330     340     350     360
00-1 CLLREDQGWYQONAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNY 360
99-1 CLLREDQGWYCKNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSRECNINISTTNY 360

     370     380     390     400     410     420
00-1 CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTI 420
99-1 CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLPKGCSYITNQDADTVTI 420

     430     440     450     460     470     480
00-1 DNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPVKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNRI 480
99-1 DNTVYQLSKVEGEQHVIKGRPVSSSFDPIKFPEDQFNVALDQVFESIENSQALVDQSNKI 480

     490     500     510     520     530
00-1 LSSAEKGNTEGFIIVIIILIAVLGSTMIVSVFIIIIKKTKKPTGAPPELNGVTNNGFIPHN 539
99-1 LNSAEKGNTEGFIIVVILVAVLGLTMIISVSIIIIIKKTTRKPTGAPPELNGVTNCGFIPHS 539
    
```

Fig.24

Proteína 22K (M2-1)

	10	20	30	40	50	60	
00-1	MSRKAPCKYEVRGKCNRGSECKFNHNYWSWPD	RYLLIRSNYLLNQLLRNTDRADGLSIIS	60				
99-1	MSRKAPCKYEVRGKCNRGSDCKFNHNYWSWPD	RYLLLRSNYLLNQLLRNTDKADGLSIIS	60				
	70	80	90	100	110	120	
00-1	GAGREDRTQDFVLGSTNVVQGYIDDNQ	SITKAAACYSLHNIKQLQEV	EVQRARDNKLS	120			
99-1	GAGREDRTQDFVLGSTNVVQGYIDDNQ	SITKAAACYSLHNIKQLQET	EVQRARDNKLS	120			
	130	140	150	160	170	180	
00-1	SKHVALHNLVLSYMEMSKTPASLINNLKRLPREKLK	LAKLIIDLSAG	ENDSSYALQDS	180			
99-1	SKHVALHNLILSYMEMSKTPASLINNLKRLPREKLK	LARLIIDLSAG	ENDSSYALQDS	180			
00-1	ESTNQVQ	187					
99-1	ESTNQVQ	187					

Fig.25

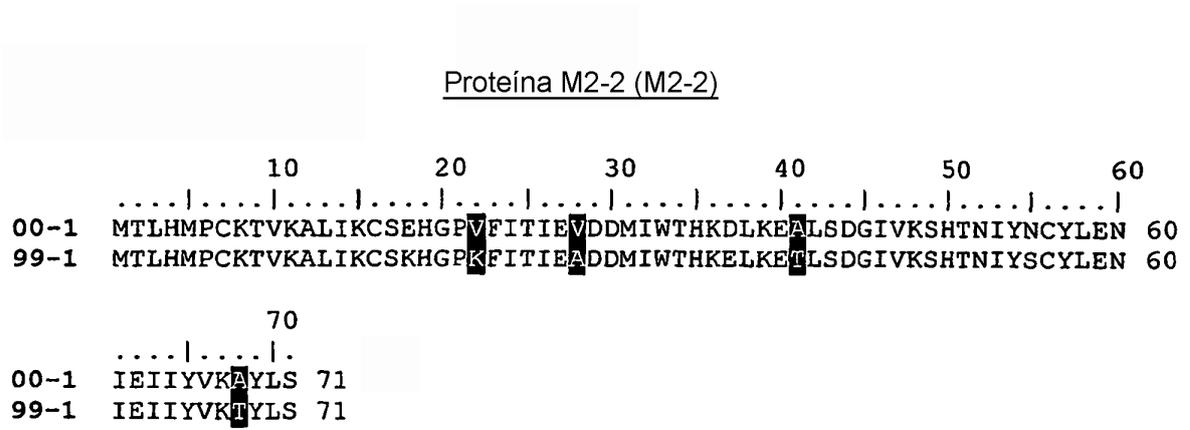


Fig.26

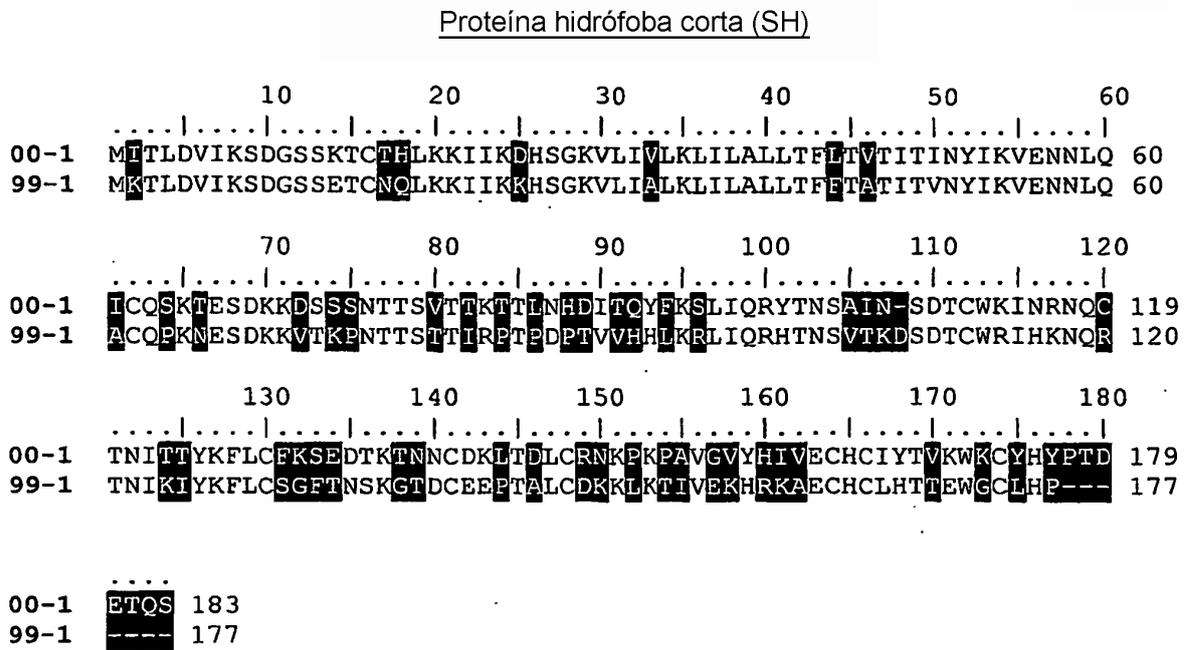


Fig.27

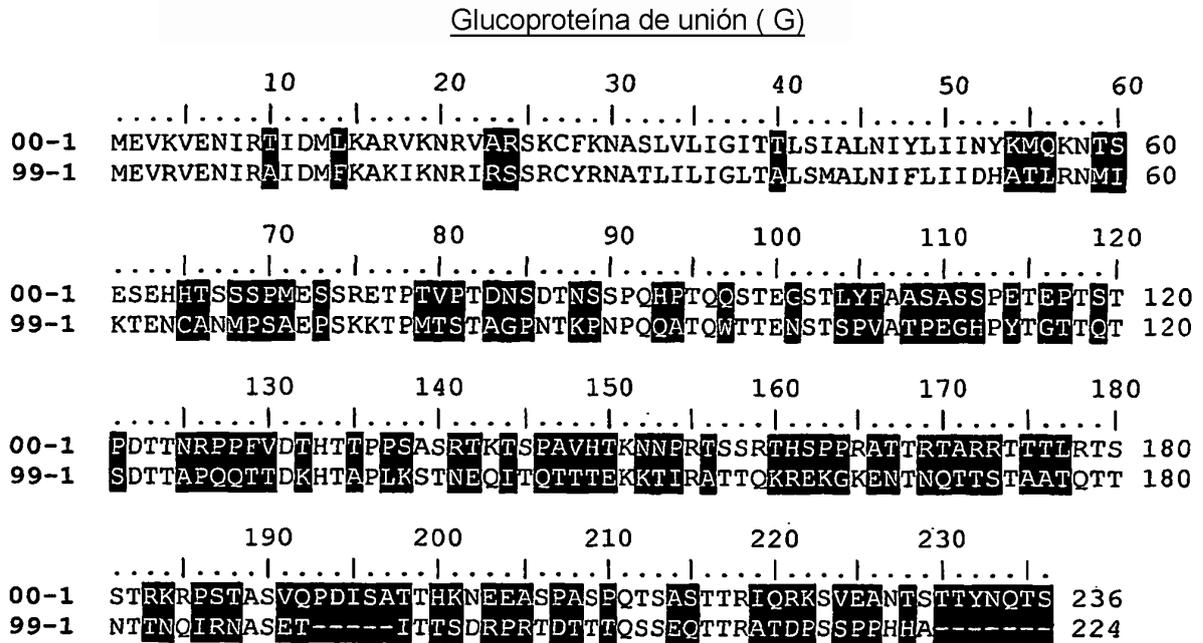


Fig.28

Término N de proteína de polimerasa (L)

```

          10      20      30      40      50      60
00-1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
00-1  MDPLNESTVNVYLPDSYLKGVISFSETNAIGSCLLKRPYLKNDNTAKVAIENPVIEHVRL 60
99-1  MDPFCESTVNVYLPDSYLKGVISFSETNAIGSCLLKRPYLKNDNTAKVAVENPVVEHVRL 60

          70      80      90      100     110     120
00-1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
00-1  KNAVNSKMKISDYKIVEPVNMQHEIMKNVHSCELTLKQFLTRSKNISTLKLNMICDWLQ 120
99-1  RNAVMTKMKISDYKVVEPVNMQHEIMKNIHSCELTLKQFLTRSKNISSLKLNMICDWLQ 120

          130     140     150     160     170     180
00-1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
00-1  LKSTSDDTSILSFIDVEFIPSWVSNWFSNWYNLNKLILEFRKEEVIRTGSILCRSLGKLV 180
99-1  LKSTSDNTSILNFIDVEFIPVWVSNWFSNWYNLNKLILEFRREEVIRTGSILCRSLGKLV 180

          190     200     210     220     230     240
00-1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
00-1  FVVSYSYGCIVKSNKSKRVSFFTYNQLLTWKDVMLSRFNANFCIWVSNLNLNQEGLGLRS 240
99-1  FIVVSYSYGCVVKSNKSKRVSFFTYNQLLTWKDVMLSRFNANFCIWVSNLNLKNQEGLGLRS 240

          250     260     270     280     290     300
00-1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
00-1  NLQGILTINKLYETVDYMLSLCCNEGFSLVKEFEGFIMSEILRITEHAQFSTRFRNTLLNG 300
99-1  NLQGMLTINKLYETVDYMLSLCCNEGFSLVKEFEGFIMSEILKITEHAQFSTRFRNTLLNG 300

          310     320     330     340     350     360
00-1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
00-1  LTDQLTKLKNKNRRLRVHGTVLENNDYPMYEVVLKLLGDTLRCIKLLINKNLNAAELYI 360
99-1  LTEQLSVLKAKNRSRVLGTILENNNYPMYEVVLKLLGDTLKS IKLLINKNLNAAELYI 360

          370     380     390     400     410     420
00-1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
00-1  FRIFGHMPVDERDAMDAVKLNNEITKILRWESLTELRGAFILRI IKGFDVNNKRWPKIKN 420
99-1  FRIFGHMPVDEREAMDAVKLNNEITKILKLESLTELRGAFILRI IKGFDVNNKRWPKIKN 420

          430     440     450     460     470     480
00-1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
00-1  LKVLSKRWTMYFKAKSYPSQLELSFQDFLELAAIQFEQEFVPEKTNLEMVLNDKAI SPP 480
99-1  LKVLSKRWTMYFKAKSYPSQLELSVQDFLELAAVQFEQEFVPEKTNLEMVLNDKAI SPP 480

          490
00-1  ....|....|....|....|
00-1  KRLIWSVYPKNYLPEIKN 499
99-1  KKLIWSVYPKNYLPEIKN 499
    
```

Fig. 29

+ = positivo; - = negativo; T = torundas de garganta; NO = torunda de nariz; N = realizado; ? = seguro; D = muerto; 0 a 12: días después de la infección. 2ª infección sólo se ensaya en las torundas de la nariz

nr	1ª infección	torunda	0	1	2	3	4	5	8	10	11	12	2ª infección	0	1	2	3	4	5
1	00-1	T	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	99-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	N	+	-	-		-	-	-	-	-	-
2	00-1	T	-	+	+	+	+	+	-	-	-	D		N	N	N	N	N	N
		NO		+	+	+	+	+	N	+	-	D		-	-	-	-	-	-
3	00-1	T	-	-	?	-	-	-	-	-	-	N	99-1	N	N	?	N	N	N
		NO		+	?	?		-	N	-	-	-		-	-	?	+	+	-
4	00-1	T	-	+	+	+	+	+	-	?	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	N	?	-	-		-	-	-	+	-	-
5	00-1	T	-	?	+	+	+	+	+	+	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N
		NO		+	+	+	+	+	N	+	-	-		-	-	-	-	-	-
6	00-1	T	-	-	+	+	+	+	-	+	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	N	+	+	?		-	-	-	-	-	-
7	99-1	T	-	-	-	+	+	-	+	D	-	-		N	N	N	N	N	N
		NO	-	-	--	+	+	+	N	D	-	-		-	-	-	-	-	-
8	99-1	T	-	-	+	+	-	-	-	-	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	?	-	+	+	?	N	-	-	--		-	-	+	+	+	+
9	99-1	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	-	-	-	+	+	N	-	-	--		-	?	+	+	-	-
10	99-1	T	-	-	-	+	+	-	-	-	-	N	99-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	N	-	-	--		-	-	-	-	-	-
11	99-1	T	-	-	+	+	+	-	-	-	-	N	99-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	?	+	+	+	N	-	-	-		-	-	-	+	-	-
12	99-1	T	-	-	+	+	?	-	-	-	-	N	99-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	N	-	-	-		-	-	-	-	-	-

Fig. 30A

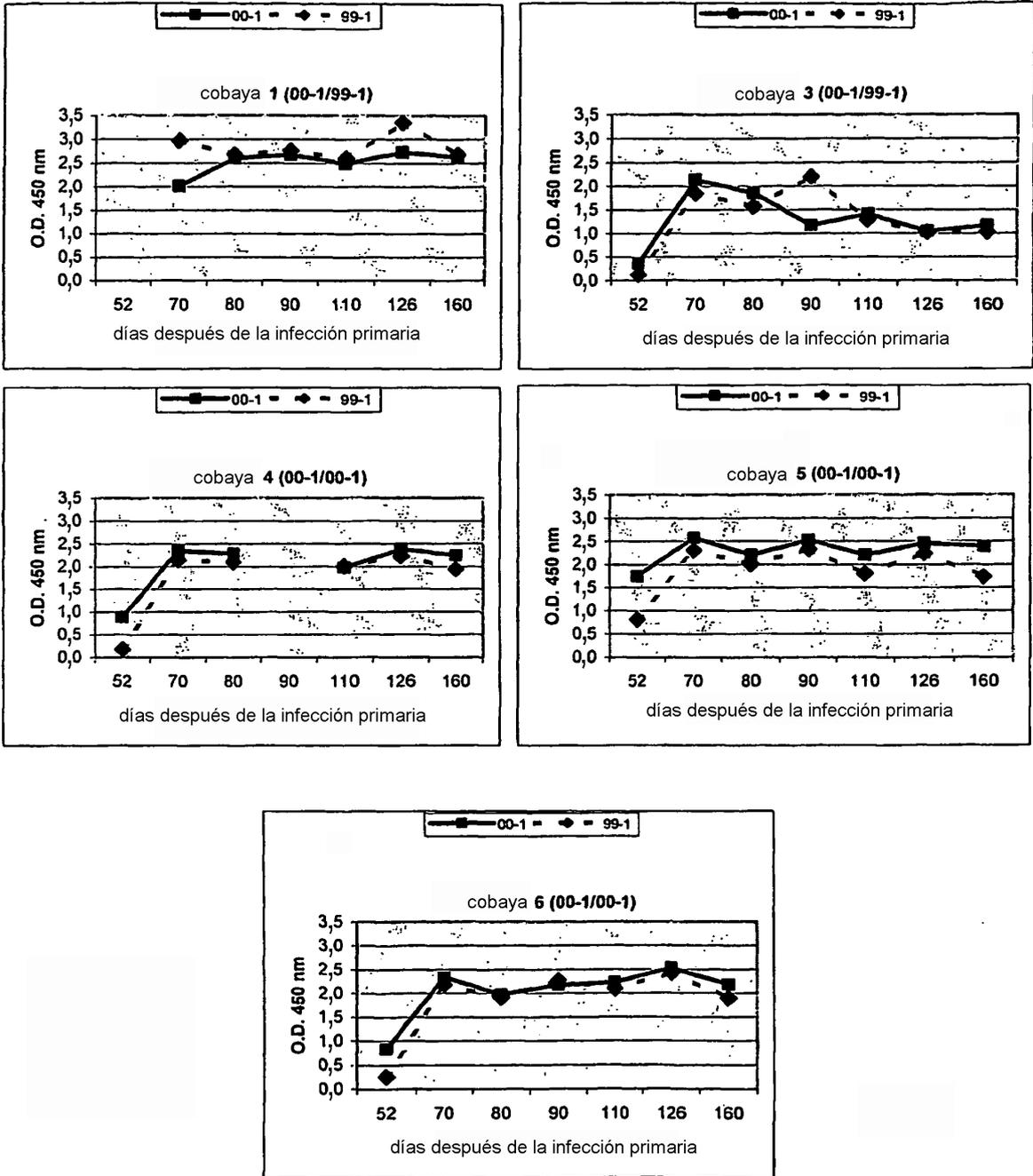


Fig. 30B

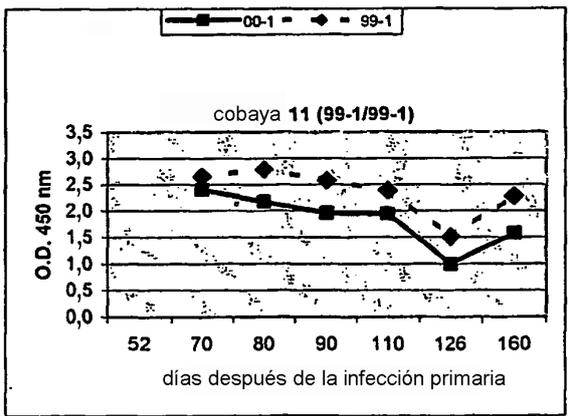
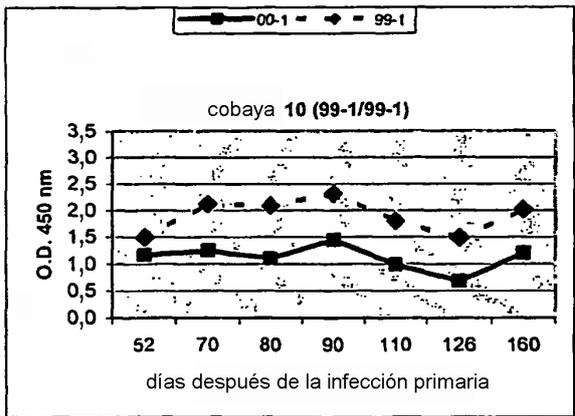
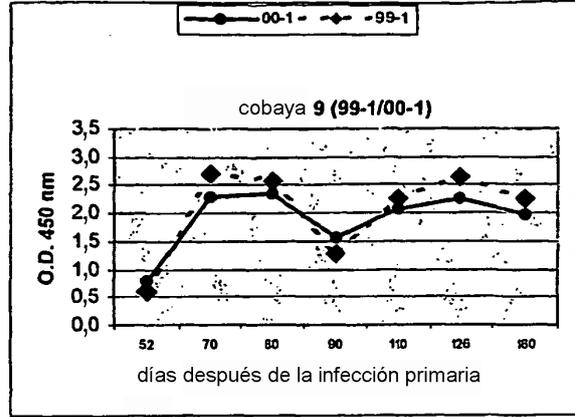
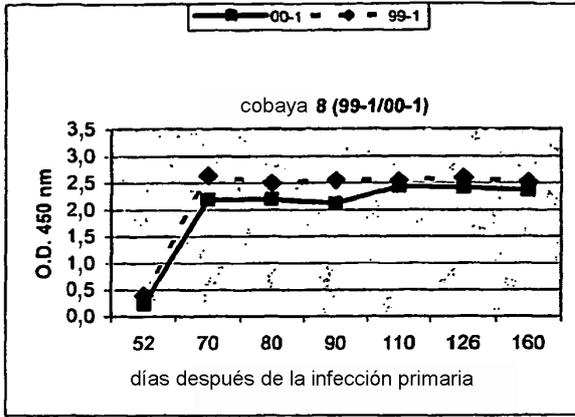


Fig. 31

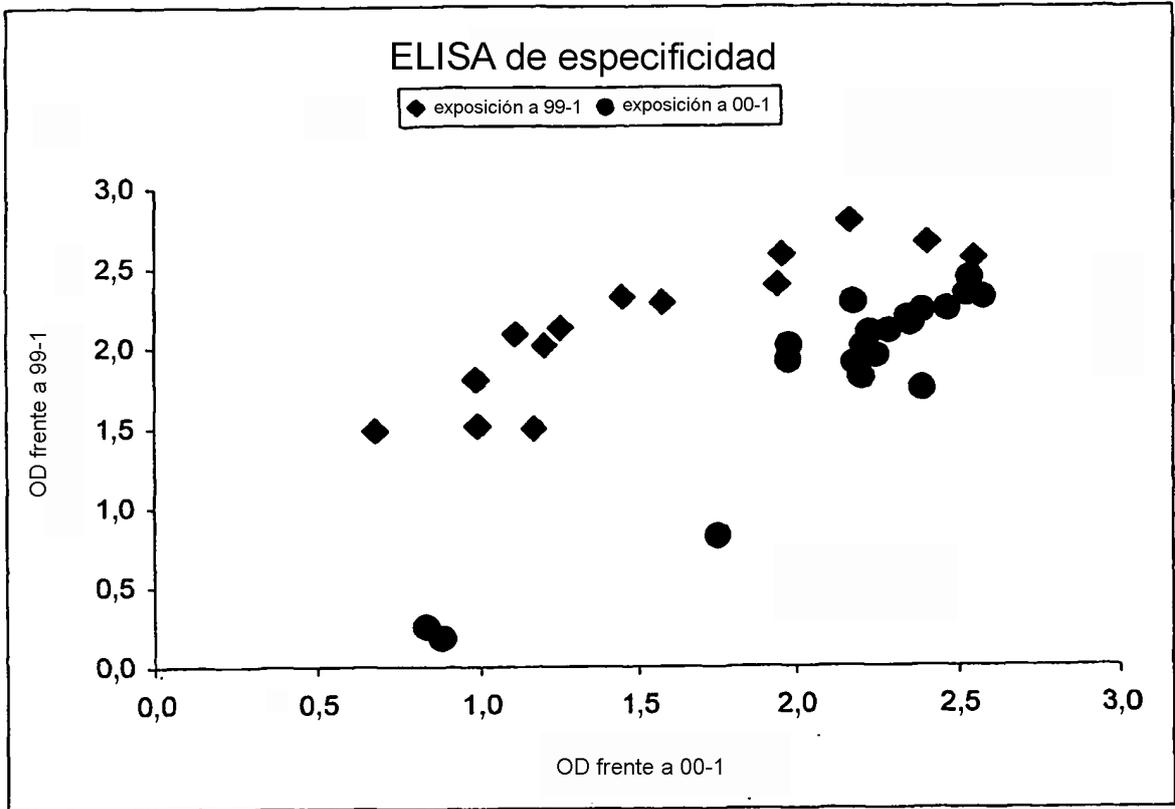


Fig. 32

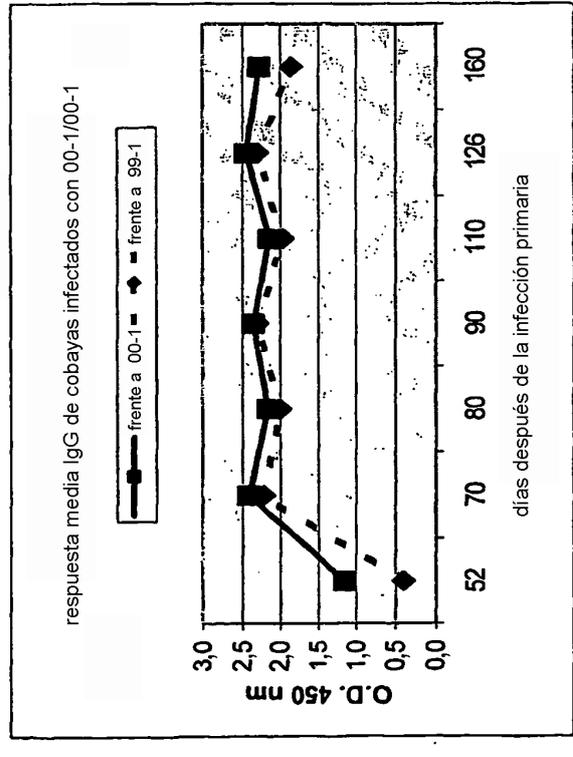
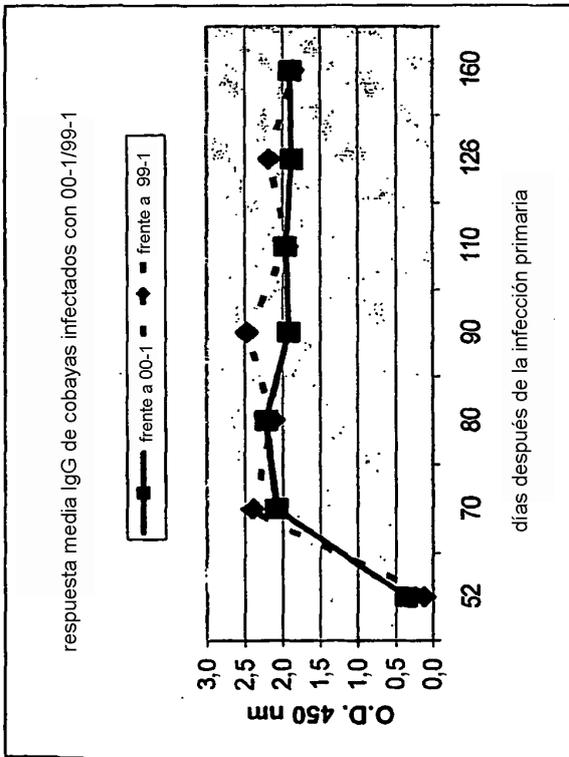
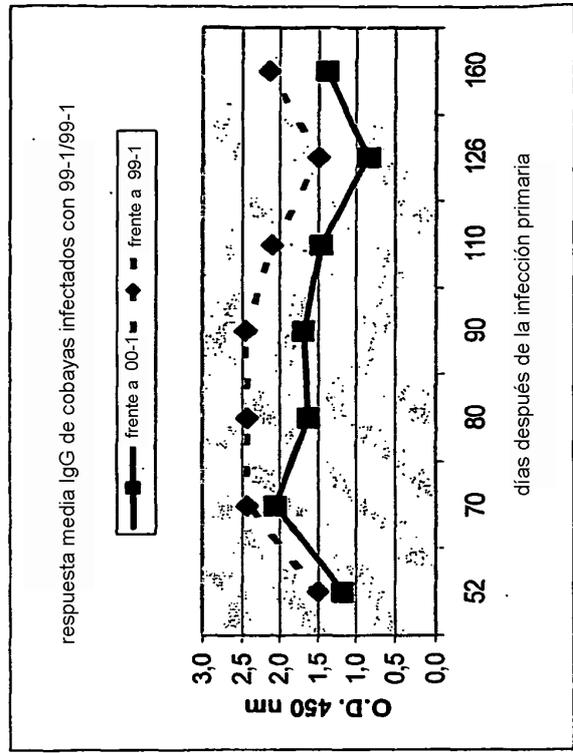
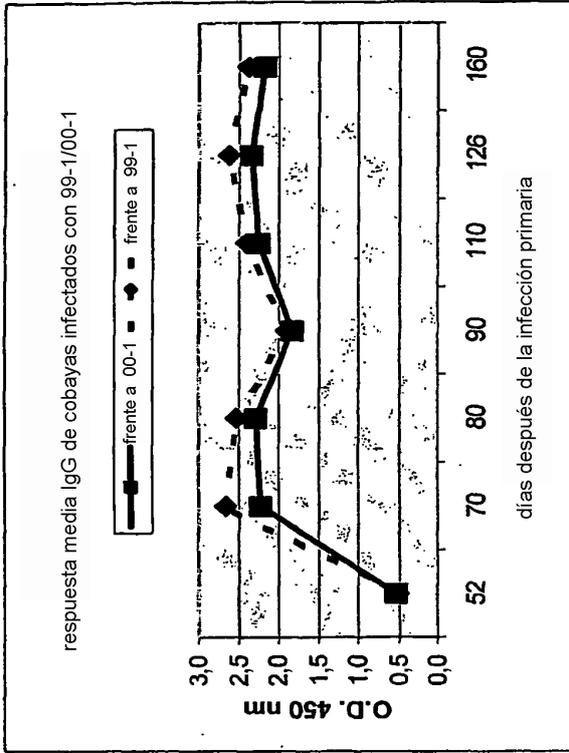


Fig. 33

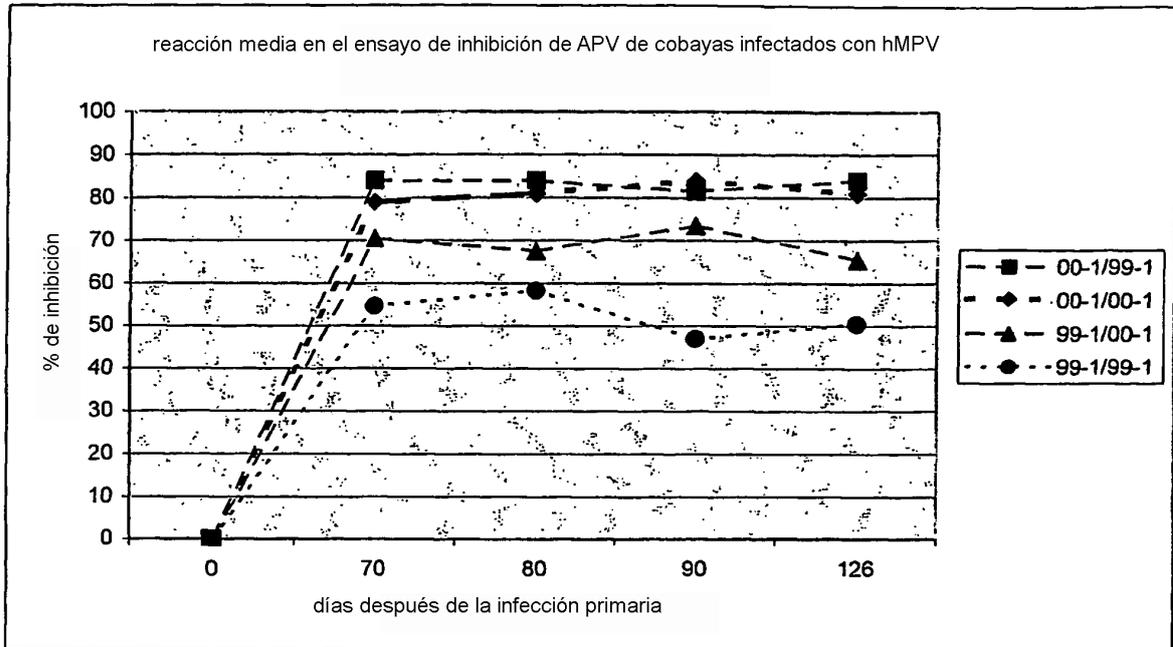


Fig. 34

	Frente a 00-1	Frente a 99-1	Frente a APV-C
1 infección con 00-1			
2 infecciones con 00-1			
1 infección con 99-1			
2 infecciones con 00-1			

Fig. 35

+ = positivo ; - = negativo ; N = ^{no}realizado ; ? = ^{no}seguro ; 0 a 10: días después de la infección

nr	1 ^a infección											2 ^a infección										
		0	2	3	4	5	6	7	8	9	11		0	1	2	3	4	5	7	10		
3	00-1	-	-	-	+	+	+	+	+	N	-		-	+	+	+	+	-	?	-		
6	00-1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-		-	+	+	+	+	+	-	-		

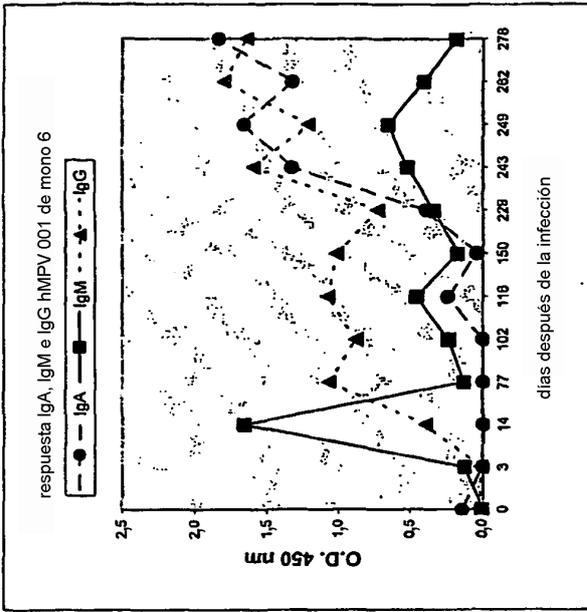


Fig. 36A

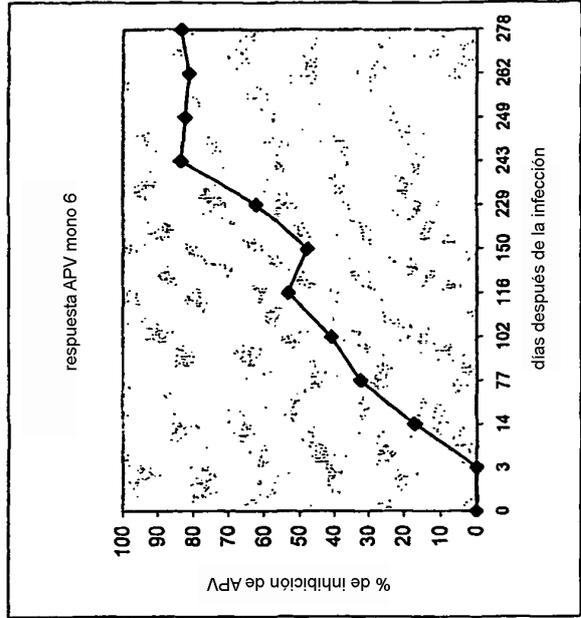


Fig. 36B

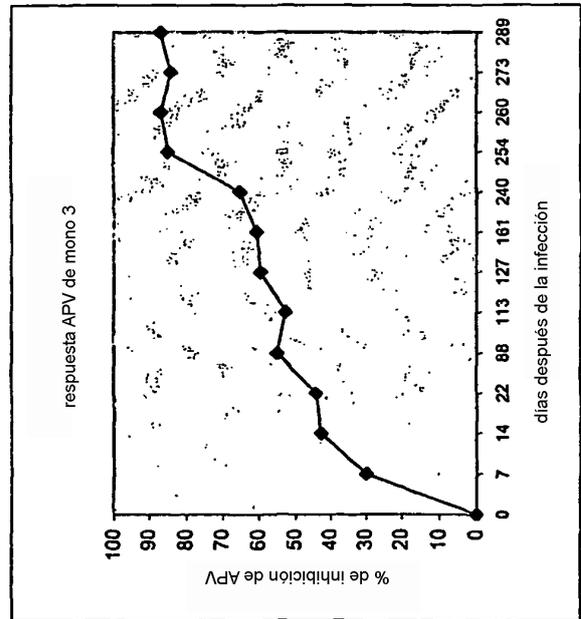
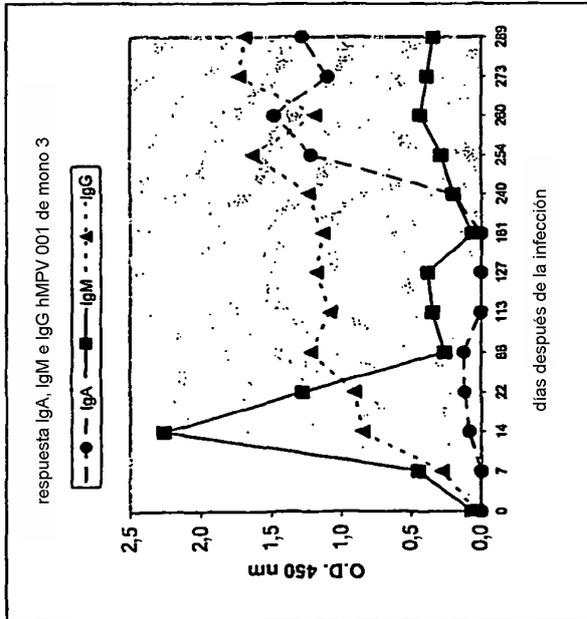


Fig. 37

